



УДК 547.392.52.057:577.152.113*111.2.037

**КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ ЭТАНОЛАМИДОВ АРАХИДОНОВОЙ
(АНАНДАМИДА) И ЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВОЙ КИСЛОТ СОЕВОЙ
15-ЛИПОКСИГЕНАЗОЙ**© 1996 г. М. Ю. Бобров, А. В. Арчаков, Г. С. Когтева, Е. В. Фомина-Агеева,
Г. Н. Зинченко, Н. М. Грецкая, Д. В. Куклев, В. В. Безуглов[#]*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступило в редакцию 04.06.96 г.

С помощью УФ-спектроскопии изучено окисление этаноламидами арахидоновой (анандамида) и эйкозапентаеновой кислот 15-липоксигеназой соевых бобов. Полученные значения K_m для обоих аминов (3.2 и 4.9 мкМ соответственно) оказались того же порядка, что и для арахидоновой кислоты. Показано, что при уменьшении соотношения субстрат/фермент до 500 в инкубационной среде образуются продукты двойного липоксигеназного окисления.

Ключевые слова: анандамид; арахидоновая кислота; эйкозапентаеновая кислота; соевая 15-липоксигеназа, кинетика окисления; оксипирины; этаноламида гидроксиэйкозаполиеновых кислот.

Этаноламид арахидоновой кислоты (анандамид) (I) недавно описан как эндогенный лиганд каннабиноидных рецепторов [1], имеющий особую систему биосинтеза через амидирование арахидоновой кислоты этаноламином [2–4] или гидролизом N-арахидоноилфосфатидилэтанолamina ферментом, подобным фосфолипазе D [5], и метаболизирующий под действием амидогидролаз [2, 6, 7]. Будучи производным арахидоновой кислоты, анандамид способен вовлекаться в качестве субстрата в эйкозаноидный каскад с образованием оксипиринов. Было показано, что анандамид является субстратом 15-липоксигеназы растений и млекопитающих [8, 9], 12-липоксигеназы млекопитающих [8, 10]. Однако до настоящего времени кинетические параметры липоксигеназного окисления анандамида не были приведены в литературе. В настоящем сообщении мы описываем результаты изучения кинетики окисления анандамида и этаноламида эйкозапентаеновой кислоты 15-липоксигеназой соевых бобов.

Анандамид (I) и этаноламид эйкозапентаеновой кислоты (II) получали из соответствующих кислот последовательной обработкой их растворов в ацетонитриле карбонилдидимидазолом (1.4 экв., 25°C, 1.5 ч) и этаноламином (3 экв., 25°C, 2 ч и 0°C, 18 ч). Продукты реакции очищали хроматографией на силикагеле (Kieselgel G 60, Merck, Германия). Анандамид (I) получен с выходом 85% в виде бесцветного масла, R_f 0.56 (хлороформ–метанол, 10 : 1, система А). УФ: остаточное поглощение, макси-

мум при $\lambda > 206$ нм отсутствует. ¹H-ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0.91 (3H, т, H₂₀), 1.28 (6H, м, H₁₇–H₁₉), 1.17 (2H, м, H₃), 2.07 (4H, м, H₄, H₁₆), 2.22 (2H, т, H₂), 2.81 (6H, м, H₇, H₁₀, H₁₃), 3.43 (2H, дт, H₁'), 3.74 (2H, т, H₂'), 5.35 (8H, м, H₅, H₆, H₈, H₉, H₁₁, H₁₂, H₁₄, H₁₅), 6.06 (1H, с, NH). Масс-спектр*: 347([M⁺]).

Этаноламид (II) получен с выходом 80% в виде бесцветного масла, R_f 0.56 (А). УФ: остаточное поглощение, максимум при $\lambda > 206$ нм отсутствует. ¹H-ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0.97 (3H, т, H₂₀), 1.74 (2H, м, H₃), 2.07 (4H, м, H₄, H₁₉), 2.21 (2H, т, H₂), 2.82 (8H, м, H₇, H₁₀, H₁₃, H₁₆), 3.38 (2H, дт, H₁'), 3.69 (2H, т, H₂'), 5.37 (10H, м, H₅, H₆, H₈, H₉, H₁₁, H₁₂, H₁₄, H₁₅, H₁₇, H₁₈), 6.25 (1H, с, NH). Масс-спектр: 345 ([M⁺]). Препаративное получение продуктов липоксигеназного окисления этаноламидами (I) и (II) соевой 15-липоксигеназой проводили как описано ранее [11].

Этаноламид (5Z,8Z,11Z,13E)-15-гидроксиэйкоза-5,8,11,13-тетраеновой кислоты (III) получен с выходом 20% в виде бесцветного масла с характерным запахом, R_f 0.49 (А). УФ: λ_{max} 235 нм (ϵ 17000, этанол). ¹H-ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0.89 (3H, т, H₂₀), 1.31 (6H, м, H₁₇–H₁₉), 1.59 (2H, м, H₁₆), 1.74 (2H, м, H₃), 2.13 (2H, м, H₄), 2.23 (2H, т, H₂), 2.84 (2H, м, H₇), 2.93 (2H, м, H₁₀), 3.42 (2H, дт, H₁'), 3.72 (2H, т, H₂'), 4.19 (1H, м, H₁₅), 5.41 (5H, м, H₅, H₆, H₈, H₉, H₁₁), 5.73 (1H, дд, $J_{14,13}$ 15.4, $J_{14,15}$ 6.6 Гц,

[#] Автор для переписки (факс: (095) 335-71-03, электронная почта: vvbez@ibch.siobc.ras.ru (Internet)).

* Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре МСВХ (Сумы, Украина) с плазменной десорбцией, индуцированной ²⁵²Cf.

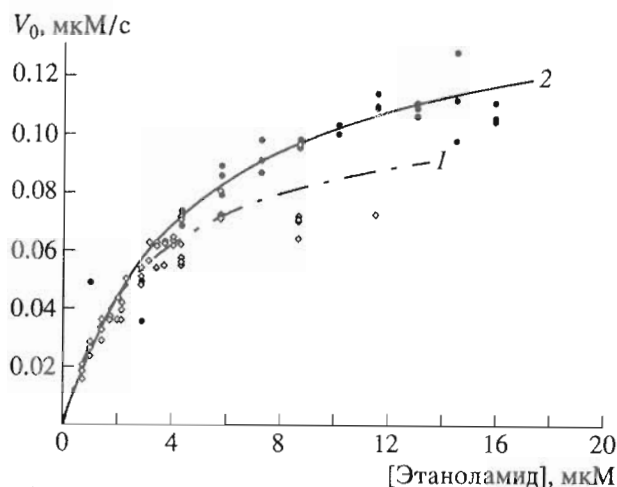


Рис. 1. Зависимость начальной скорости липоксигеназного окисления анандамида (I) (○) и этаноламида эйкозапентаеновой кислоты (II) (●) от концентрации субстрата; кривые 1 и 2 представляют собой аппроксимацию экспериментальных данных для соединений (I) и (II) соответственно по уравнению Михаэлиса-Ментен.

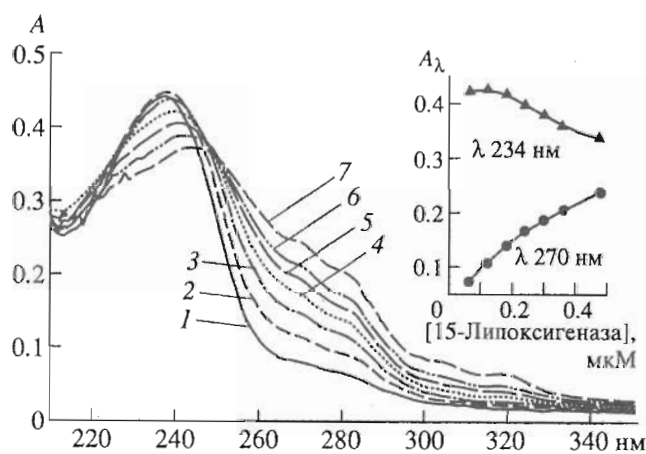
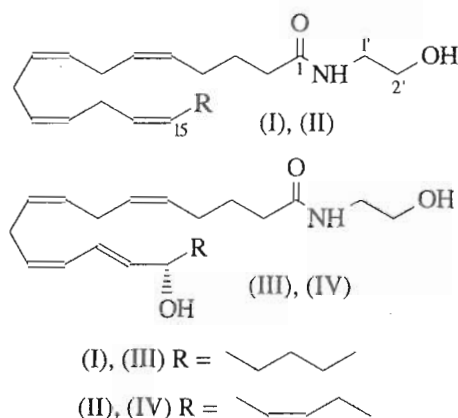


Рис. 2. УФ-спектры реакционной смеси окисления анандамида соевой липоксигеназой (25°C, 1 ч) при различном молярном соотношении [субстрат]/[фермент]: 490 (1), 245 (2), 163 (3), 122 (4), 98 (5), 81 (6), 61 (7). Концентрация анандамида 28.8 мкМ. На вставке показано изменение оптического поглощения при длине волн, соответствующих 15-гидроксипроизводному (III) (234 нм) и этаноламиду 8,15-дигидроксиэйкозатетраеновой кислоты (270 нм). В качестве образца сравнения использовали растворы фермента соответствующей концентрации.

H14), 6.02 (1H, дд, $J_{12,13} = J_{12,11} = 11$ Гц, H12), 6.03 (1H, с, NH), 6.56 (1H, дд, $J_{13,14} = 15.4$, $J_{13,12} = 11$ Гц, H13). Масс-спектр: 363 ($[M^+]$).

Этаноламид (5Z,8Z,11Z,13E,17Z)-15-гидроксиэйкоза-5,8,11,13,17-пентаеновой кислоты (IV) получен с выходом 25% в виде бесцветного масла с характерным запахом, R_f 0.49 (А). УФ: λ_{\max} 236 нм

(ϵ 26900, этанол). ^1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0.93 (3H, т, H20), 1.69 (2H, м, H3), 2.03 (2H, м, H19), 2.06 (2H, м, H4), 2.17 (2H, т, H2), 2.29 (2H, м, H16), 2.76 (2H, м, H7), 2.93 (2H, м, H10), 3.37 (2H, дт, H1'), 3.68 (2H, т, H2'), 4.19 (1H, м, H15), 5.40 (7H, м, H5, H6, H8, H9, H11, H17, H18), 5.70 (1H, дд, $J_{14,13} = 15$, $J_{14,15} = 7$ Гц, H14), 5.97 (1H, дд, $J_{12,13} = J_{12,11} = 11.5$ Гц, H12), 6.00 (1H, с, NH), 6.54 (1H, дд, $J_{13,14} = 15$, $J_{13,12} = 11.5$ Гц, H13). Масс-спектр: 361 ($[M^+]$).



Для определения кинетических параметров окисления 15-липоксигеназой 1.5 мл раствора соединения (I) или (II) (1–20 мкМ) в боратном буфере (0.2 М, pH 9.0, буфер Б) смешивали с 0.5 мл раствора фермента (КФ 1.13.11.12, тип I, 130000 ед. акт./мг белка; Sigma, США) концентрации 4 мкг/мл (~47 нМ) в том же буфере и фиксировали оптическое поглощение с интервалом 2 с на спектрофотометре Ultraspec II (ЛКВ, Швеция) при длине волны 234 нм. Для расчета величины V_{\max} из концентрации продуктов использовали ϵ 14000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ для этаноламида 15-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты (III) и ϵ 20400 для этаноламида 15-гидроксиэйкозапентаеновой кислоты (IV), измеренные для заведомых образцов в буфере Б при той же длине волны. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата представлена на рис. 1. Аппроксимацией данных по уравнению Михаэлиса-Ментен получены значения K_m 3.2 мкМ и V_{\max} 0.11 мкМ/с для анандамида (I) и K_m 4.9 мкМ и V_{\max} 0.15 мкМ/с для этаноламида (II). Значения K_m оказались того же порядка, что и для арахидоновой кислоты [12, 13], а отношение $V_{\max}(\text{I})/V_{\max}(\text{II})$, равное 0.74, близко к отношению значений V_{\max} арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот, которое, по данным [14], составляет 0.84.

Указанные константы получены для окисления этаноламидов (I) и (II) в условиях, когда на одну молекулу фермента приходится не менее 700 молекул субстрата. При уменьшении этого соотношения становится заметным появление продуктов двойной окисгенации этаноламидов (см. рис. 2),

имеющих λ_{\max} 242 и 270 нм, что соответствует 5,15- и 8,15-дигидропероксипроизводным (см., например, [13]), структура которых уточняется. При соотношении [субстрат]/[фермент] около 60 количество дигидропероксипроизводных возросло приблизительно до 50%.

Таким образом, впервые определены кинетические параметры окисления анандамида и этаноламида эйкозапентаеновой кислоты и продемонстрирована их способность подвергаться двойному липоксигеназному окислению.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 96-0449191).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Devane W.A., Hanuš L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. // *Science*. 1992. V. 258. P. 1946–1949.
2. Deutsch D.G., Chin S. // *Biochem. Pharmacol.* 1993. V. 46. P. 791–796.
3. Krushka K.K., Gross R.W. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14345–14348.
4. Devane W.A., Axelrod J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 6698–6701.
5. Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz J.-C., Piomelli D. // *Nature*. 1994. V. 372. P. 686–691.
6. Desarnaud F., Cadas H., Piomelli D. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 6030–6035.
7. Ueda N., Kurahashi Y., Yamamoto S., Tokunaga T. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 23823–23827.
8. Ueda N., Yamamoto K., Yamamoto S., Tokunaga T., Shirakawa E., Shinkai H., Ogawa M., Sato T., Kudo I., Inoue K., Takizawa H., Nagano T., Hirobe M., Matsuki N., Saito H. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. V. 1254. P. 127–134.
9. Бобров М.Ю., Когтева Г.С., Фомина-Агеева Е.В., Зинченко Г.Н., Грецкая Н.М., Куклев Д.В., Безуглов В.В. // Тез. докл. симпоз. "Полиненасыщенные жирные кислоты N-6 и N-3 семейств: медико-биологические, биохимические и биотехнологические аспекты". Владивосток, 1995. С. 19–20.
10. Hampson A.J., Hill W.A., Zan-Phillips M., Makriyannis A., Leung E., Eglen R.M., Bornheim L.M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. V. 1259. P. 173–179.
11. Куклев Д.В., Когтева Г.С., Латышев Н.А., Безуглов В.В. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 651–653.
12. Cook H.W., Lands W.E.M. // *Can. J. Biochem.* 1975. V. 53. P. 1220–1231.
13. Van Os C.P.A., Rijke-Schilder G.P.M., van Halbeek H., Verhagen J., Vliegthart J.F.G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1981. V. 663. P. 177–193.
14. Holman R.T., Egwin P.O., Christie W.W. // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. P. 1149–1151.

Kinetics of Oxidation of Ethanolamides of Arachidonic (Anandamide) and Eicosapentaenoic Acids by Soybean 15-Lipoxygenase

M. Yu. Bobrov, A. V. Archakov, G. S. Kogteva, E. V. Fomina-Ageeva, G. N. Zinchenko, N. M. Gretskaya, D. V. Kuklev, and V. V. Bezuglov

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow GSP-7, 117871 Russia

Abstract—Oxidation of arachidonic acid ethanolamide (anandamide) and eicosapentaenoic acid ethanolamide by soybean 15-lipoxygenase was studied by UV spectroscopy. The K_M values for both amides (3.2 and 4.9 μM , respectively) proved to be similar to that for arachidonic acid. Products of double lipoxygenase oxidation were identified in the reaction mixture at an enzyme–substrate ratio of 500 : 1.

Key words: anandamide; arachidonic acid; eicosapentaenoic acid; soybean 15-lipoxygenase, kinetics of oxidation; oxylipins, ethanolamides of hydroxyeicosapentaenoic acids.