

УДК 581.1.577.19

АНАЛИЗ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОКСИЛИПИНОВ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ В ГИДРОПЕРОКСИДЛИАЗНОЙ ВЕТВИ¹

© 2023 г. Я. В. Радзюкевич^a, К. Г. Тихонов^a, Е. А. Дегтярёв^a,
В. И. Дегтярёва^{b, c}, Т. В. Савченко^{a, *}

^aИнститут фундаментальных проблем биологии, Федеральный исследовательский центр
“Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Пушино, Московская область, Россия

^bМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биотехнологический факультет, Москва, Россия

^cФилиал Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Пушино, Московская область, Россия

*e-mail: savchenko_t@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.09.2023 г.

После доработки 15.10.2023 г.

Принята к публикации 15.10.2023 г.

Коротко- и среднецепочечные альдегиды и их производные, образующиеся из жирных кислот в результате активности ферментов гидропероксидлиаз, присутствуют во многих продуктах растительного происхождения. Их часто используют в качестве добавок к продуктам питания для увеличения срока годности и придания аромата свежести. Учитывая, что эти соединения могут всасываться клетками кишечника и поступать в системную циркуляцию, важно оценить их влияние на здоровье человека. В данной работе мы оценили потенциальную биологическую активность альдегидов и спиртов с длиной цепи от 6 до 9 углеродов и проверили их провоспалительную активность на экспериментальной системе, основанной на использовании цельной крови доноров. Анализ показал, что девятиуглеродные оксипилены стимулируют выработку провоспалительного цитокина TNF- α (фактор некроза опухоли-альфа), при этом альдегиды активировали синтез TNF- α в меньшей степени, чем спирты. Шести- и восьмиуглеродные оксипилены не проявляли провоспалительную активность. Полученная информация может быть полезна для разработки диетологических рекомендаций для людей, страдающих воспалительными заболеваниями.

Ключевые слова: воспаление, гидропероксидлиаза, оксипилены, фактор некроза опухоли-альфа, цитокины

DOI: 10.31857/S0015330323600948, **EDN:** BJPMSQ

ВВЕДЕНИЕ

Ненасыщенные жирные кислоты в аэробных организмах окисляются спонтанно или ферментативно с образованием оксипиленов — разнообразных соединений, различающихся как по физико-химическим свойствам, так и по биологическим функциям. В растениях ферментативное образование оксипиленов чаще всего инициируется в результате взаимодействия липазы с липидами мембран, что приводит к освобождению поли-

ненасыщенных жирных кислот, главным образом, линолевой и линоленовой. Далее липоксигеназы окисляют свободные жирные кислоты, образуя гидропероксиды, которые могут выступать субстратами для нескольких параллельных ветвей биосинтеза оксипиленов. Растительные липоксигеназы (ЛОГ) по стереоспецифичности делятся на 9- и 13-ЛОГ в зависимости от позиции окисляемого углерода в углеродной цепи жирной кислоты [1, 2]. Примечательно, что субстратами ЛОГ могут выступать не только свободные жирные кислоты, но и жирнокислотные остатки, входящие в состав липидов мембран [3, 4]. Один из путей дальнейшей модификации гидропероксидов жирных кислот — гидропероксидлиазная (ГПЛ) ветвь, ведущая к образованию альдокислот и летучих альдегидов, а также их производных. Как и

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323600948 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ГПЛ — гидропероксидлиаза, ЛОГ — липоксигеназа, ЛПС — липополисахарид, TNF — фактор некроза опухоли.

ЛОГ, ГПЛ могут использовать в качестве субстрата окисленные жирнокислотные остатки, входящие в состав липидов, что подтверждается тем, что 12-углеродные продукты ГПЛ, связанные с галлактолипидами, были обнаружены в листьях *Arabidopsis thaliana*, капусты, табака, томатов и бобов [5].

ГПЛ относятся к атипичному семейству СУР74 суперсемейства цитохромов Р450 монооксигеназ, которые не нуждаются в НАДФН в качестве донора электронов для ферментативной активности, а используют гидропероксиды жирных кислот и как донор кислорода, и как субстрат [6]. Как и другие СУР74 высших растений, ГПЛ осуществляет гомолитическое расщепление О—О связи гидроперекиси жирной кислоты с образованием алкокси-радикала, который присоединяется к рядом расположенной двойной связи, образуя эпоксиаллильный радикал. Его распад при участии ГПЛ происходит с образованием полуацетала, который спонтанно распадается на альдегид и оксокислоту [7].

При участии 13-ГПЛ из 13-гидропероксида линоленовой кислоты образуются (3Z)-гексеналь и 12-оксо-(9Z)-додеценонная кислота, а из 13-гидропероксида линолевой кислоты вместо (3Z)-гексенала образуется гексеналь [7, 8]. 12-оксо-(9Z)-додеценонная кислота изомеризуется в 12-оксо-(10E)-додеценонную кислоту, именуемую травматином или раневым гормоном. Дальнейшее окисление альдегидной группы приводит к образованию дикарбоновой травматинной кислоты [9]. В растительных тканях были обнаружены несколько изомеров травматина и травматинной кислоты и их производные [10]. Активность 13-ГПЛ также, как и 13-ЛОГ, связана с хлоропластами.

Из 9-гидропероксида линолевой и линоленовой кислот образуются летучие (3Z)-ноненаль и (3Z,6Z)-нонадиеналь, соответственно, и нелетучая 9-оксононановая кислота [11, 12]. 9-ЛОГ/9-ГПЛ путь скорее всего функционирует в цитоплазме.

Цис-3-гексеналь и *цис*-3-ноненаль могут быть изомеризованы с участием 3Z:2E-еналь-изомеразы [13, 14]. Шестиуглеродные альдегиды могут быть восстановлены до соответствующего спирта с участием алкогольдегидрогеназы или редуктазы [15, 16]. Известен также фермент, ацетилирующий спирты с формированием соответствующего сложного эфира [17]. Также нельзя исключать возможное окисление ненасыщенных альдегидов и гидрирование двойной связи. Нужно отметить, что каждая из указанных модификаций альдегида приводит к образованию более летучего продукта. Летучие альдегиды и их производные, так называемые “летучие соединения зеленых листьев” (Green Leaf Volatiles), являются основным компонентом аромата зеленых листьев и фруктов.

Из 20-углеродной арахидоновой кислоты, встречающейся у мхов и грибов, формируются

12-гидроперекиси, из которых могут образоваться 8-углеродные летучие соединения такие, как 1-октен-3-ол, а также их ацетилированные производные [18].

ГПЛ довольно широко распространены в природе. Они были обнаружены у многих, хотя и не у всех растений, при этом растения могут содержать как один, так и несколько ферментов, различающихся по специфичности к субстратам и внутриклеточной локализации [19]. Активность ГПЛ, а также продукты ферментативной активности, были обнаружены во многих пищевых и эфиромасличных культурах (табл. 1, Дополнительные материалы). Конститутивная экспрессия генов ГПЛ способствует быстрому образованию и накоплению продуктов ферментативной реакции в растительных тканях после их повреждения.

Биологические функции оксипинов, образующихся в ГПЛ ветви, до конца не понятны. Для некоторых метаболитов ГПЛ ветви показаны антимикробные свойства [20, 21] и продемонстрирована роль в формировании устойчивости растений к насекомым [22, 23]. Накопление в тканях метаболитов ГПЛ ветви в ответ на абиотические стрессы также было описано [24], однако, неизвестно, связано ли их накопление с адаптацией к стрессовым условиям или является результатом повреждения клеточных структур.

Оксипины могут образовываться и в организме человека из полиненасыщенных жирных кислот растительной пищи. Оксипины могут участвовать во множестве физиологических процессов, включая апоптоз, свертывание крови, болевую реакцию и воспаление [25].

Врожденный иммунитет отвечает за раннюю реакцию организма на чужеродный биоматериал. Компоненты бактериальной клеточной стенки, такие как липополисахарид (ЛПС), стимулируют выработку цитокинов моноцитами и макрофагами. Эти цитокины включают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α), интерлейкин (IL)-1 и IL-6, которые способствуют адгезии нейтрофилов и моноцитов в местах инфекции, за которым следует миграция, местное накопление и активация воспалительных клеток. Клетки воспаления неспецифически распознают бактерии и уничтожают их посредством фагоцитоза и/или продукции АФК. Воспалительные цитокины также обеспечивают связь между воспалительными клетками и специфическим иммунитетом, поскольку они могут стимулировать Т- и В-лимфоциты [26]. С учетом активного использования оксипинов в производстве пищи, необходимо исследовать возможную провоспалительную активность этих молекул. Цель работы — исследовать провоспалительную активность оксипинов в экспериментальной системе, основанной на использовании цельной крови доноров.

Таблица 1. Физико-химические свойства молекул оксипинов и оценка вероятностной биологической активности

Вещество	Молярная масса, г/моль	Растворимость в воде, г/л	Показатель липофильности (lgP)	Площадь полярной поверхности, Å ²	Число вращательных связей	Вероятностная биологическая активность		
						агонист макрофагального колониестимулирующего фактора	противовоспалительная	ингибитор экспрессии TNF-α
3-гексеналь	98.1	5	1.432	17	3	+	—	—
2-гексеналь	98.1	5.3	1.79	17	3	+	—	—
3-гексенол	100.2	16	1.7	20	3	+	—	—
3-гексенилацетат	142.2	0.9	2.415	26	5	+	+	+
Травматиновая кислота	228.3	0.23	2.686	75	10	+	—	+
Октанол	130.2	0.54	3	20	6	+	—	+
1-октенол	128.2	1.84	2.52	20	5	+	—	+
2-ноненаль	140.2	0.093	3.17*	17	6	+	—	—
2-ноненол	142.2	0.62	3.184	20	6	+	—	+
6-ноненаль	140.2	0.2	3.113	17	6	+	—	—
6-ноненол	142.2	0.62	3.014	20	6	+	+	+

Примечание: * — расчетный показатель.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали периферическую кровь условно здоровых доноров 23–35 лет. Образцы крови были предоставлены отделением аллергологии и иммунологии Больницы Пущинского научного центра РАН (БПНЦ РАН). Кровь брали из локтевой вены, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Информированное согласие было подписано всеми донорами.

Определение содержания цитокинов проводили по описанной ранее методике [27]. К клеткам крови добавляли растительные метаболиты, образующиеся в ГПЛ ветви пути биосинтеза оксипинов. В качестве позитивного контроля использовали липополисахарид *E. coli* в конечной концентрации 100 нг/мл. Образцы крови инкубировали 6 ч при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе. После инкубации клетки крови осаждали в течение 10 мин при 1000 об/мин на специализированной центрифуге. Полученные супернатанты отбирали и хранили при температуре –20°C. Методом твердофазного иммуноферментного анализа оценивали содержание в сыворотке крови провоспалительного цитокина TNF-α (АО “Вектор-Бест”, Россия).

Методы фармакоинформатики: для получения информации о физико-химических свой-

ствах оксипинов были использованы ресурсы <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.vcclab.org/lab/alogps> и <http://www.chemspider.com/>. Для поиска возможных клеточных мишеней про- и противовоспалительного действия изучаемых оксипинов была проведена оценка вероятностного профиля биологической активности данных молекул с помощью веб-ресурса PASS Online (<http://www.way2drug.com/passonline>).

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде медианных значений с квартилями (IQR). Достоверность различий между медианными значениями оценивали с помощью U-теста Манна–Уитни и критерия Вилкоксона. Различия медианных значений считались достоверными при уровне значимости $P < 0.05$. Для статистического анализа и графического представления данных использовали программное обеспечение Microsoft Office Excel 2010 (плагин AtteStat), STATISTICA 10.1 и SigmaPlot 12.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предсказание биологической активности оксипинов

Анализ литературных данных и наши собственные исследования показывают, что летучие

метаболиты ГПЛ ветви встречаются во множестве пищевых и эфиромасличных культур, а также в лекарственных растениях (табл. 1, Дополнительные материалы). В табл. 1 представлены основные физико-химические свойства молекул, используемые для предварительной оценки биологической доступности соединений. Показателем липофильности (гидрофобности) служит десятичный логарифм коэффициента распределения (Р) вещества между октанолом и водой. Чем он выше, тем больше накапливается в клеточных мембранах исследуемое вещество, а также тем выше сродство вещества к бычьему сывороточному альбумину [28]. Для большинства лекарственных веществ показатель липофильности находится между -2 и $+5$. Так как показатель липофильности измерен не для всех рассмотренных веществ, для 2-ноненаля приводится расчетный показатель липофильности по ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, Inc.). Площадь полярной поверхности вычисляется как площадь участка молекулы, занимаемая электроотрицательными гетероатомами (O, N, S, P) и связанными с ними атомами водорода. Показано, что для пассивной диффузии сквозь мембраны нужно, чтобы площадь полярной поверхности была не более $140 \text{ \AA}^2$ [29]. Число связей, вокруг которых возможно свободное вращение частей молекулы, служит мерой ее конформационной изменчивости. Большая конформационная изменчивость препятствует диффузии сквозь мембрану и совмещению молекулы с ее мишенью, поэтому считается, что число вращательных связей должно быть не более 10 [29]. У всех исследованных нами веществ величины рассмотренных показателей находятся в пределах, благоприятствующих биологической доступности.

Предсказание биологической активности веществ в PASS Online основано на анализе взаимосвязей структура-активность для обширной обучающей выборки, включающей в себя: субстанции лекарственных препаратов; “кандидаты в препараты”, находящиеся на различных стадиях клинических и доклинических исследований; фармакологические вещества и биохимические реагенты, зонды; вещества, для которых имеется информация о специфической токсичности. Был получен список прогнозируемых типов активности с оценками вероятности наличия каждого вида активности (P_a) и вероятности отсутствия каждого вида активности (P_i). Чем больше для конкретной активности значение P_a , и чем меньше значение P_i , тем больше шанс обнаружить данную активность в эксперименте [30].

Нами были отобраны активности с $P_a > 0.5$. Для всех исследуемых оксипинов была предсказана агонистическая активность по отношению к макрофагальному колониестимулирующему фактору, цитокину, который стимулирует генера-

цию подмножеств миелоидных клеток, включая нейтрофилы, моноциты, макрофаги и дендритные клетки в ответ на стресс, инфекции и раковые заболевания (табл. 1) [31]. Согласно предсказанию, противовоспалительной активностью обладают 3-гексенил-ацетат и 6-ноненол. Показана возможная активность ингибирования экспрессии TNF- α для 3-гексенил-ацетата, октанола, 1-октенола, 6-ноненола и 2-ноненола, а также травминовой кислоты.

Исследование провоспалительной активности оксипинов

Нами была использована экспериментальная система, основанная на использовании цельной крови доноров, для оценки влияния оксипинов на индукцию воспалительных ответов. Конечная концентрация оксипинов в анализируемых образцах составляла 100 мкМ . У большинства шести- и восьмиуглеродных оксипинов не обнаружена провоспалительная активность, так как различия с контролем не достигали статистической значимости (рис. 1).

Заметная наработка провоспалительного цитокина TNF- α наблюдалась в образцах с девятиуглеродными оксипинами (рис. 1). Ответ клеток доноров на активацию этими оксипинами варьировался в широких пределах, что указывает на важную роль других факторов крови в активации провоспалительного ответа на используемые оксипины. Уровень TNF- α был немного выше при использовании спиртов, чем соответствующих альдегидов.

Для выяснения концентрационной зависимости наблюдаемого эффекта мы изучили влияние различных концентраций 6-ноненаля на индукцию синтеза TNF- α в экспериментальной системе. В качестве позитивного контроля был выбран широко известный активатор воспалительного ответа — эндотоксин (липолисахарид, ЛПС) из *E. coli*. Результаты представлены на рис. 2.

При активации клеток крови очень низкой и высокой концентрациями 6-ноненаля наблюдалась наименьшая провоспалительная активность. Концентрация 10 мкМ индуцировала наибольший синтез TNF- α , хотя и наблюдалась значительная индивидуальная вариативность, и различия в эффектах разных концентраций в большинстве случаев были статистически незначимы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологическая активность растительных оксипинов, в том числе метаболитов ГПЛ ветви, в животной клетке была продемонстрирована во множестве работ, подробный обзор которых был опубликован недавно [32]. Среди метаболитов ГПЛ ветви внимание уделялось лишь нелету-

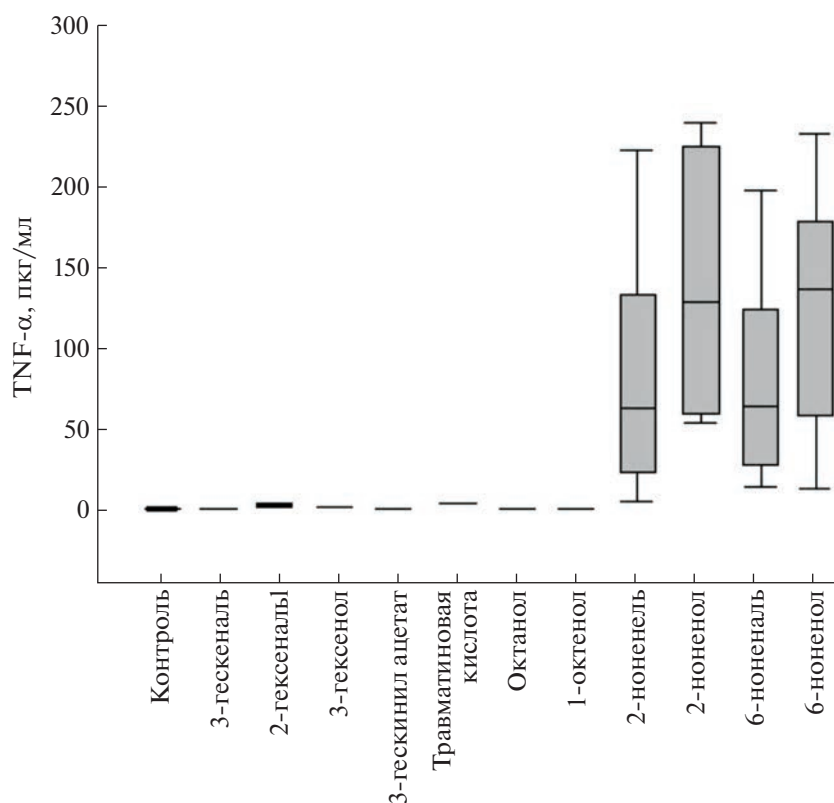


Рис. 1. Изменение синтеза TNF- α клетками крови здоровых доноров в ответ на оксилпины. $n = 3-12$.

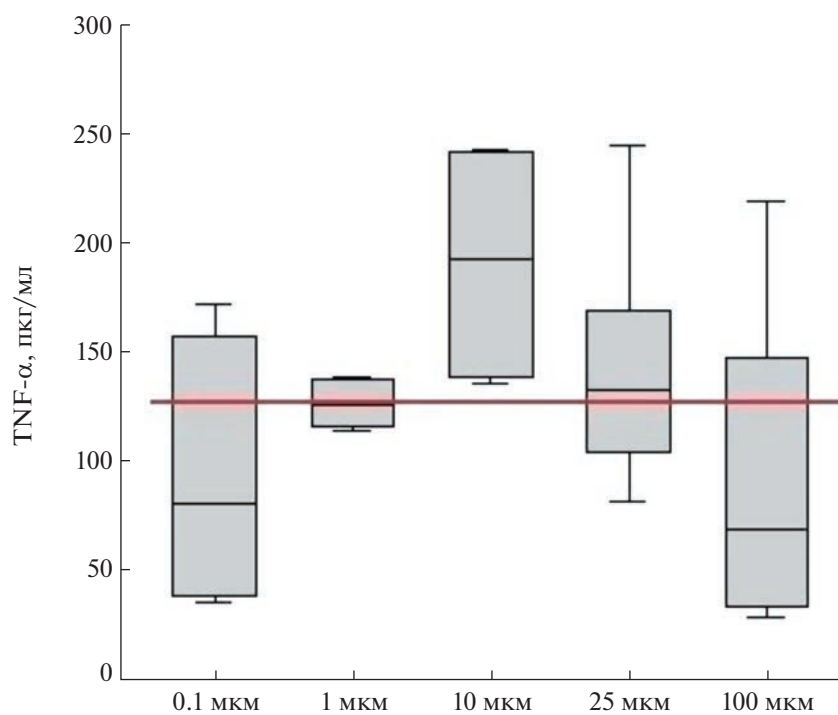


Рис. 2. Изменение синтеза TNF- α клетками крови здоровых доноров в ответ на различные концентрации 6-ноненала. $n = 4-8$. Чертой обозначено среднее значение ответа на липополисахарид *E. coli*.

чей травминовой кислоты. Однако, именно летучие альдегиды и их производные широко используются в пищевой промышленности для придания аромата свежести продуктам и для увеличения их сохранности [33–35]. До настоящего времени их влияние на здоровье человека мало изучено. Вместе с растительной пищей мы потребляем значительное количество альдегидов и спиртов с длиной цепи от 6 до 9 углеродов и их производных, образующихся в ГПЛ ветви пути биосинтеза оксипинов (табл. 1, Дополнительные материалы). Поглощенные с пищей оксипины могут не только воздействовать на клетки кишечника, но также всасываться и циркулировать в плазме крови [36–38]. Поэтому важно оценить влияние этих соединений на здоровье человека. В литературе активно обсуждается способность растительных экстрактов и содержащихся в них оксипинов регулировать иммунную активность клеток крови человека [39, 40]. Несмотря на обнаруженную противовоспалительную активность нескольких оксипинов, в ряде работ показаны провоспалительные свойства полиненасыщенных ω -6 жирных кислот, из которых образуются оксипины [26].

Мы рассмотрели основные физико-химические свойства изучаемых веществ, используемые для предварительной оценки биологической доступности предполагаемых лекарств [28], для того, чтобы выявить возможную связь между химическим строением и биологической активностью исследуемых веществ. У всех веществ величины рассмотренных показателей находятся в пределах, благоприятствующих биологической доступности (табл. 1). Девятиуглеродные спирты и альдегиды отличаются повышенной липофильностью, а следовательно их действие на физиологический процесс может обуславливаться накоплением в липидных мембранах или связыванием с белками плазмы. Именно эти соединения проявили активность в использованной нами экспериментальной системе.

По результатам поиска возможных клеточных мишеней про- и противовоспалительного действия изучаемых оксипинов, спрогнозированный спектр активности получился достаточно обширным. Возможно, в структуре этих довольно простых веществ не содержится каких-либо особенностей, обеспечивающих высокую селективность их биологического действия. Вероятность Ра отражает прежде всего сходство структуры молекул данного вещества со структурами молекул наиболее типичных в соответствующем подмножестве “активных” веществ в обучающей выборке. Поэтому никакой прямой корреляции значений Ра с количественными характеристиками активности, как правило, нет [30]. К результатам такого прогноза необходимо относиться с большой осторожностью.

Шестиуглеродные оксипины часто встречаются в пищевых продуктах (см. табл. 1, Дополнительные материалы). Экспериментальная оценка их провоспалительной активности показала, что они не активируют клетки крови к выработке значительного количества провоспалительного цитокина TNF- α , тогда как девятиуглеродные оксипины являются в значительной степени иммуногенными. При попадании в кровь девятиуглеродные оксипины индуцируют значительную выработку провоспалительного цитокина TNF- α , тем самым запуская возможное развитие воспалительного ответа. Девятиуглеродные альдегиды активировали синтез TNF- α в меньшей степени, чем спирты. В парах 6-ноненол/2-ноненаль и 6-ноненаль/2-ноненаль провоспалительная активность очень близка, что свидетельствует о том, что положение двойной связи в молекуле не сказывается на его провоспалительных свойствах. Результаты показывают, что для проявления иммуномодулирующей активности оксипина имеет значение как длина углеродной цепи, так и наличие функциональной группы (гидроксильная или альдегидная). Девятиуглеродные оксипины были обнаружены в огурце, арбузе, семенах миндаля и некоторых лекарственных растениях. Данные о провоспалительной активности этих соединений, полученные в нашей работе, могут быть полезны для разработки диетологических рекомендаций для людей, страдающих воспалительными заболеваниями.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 22-24-00489.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liavonchanka A., Feussner I. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis // J. Plant Physiol. 2006. V. 163. P. 348.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.006>
2. Andreou A., Feussner I. Lipoxygenases - structure and reaction mechanism // Phytochem. 2009. V. 70. P. 1504.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.008>
3. Brash A.R., Ingram C.D., Harris T.M. Analysis of a specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 5465.
<https://doi.org/10.1021/bi00391a038>
4. Leon J., Royo J., Vancanneyt G., Sanz C., Silkowski H., Griffiths G., Sanchez-Serrano J.J. Lipoxygenase H1 gene silencing reveals a specific role in supplying fatty acid hydroperoxides for aliphatic aldehyde production // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 416.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M107763200>
5. Nakashima A., von Reuss S.H., Tasaka H., Nomura M., Mochizuki S., Iijima Y., Aoki K., Shibata D., Boland W.,

- Takabayashi J., Matsui K.* Traumatins- and Dinortraumatins-containing Galactolipids in Arabidopsis: their formation in tissue-disrupted leaves as counterparts of green leaf volatiles // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 26078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.487959>
6. *Lee D.S., Nioche P., Hamberg M., Raman C.S.* Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes // *Nature*. 2008. V. 455. P. 363. <https://doi.org/10.1038/nature07307>
 7. *Grechkin A.N., Hamberg M.* The “heterolytic hydroperoxide lyase” is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1636. P. 47. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2003.12.003>
 8. *Matsui K., Kurishita S., Hisamitsu A., Kajiura T.* A lipid-hydrolysing activity involved in hexenal formation // *Biochem. Soc. Trans.* 2000. V. 28. P. 857.
 9. *Zimmerman D.C., Coudron C.A.* Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid // *Plant Physiol.* 1979. V. 63. P. 536. <https://doi.org/10.1104/pp.63.3.536>
 10. *Kallenbach G., Gildardi P.A., Allmann S., Baldwin I.T., Bonaventure G.* C12 derivatives of the hydroperoxide lyase pathway are produced by product recycling through lipoxygenase-2 in *Nicotiana attenuata* leaves // *New Phytol.* 2011. V. 191. P. 1054. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03767.x>
 11. *Stumpe M., Bode J., Göbel C., Wichard T., Schaaf A., Frank W., Frank M., Reski R., Pohnert G., Feussner I.* Biosynthesis of C9-aldehydes in the moss *Physcomitrella patens* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. V. 1761. P. 301. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2006.03.008>
 12. *Tijet N., Schneider C., Muller B.L., Brash A.R.* Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids // *Arch Biochem Biophys.* 2001. V. 386. P. 281. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2218>
 13. *Noordermeer M.A., Veldink G.A., Vliegthart J.F.G.* Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z:2E-enal isomerase // *FEBS Lett.* 1999. V. 443. P. 201. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01706-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01706-2)
 14. *Kunishima M., Yamauchi Y., Mizutani M., Kuse M., Takikawa H., Sugimoto Y.* Identification of (Z)-3-(E)-2-hexenal isomerases essential to the production of the leaf aldehyde in plants // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 14023. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.726687>
 15. *Bate N.J., Riley J.C.M., Thompson J.E., Rothstein S.J.* Quantitative and qualitative differences in C6-volatile production from the lipoxygenase pathway in an alcohol dehydrogenase mutant of *Arabidopsis thaliana* // *Physiol. Plant.* 1998. V. 104. P. 97. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040113.x>
 16. *Tanaka T., Ikeda A., Shiojiri K., Ozawa R., Shiki K., Nagai-Kunihiro N., Fujita K., Sugimoto K., Yamato K.T., Dohra H., Ohnishi T., Koeduka T., Matsui K.* Identification of a hexenal reductase that modulates the composition of green leaf volatiles // *Plant Physiol.* 2018. V. 178. P. 552. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00632>
 17. *D'Auria J.C., Pichersky E., Schaub A., Hansel A., Gershenzon J.* Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2007. V. 49. P. 194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02946.x>
 18. *Kihara H., Tanaka M., Yamato K.T., Horibata A., Yamada A., Kita S., Ishizaki K., Kajikawa M., Fukuzawa H., Kohchi T., Akakabe Y., Matsui K.* Arachidonic acid-dependent carbon-eight volatile synthesis from wounded liverwort (*Marchantia polymorpha*) // *Phytochemistry*. 2014. V. 107. P. 42. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.008>
 19. *Noordermeer M.A., Van Dijken A.J., Smeekens S.C., Veldink G.A., Vliegthart J.F.* Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 2473. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01283.x>
 20. *Matsui K., Minami A., Hornung E., Shibata H., Kishimoto K., Ahnert V., Kindl H., Kajiura T., Feussner I.* Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. P. 649. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.006>
 21. *Prost I., Dhondt S., Rothe G., Vicente J., Rodriguez M.J., Kift N., Carbonne F., Griffiths G., Esquerré-Tugayé M.-Th., Rosahl S., Castresana C., Hamberg M., Fournier J.* Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens // *Plant Physiol.* 2005. V. 139. P. 1902. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066274>
 22. *Matsui K.* Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. V. 9. P. 274. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.002>
 23. *Savchenko T., Pearse I.S., Ignatia L., Karban R., Dehesh K.* Insect herbivores selectively suppress the HPL branch of the oxylipin pathway in host plants // *Plant J.* 2013. V. 73. P. 653. <https://doi.org/10.1111/tpj.12064>
 24. *Loreto F., Barta C., Brilli F., Nogues I.* On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature // *Plant Cell Environ.* 2006. V. 29. P. 1820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01561.x>
 25. *Шупелин В.А., Сидорова Ю.С.* Оксипилены — биологически активные вещества пищи // *Вопросы питания*. 2020. Т. 89. С.16 <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10073>
 26. *Thies F., Miles E.A., Nebe-von-Caron G., Powell J.R., Hurst T.L., Newsholme E.A., Calder P.C.* Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults // *Lipids*. 2001. V. 36. P. 1183. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0831-4>
 27. *Radzyukevich Y.V., Kosyakova N.I., Prokhorenko I.R.* Synergistic effect of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen and *Escherichia coli* lipopolysaccharide on hu-

- man blood cells // PloS One. 2018. V. 13:e0207311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207311>
28. Barret R. Medicinal Chemistry: fundamentals. Elsevier. 2018. 172 p.
 29. Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.-Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates // J. Med. Chem. 2002. V. 45. P. 2615. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
 30. Филимонов Д.А., Лагунин А.А., Глориозова Т.А., Рудик А.В., Дружиловский Д.С., Погодин П.В., Поройко В.В. Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS ONLINE // Химия гетероциклических соединений. 2014. Т. 3. С. 483.
 31. Kumar A., Taghi Khani A., Sanchez Ortiz A., Swaminathan S. GM-CSF: a double-edged sword in cancer immunotherapy // Front. Immunol. 2022. V. 13. P. 901277. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.901277>
 32. Savchenko T., Degtyaryov E., Radzyukovich Y., Buryak V. Therapeutic potential of plant oxylipins // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 14627. <https://doi.org/10.3390/ijms232314627>
 33. Lehtonen M., Kekäläinen S., Nikkilä I., Kilpeläinen P., Tenkanen M., Mikkonen K.S. Active food packaging through controlled in situ production and release of hexanal // Food Chem.: X. 2020. V. 5. P. 100074. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100074>
 34. Mussinan C.J., Mookherjee B.D., Vock M.H., Schmitt F.L., Granda E.J., Vinals J.F., Kiwala J. Flavoring with a mixture of *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal, *cis*-3-hexenyl formate, *cis*-3-hexenol and *cis*-3-hexenyl-*cis*-3-hexenoate. US Patent № 4241098. 1979.
 35. Vincenti S., Mariani M., Alberti J.-C., Jacopini S., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Berti L., Maury J. Biocatalytic synthesis of natural green leaf volatiles using the lipoxygenase metabolic pathway // Catalysts. 2019. V. 9. P. 873. <https://doi.org/10.3390/catal9100873>
 36. Karg K., Dirsch V.M., Vollmar A.M., Cracowski J.L., Laporte F., Mueller M.J. Biologically active oxidized lipids (phytoprostanes) in the plant diet and parenteral lipid nutrition // Free Radic. Res. 2007. V. 41. P. 25. <https://doi.org/10.1080/10715760600939734>
 37. Larsson K., Harrysson H., Havenaar R., Alming M., Undeland I. Formation of malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in fish and fish oil during dynamic gastrointestinal *in vitro* digestion // Food Funct. 2016. V. 7. P. 1176. <https://doi.org/10.1039/c5fo01401h>
 38. Goicoechea E., Brandon E.F., Blokland M.H., Guillén M.D. Fate in digestion *in vitro* of several food components, including some toxic compounds coming from omega-3 and omega-6 lipids // Food Chem. Toxicol. 2011. V. 49. P. 115. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.005>
 39. Salem M.L. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed // Int. Immunopharmacol. 2005. V. 5. P. 1749. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.06.008>
 40. Block K.I., Mead M.N. Immune system effects of echinacea, ginseng, and astragalus: a review // Integr. Cancer Ther. 2003. V. 2. P. 247. <https://doi.org/10.1177/1534735403256419>