

Эффекты линоленовой кислоты и ее гидроксамового производного на 5-липоксигеназу

Л. Б. Бондаренко*, С. А. Огий, И. А. Бутович

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
253660 Киев, ул. Мурманская, 1

В экспериментах с использованием мицеллярной системы in vitro было проведено сравнительное изучение влияния линолевой и линоленовой кислот, а также их гидроксаматов на 5-липоксигеназу из клубней картофеля. Установлено, что меньшая по сравнению с линолевой кислотой эффективность линоленовой кислоты в качестве субстрата 5-липоксигеназы коррелирует с меньшим относительно линолеат-гидроксамовой кислоты ингибирующим влиянием линолеат-гидроксамовой кислоты на данный фермент. При этом эффект исследуемых соединений зависит от pH среды и концентрации субстрата.

Введение. 5-Липоксигеназа — ключевой фермент биосинтеза лейкотриенов [1]. Учитывая тот факт, что они являются основными медиаторами ряда заболеваний, включая астму, артриты, псориаз, ишемическую болезнь сердца, поиск путей подавления активности этого фермента представляет собой перспективное направление для терапевтического лечения названных патологий. В настоящее время обнаружено несколько классов ингибиторов липоксигеназ [1]. В частности, способность подавлять активность 5-липоксигеназы обнаруживает ряд соединений, содержащих гидроксамовые группы [2]. Показано, что гидроксамовые производные арахидоновой кислоты, представляющей собой естественный субстрат 5-липоксигеназы, а также ряда ее аналогов являются конкурентными ингибиторами этого фермента в клетках RBL-1 [1]. Однако арахидоновая кислота — не единственный субстрат для данного фермента. Установлено, что наличие пентадиенильного фрагмента абсолютно необходимо для проявления 5-липоксигеназной активности, тогда как длина жирнокислотной цепи (от C18 до C22) может варьировать [1]. Линолевая кислота наряду с арахидоновой также является естественным субстратом липоксигеназ растительного и животного происхождения [1, 3, 4]. Нами был получен гидроксамат линолевой кислоты, показана его способность ингибировать активность липоксигеназ *in vitro* [5] и подавлять биосинтез лейкотриенов *in vivo* [6]. Зная, что и линоленовая кислота может окисляться 5-липоксигеназой в условиях *in vitro*, представляло интерес выяснить, в какой мере свойства линоленовой кислоты как субстрата коррелируют со способностью ее гидроксамового производного ингибировать активность данного фермента (по сравнению с ранее изученными линолевой кислотой и гидроксаматом линолевой кислоты [5]). В

*Correspondence address.

связи с этим задача настоящего исследования состояла в сравнительном изучении в мицеллярной системе *in vitro* влияния линолевой и линоленовой кислот, а также их гидроksamатов на 5-липoxигеназу из клубней картофеля.

Материалы и методы. 5-Липoxигеназу из клубней картофеля выделяли с использованием фракционного высаливания сульфатом аммония (до 60 %) и диализа с последующей очисткой фермента с помощью ДЭАЭ-хроматографии и хроматофокусирования [5].

В работе использовали неорганические реагенты марки х. ч., бидистиллированную воду, линолевую кислоту (ЛК), линоленовую кислоту (ЛнК) и Lubrol PX («Sigma», США).

Гидроksamовые производные жирных кислот синтезированы в реакции метиловых эфиров соответствующих жирных кислот с гидроксиламином по методу [7]. Кинетические исследования проводили на Ultrospec-II («LKB», Швеция) и Specord M40 («Carl Zeiss», ФРГ). Реакцию осуществляли в термостатируемой ячейке при температуре 25 °С и ее ход регистрировали по повышению оптической плотности реакционной смеси при 235 нм, что соответствует максимуму поглощения продукта реакции 9-гидропероксида ЛК [8, 9]. Запускали реакцию добавлением фермента. Стандартная реакционная смесь для определения влияния концентрации ЛК или ЛнК на активность фермента (общим объемом 2,5 мл) содержала 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 6,3, 0,02 % Lubrol PX и различные концентрации жирных кислот в диапазоне 0—250 мкМ. Для определения зависимости степени ингибирования 5-липoxигеназы гидроksamатом ЛнК от количества субстрата в аналогичную смесь добавляли 25—250 мкМ ЛК и 40 мкМ гидроksamат. При изучении влияния pH среды на ингибирующий эффект гидроksamата ЛнК реакционная смесь содержала 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 4,0—6,0, или 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 6,0—8,0, 0,02 % Lubrol PX, 100 мкМ ЛК и 40 мкМ гидроksamат. Аналогичную реакционную смесь использовали и при анализе влияния различных значений pH на активность фермента при введении данных жирных кислот (но с 100 мкМ ЛК или ЛнК и без добавления гидроksamата). Стандартная реакционная смесь для определения влияния различных доз гидроksamатов ЛК или ЛнК на активность фермента содержала 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 6,3, 0,02 % Lubrol PX, 100 мкМ ЛК и гидроksamовые производные жирных кислот в различных концентрациях. При построении графиков использовали усредненные величины активности фермента, определенные из 2—3 измерений (разброс величин не превышал 5 %).

Результаты и обсуждение. Результаты изучения субстратных зависимостей для ЛК и ЛнК и влияния различных концентраций ЛК (в качестве субстрата) на ингибирующий эффект линоленат-гидроksamовой кислоты представлены на рис. 1. Из приведенных данных видно, что ЛнК окисляется

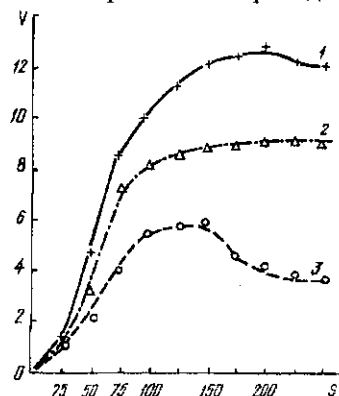


Рис. 1. Влияние различных концентраций жирных кислот на активность 5-липoxигеназы и ингибирующий эффект линоленат-гидроksamовой кислоты (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 6,3, 0,02 % Lubrol PX и 100 мкМ ЛК или 100 мкМ ЛнК, 40 мкМ гидроksamат линоленовой кислоты; V — скорость реакции, 10^{-4} мол. прод. \times $\text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$; S — концентрация субстрата, мкМ): 1 — зависимость для ЛК; 2 — зависимость для ЛнК; 3 — зависимость для гидроksamата ЛнК (с ЛК в качестве субстрата)

5-липоксигеназой менее эффективно, чем линолевая кислота. При этом раньше достигается насыщение субстратом, и в дальнейшем с увеличением концентрации субстрата скорость ферментативной реакции существенно не возрастает, а при 250 мкМ ЛнК — снижается. Таким образом, как и в случае ЛК, здесь отмечается ингибирование ферментативной реакции избытком субстрата [10].

Изучение зависимости ингибирующего эффекта линоленат-гидроксамовой кислоты от концентрации субстрата показало, что степень ингибирования возрастает с увеличением количества ЛК. Особенно это заметно в диапазоне концентраций 150—250 мкМ ЛК. Подобное усиление ингибирующего эффекта по мере возрастания концентрации субстрата, возможно, объясняется суммированием действия гидроксамата с ингибированием фермента субстратом [10].

Исследование влияния pH-среды на эффекты изучаемых соединений продемонстрировало (рис. 2), что отклонение значений pH от оптимальных

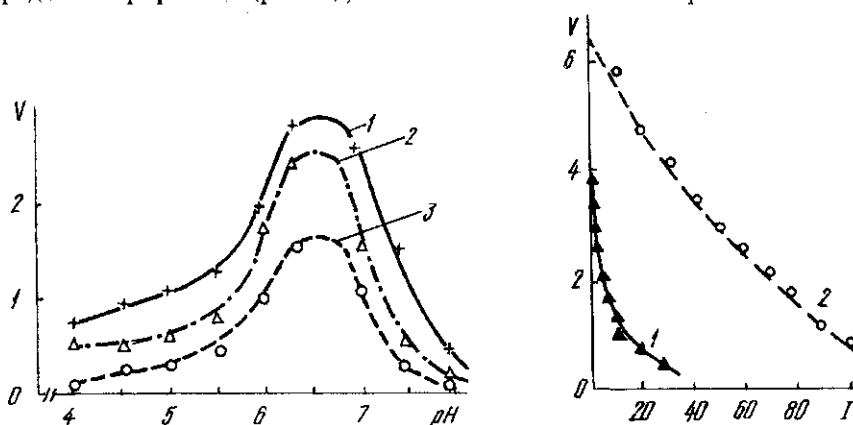


Рис. 2. Влияние различных значений pH среды на эффект жирных кислот и гидроксамового производного линоленовой кислоты на активность 5-липоксигеназы (0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 4,0—6,00 или 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 6,0—8,0, 0,02 % Lubrol PX, 100 мкМ ЛК или ЛнК и 40 мкМ гидроксамат линоленовой кислоты; V — скорость реакции, 10^4 мол. прод. · мин⁻¹ · мг белка⁻¹): 1 — зависимость для ЛК; 2 — зависимость для ЛнК; 3 — зависимость для гидроксамата ЛнК (с ЛК в качестве субстрата)

Рис. 3. Влияние различных доз гидроксамовых производных жирных кислот на активность 5-липоксигеназы (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 6,3, 0,02 % Lubrol PX, 100 мкМ ЛК; V — скорость реакции, 10^4 мол. прод. · мин⁻¹ · мг белка⁻¹; I — концентрация ингибитора, мкМ): 1 — зависимость для линолеат-гидроксамовой кислоты; 2 — зависимость для линоленат-гидроксамовой кислоты

для 5-липоксигеназы (pH 6,3) в кислую или щелочную области приводило к усилению ингибирующего действия линоленат-гидроксамовой кислоты так же, как это было отмечено ранее для линолеат-гидроксамовой кислоты [5]. Использование ЛнК в качестве субстрата (вместо линолевой) не изменяло оптимума pH и характера кривой pH-зависимости. В диапазоне значений pH 4,0—8,0 скорость ферментативной реакции с ЛнК в качестве субстрата постоянно была ниже, чем в случае использования ЛК. Наименее эффективно (по сравнению с ЛК) ЛнК окислялась 5-липоксигеназой в щелочной области (pH 7,0—8,0).

Анализ зависимости ингибирующего эффекта линоленат-гидроксамовой кислоты от ее дозы при близких к оптимуму значениях pH и концентрации субстрата показал, что в диапазоне концентраций 0—100 мкМ степень ингибирования возрастает пропорционально увеличению дозы ингибитора

(рис. 3). При этом IC_{50} линоленат-гидроксамовой кислоты составляет около 45 мкМ. Сравнение полученных результатов с эффектом гидроксамата ЛК позволяет заключить, что производное ЛнК — более слабый ингибитор 5-липоксигеназы.

Таким образом в экспериментах с использованием мицеллярной системы *in vitro* было показано, что меньшая по сравнению с ЛК эффективность ЛнК в качестве субстрата 5-липоксигеназы коррелирует с меньшим относительно линолеат-гидроксамовой кислоты ингибирующим влиянием линоленат-гидроксамовой кислоты на данный фермент.

Л. Б. Бондаренко, С. О. Огий, І. А. Бутович

Ефекти ліноленової кислоти та її гідроксамового похідного на 5-ліпоксигеназу

Резюме

В експериментах з використанням мицеллярної системи in vitro було здійснено порівняльне вивчення впливу лінолевої та ліноленової кислот, а також їх гідроксамових похідних на 5-ліпоксигеназу з бульб картоплі. Встановлено, що менша порівняно з лінолевою кислотою ефективність ліноленової кислоти як субстрату 5-ліпоксигенази корелює з меншим відносно лінолеат-гідроксамової кислоти інгібуючим впливом ліноленат-гідроксамової кислоти на даний фермент. При цьому ефект досліджуваних сполук залежав від рН середовища і концентрації субстрату.

L. B. Bondarenko, S. A. Ohiy, I. A. Butovich

Effect of linolenic acid and its hydroxamic derivative on 5-lipoxygenase

Summary

In experiments with micellar in vitro system comparative study of linoleic and linolenic acids and also their hydroxamic derivatives effects on 5-lipoxygenase from potato tubers was carried out. It was shown that less effectiveness of linolenic acid as substrate of 5-lipoxygenase (in comparison with linoleic acid) correlated with less inhibitory effect of linolenate hydroxamic acid (in comparison with linoleate hydroxamic acid) on this enzyme. Effects of investigated compounds depended on pH and substrate concentrations.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Rokach J. Leukotrienes and lipoxygenases.—Amsterdam: Elsevier, 1989.—518 p.
2. Summers J. B., Kim K. H. et al. Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase: quantitative structure-activity relationships // J. Med. Chem.—1990.—33.—P. 992—998.
3. Hansson G., Malmsten C., Radmark O. Prostaglandins and related substances / Eds C. R. Pace-Asciak, E. Granstrom.—Amsterdam: Elsevier, 1983.—P. 127—169.
4. Pagan D. G., Goldman D.W., Goetzl E. J. The leukotrienes / Eds L. W. Chakrin, D. M. Bailey.— New York; London: Acad. press, 1984.—P. 231—245.
5. Бутович І. А., Харченко О. В., Бондаренко Л. Б. и др. Линолеат-гидроксамовая кислота — ингибитор 5-липоксигеназы // Биохимия.—1994.—59, № 6.—С. 808—812.
6. Butovich I. A., Kharchenko O. V., Kukhar V. P., Moibenko A. A. Kinetic scheme inhibition of lipoxygenase from porcine leukocytes by linoleyl-hydroxamic acid // Abstr. 1st Int. Congr. of ISSFAL.—Lugano; Milan, 1993.—P. 94.
7. Кухарь В. П., Бутович І. А. Синтез и исследование простагландинов // Тез. докл. IV Всесоюз. конф.— Минск, 1989.—С. 110.
8. Holman P. T., Bergstrom F. The enzymes / Ed. B. Sumner.— New York; London: Acad. press, 1954.—Vol. 2, pt 1.—P. 559—580.
9. Бутович І. А., Паршикова Т. В., Бабенко В. М. и др. Регуляторная роль фосфолипидов в реакции окисления линолевой кислоты 5-липоксигеназой // Биол. мембраны.—1992.—9.—С. 611—616.
10. Бутович І. А., Кухарь В. П. 5-Липоксигеназа картофеля. Кинетика окисления линолевой кислоты // Укр. биохим. журн.—1989.—61, № 2.—С. 106—108.