

## Гидроксамовые производные насыщенных жирных кислот как ингибиторы 5-липоксигеназы

Л. Б. Бондаренко\*, С. А. Огий, В. Н. Цернюк, И. А. Бутович

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

---

*В результате проведенных в условиях in vitro исследований показана способность гидроксамовых производных стеариновой, пальмитиновой и каприловой кислот ингибировать активность 5-липоксигеназы из клубней картофеля. При этом их эффект зависел от pH среды и концентрации субстрата и не зависел от времени предынкубации ингибитора с ферментом. Наиболее сильным ингибитором из изученных соединений оказался гидроксамат стеариновой кислоты. Укорочение углеродной цепи жирнокислотного остатка приводило к резкому снижению ингибирующего эффекта.*

---

**Введение.** Продукты окисления арахидоновой кислоты липоксигеназами являются медиаторами воспалительных и аллергических реакций в организме [1]. Данные соединения способны оказывать сильное влияние в исчезающе малых концентрациях. Поэтому при лечении таких заболеваний, как астма, ишемическая болезнь сердца, разного рода аллергии, для снятия нежелательных симптомов перспективно использование в качестве лекарственных средств ингибиторов липоксигеназ. В настоящее время накоплен большой массив экспериментальных данных, посвященных данной проблеме [1]. Это и ингибиторы естественного происхождения, и синтетические препараты. Особое внимание было уделено изучению в качестве ингибиторов липоксигеназ аналогов их субстратов и продуктов реакций. Одним из направлений поиска в данной области явилось получение синтетических производных ненасыщенных жирных кислот, содержащих группы, способные образовывать хелатные комплексы с  $Fe^{3+}$  в активном центре фермента (в частности, гидроксамовые группы) [1]. Было показано, что гидроксамовые производные арахидоновой кислоты и ряда ее аналогов являются конкурентными ингибиторами 5-липоксигеназы в клетках RBL-1 [1]. Ингибировал 5-липоксигеназу и тиогидроксамат арахидоновой кислоты. Кроме того, нами ранее было показано, что и гидроксамат линолевой кислоты ингибирует 5-липоксигеназу *in vitro* [2] и снижает биосинтез лейкотриенов *in vivo* [3]. Однако поиск ингибиторов на основе гидроксамовых производных жирных кислот систематически не проводился. В связи с этим результаты носят разрозненный характер и не ясно, какое влияние на биологическую активность данных соединений оказывает химическая структура самого жирнокислотного остатка. Задачей настоящего исследования явилось выявление зависимости степени выраженности ингибирующего эффекта

---

\*Correspondence address.

гидроксаматов от длины цепи жирнокислотного остатка (при отсутствии двойных связей). Исходя из этого нами были синтезированы гидроксаматы стеариновой (С-18), пальмитиновой (С-16) и каприловой (С-7) кислот и изучено их воздействие на активность 5-липоксигеназы из клубней картофеля.

**Материалы и методы.** 5-Липоксигеназу из клубней картофеля выделяли с использованием фракционного высаливания сульфатом аммония (до 60 %) и диализа с последующей очисткой фермента с помощью ДЭАЭ-хроматографии и хроматофокусирования [2].

В работе использовались неорганические реагенты марки х. ч., бидистиллированная вода, линолевая кислота и Lubrol PX («Sigma», США).

Гидроксамовые производные жирных кислот синтезированы в реакции метиловых эфиров соответствующих жирных кислот с гидроксиламином по методу [4]. Кинетические исследования проводили на Ultrospec-II («LKB», Швеция) и Specord M40 («Carl Zeiss», ФРГ). Реакцию осуществляли в термостатируемой ячейке при 25 °С и ее ход регистрировали по повышению оптической плотности реакционной смеси при 235 нм, что соответствует максимуму поглощения продукта реакции 9-гидропероксида линолевой кислоты [5, 6]. Реакцию запускали добавлением фермента (за исключением временной зависимости, где добавляли субстрат). Стандартная реакционная смесь для определения влияния времени инкубации на ингибирующий эффект гидроксаматов (общим объемом 2,5 мл) содержала 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 6,3; 0,02 % Lubrol PX, 100 мкМ линолевою кислоту (ЛК) и 10 мкМ гидроксамат пальмитиновой кислоты (ПГК) или 100 мкМ гидроксамат стеариновой (СГК) либо 100 мкМ гидроксамат каприловой (КГК) кислот. Аналогичную реакционную смесь использовали и при изучении влияния различных доз данных соединений на активность фермента (но с различными количествами ЛК и ПГК, СГК, КГК или соответствующих жирных кислот); для определения зависимости степени ингибирования 5-липоксигеназы от количества субстрата добавляли 25—250 мкМ ЛК при тех же количествах гидроксаматов, что и в случае временной зависимости. При изучении влияния рН среды на ингибирующий эффект гидроксаматов реакционная смесь содержала 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 4,0—6,0, или 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 6,0—8,0, 0,02 % Lubrol PX, 100 мкМ ЛК и 10 мкМ ПГК, или 100 мкМ СГК либо 100 мкМ КГК. При построении графиков использовали усредненные величины активности фермента, определенные по 2—3 измерениям (разброс величин не более 5 %).

**Результаты и обсуждение.** В предварительных экспериментах нами было показано, что в диапазоне концентраций 20—60 мкМ пальмитиновая и стеариновая кислоты оказывали на 5-липоксигеназу незначительный активирующий эффект, а каприловая кислота в диапазоне концентраций

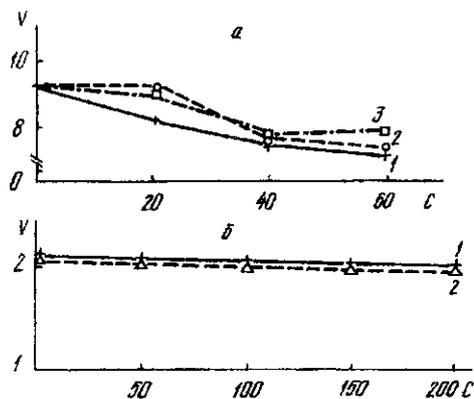


Рис. 1. Влияние жирных кислот на активность 5-липоксигеназы (0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 6,3, 0,02 % Lubrol PX, 100 мкМ ЛК); V — скорость реакции,  $10^{-4}$  мол. прод.  $\times$   $\text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$ ; C — концентрация жирной кислоты, мкМ; а — 1 — контроль (с растворителем); 2 — пальмитиновая кислота; 3 — стеариновая кислота; б — 1 — контроль (с растворителем); 2 — каприловая кислота

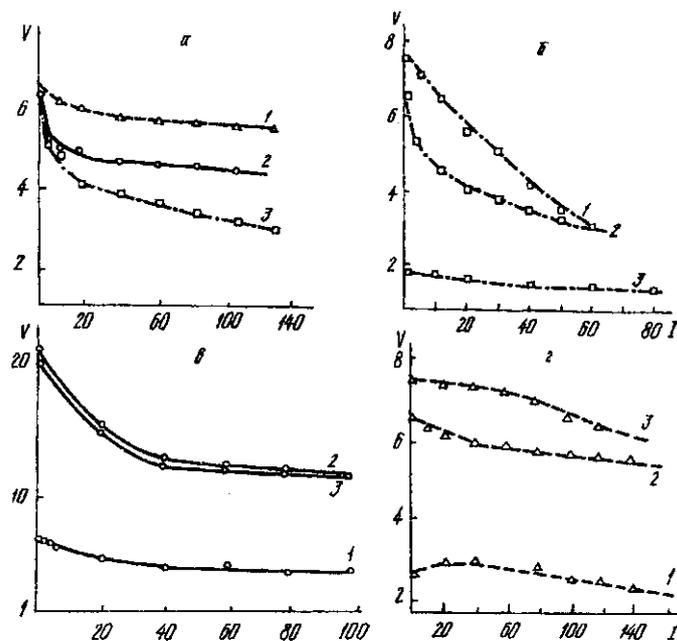


Рис. 2. Влияние различных доз гидроксамовых производных жирных кислот на активность 5-липоксигеназы (0,1 M Na-фосфатный буфер, pH 6,3, 0,02 % Lubrol PX; V — скорость реакции,  $10^{-4}$  мол. прод. · мин<sup>-1</sup> · мг белка<sup>-1</sup>; I — концентрация ингибитора, мкМ): а (в присутствии 100 мкМ ЛК) — 1—КГК; 2—ПГК; 3—СГК; б (СГК) — 1, 2, 3—зависимости для 150, 100 и 50 мкМ ЛК соответственно; в (ПГК) — 1, 2, 3—зависимости для 100, 250 и 350 мкМ ЛК соответственно; г (КГК) — 1, 2, 3—зависимости для 50, 100 и 150 мкМ ЛК соответственно

50—200 мкМ не влияла на активность фермента (рис. 1, а, б).

Из результатов, представленных на рис. 2, а, видно, что из всех изученных нами соединений наиболее эффективным ингибитором явилась СГК (при концентрации субстрата 100 мкМ  $IC_{50}$  составляло 90 мкМ). ПГК (с углеродной цепью короче всего на 2 атома) в концентрации 100 мкМ при той же концентрации субстрата снижала активность 5-липоксигеназы всего в 1,38 раза (т. е. на 27,4 %). КГК (с углеродной цепью вдвое короче) в концентрации 200 мкМ снижала активность фермента только в 1,18 раза (т. е. на 15,4 %).

Было также исследовано влияние различных концентраций субстрата на характер дозовых зависимостей всех трех производных (рис. 2, б—г). Данные рис. 2, б, показывают, что характер дозовых зависимостей СГК существенно изменяется при возрастании концентрации субстрата, однако  $IC_{50}$  при этом и для 100 мкМ, и для 150 мкМ субстрата составляло 90 мкМ, тогда как характер кривой при 50 мкМ ЛК не позволяет провести его точное определение. В случае ПГК не наблюдалось изменения характера самих кривых дозовых зависимостей, но графики для 250 и 350 мкМ субстрата были сближены (рис. 2, в). Наконец, значения кривых дозовых зависимостей для КГК, так же как и в случае СГК, изменяются при возрастании концентрации ЛК от 50 до 150 мкМ.

Обработка полученных результатов по методам Лайнуивера — Бэрка и Диксона [7] свидетельствует о том, что наиболее вероятным в случае всех трех гидроксамовых производных насыщенных жирных кислот является смешанный тип ингибирования.

Дальнейшее изучение зависимости ингибирующих эффектов гидрокса-

мовых производных от концентрации субстрата показало, что для гидроксамата стеариновой и каприловой кислот степень ингибирования возрастает с увеличением концентрации ЛК, а для производного пальмитиновой кислоты, помимо этого, сильный ингибирующий эффект отмечен и при ее низких (25—50 мкМ) концентрациях (рис. 3). Подобное усиление ингибирующего эффекта по мере роста концентрации субстрата, возможно, обусловлено суммированием действия гидроксаматов с ингибированием фермента высокими концентрациями субстрата [8].

Была проанализирована зависимость влияния гидроксамовых производных стеариновой, пальмитиновой и каприловой кислот от времени их предынкубации с ферментом и показано отсутствие существенного воздействия данного параметра на ингибирующий эффект исследуемых соединений.

Отклонение значений рН-среды реакционной смеси от оптимальных для

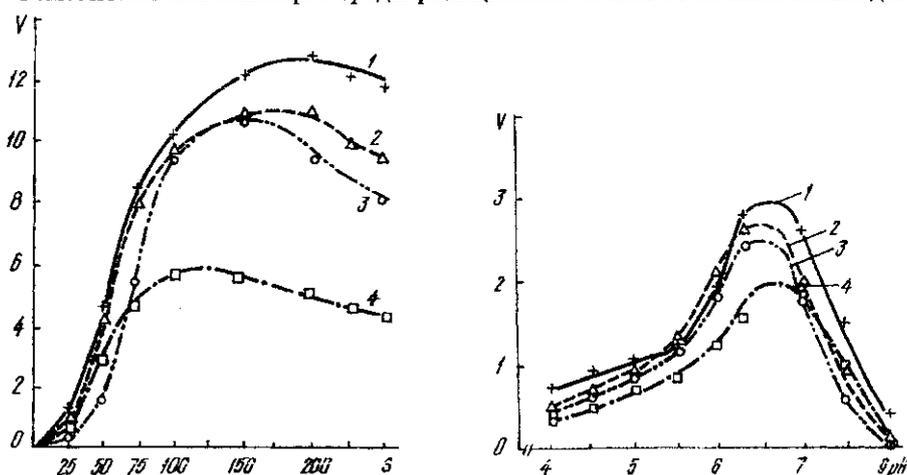


Рис. 3. Влияние различных концентраций субстрата (ЛК) на ингибирование гидроксамовыми производными жирных кислот активности 5-липоксигеназы (0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 6,3, 0,02 % Lubrol PX и 100 мкМ КГК или 100 мкМ СГК, или 10 мкМ ПКГ; V — скорость,  $10^{-4}$  мол. прод. · мин<sup>-1</sup> · мг белка<sup>-1</sup>; S — концентрация субстрата, мкМ): 1 — контроль (с растворителем); 2 — 100 мкМ КГК; 3 — 10 мкМ ПКГ; 4 — 100 мкМ СГК

Рис. 4. Влияние различных значений рН среды на ингибирование гидроксамовыми производными жирных кислот активности 5-липоксигеназы (0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 4,0—6,0, или 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 6,0—8,0, 0,02 % Lubrol PX, 100 мкМ ЛК и 100 мкМ КГК, или 100 мкМ СГК, или 10 мкМ ПКГ; V — скорость,  $10^{-4}$  мол. прод. · мин<sup>-1</sup> · мг белка<sup>-1</sup>): 1 — контроль (с растворителем); 2 — 100 мкМ КГК; 3 — 10 мкМ ПКГ; 4 — 100 мкМ СГК

данного фермента (6,3) как в кислую, так и в щелочную область приводило к усилению ингибирующих эффектов всех трех гидроксамовых производных жирных кислот (рис. 4). При этом рН-оптимум реакции при добавлении в среду ПКГ и КГК не менялся, а при введении СГК он несколько смещался в щелочную зону. Интересно отметить, что в диапазоне рН 5,5—6,0 отсутствовал ингибирующий эффект КГК, хотя при рН 4,0—5,0 и 6,3—8,0 он отмечен и возрастает при защелачивании или закислении среды.

Таким образом, в результате проведенных исследований была показана способность гидроксамовых производных стеариновой, пальмитиновой и каприловой кислот ингибировать активность 5-липоксигеназы из клубней картофеля. При этом их эффект зависел от рН среды и концентрации субстрата и не зависел от времени предынкубации ингибитора с ферментом. Наиболее сильным ингибитором из изученных соединений оказался гидроксамат стеариновой кислоты. Укорочение углеродной цепи жирнокислотного остатка приводило к резкому снижению ингибирующего эффекта.

Л. Б. Бондаренко, С. О. Огій, В. М. Цернюк, І. А. Бутович

Гідроксамові похідні насичених жирних кислот як інгібітори 5-ліпоксигенази

Резюме

*В результаті проведених за умов in vitro досліджень було показано здатність гідроксамових похідних стеаринової, пальмітинової та каприлової кислот пригнічувати активність 5-ліпоксигенази з бульб картоплі. При цьому їх ефект залежав від рН середовища і концентрації субстрату і не залежав від часу інкубації інгібітора з ферментом. Найсильнішим інгібітором серед досліджених сполук виявився гідроксамат стеаринової кислоти. Вкорочення вуглеродного ланцюга жирнокислотного залишку призводило до різкого зниження інгібуючого ефекту.*

L. B. Bondarenko, S. A. Ohiy, V. N. Tsernjuk, I. A. Butovich

Hydroxamic derivatives of saturated fatty acids as inhibitors of 5-lipoxygenase

Summary

*In experiments in vitro were established inhibitory effects of hydroxamic derivatives of stearic, palmitic and caprylic acids on 5-lipoxygenase from potato tubers. Their effects depended on pH and substrate concentrations and were independent — on time of incubation of enzyme with inhibitor. Hydroxamic derivative of stearic acid was the most effective inhibitor among investigated compounds. Shortening of fatty acid side chain lead to sharp decreasing of inhibitory effect.*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Rokach J.* Leukotrienes and lipoxygenases.— Amsterdam. Elsevier, 1989.—518 p.
2. *Бутович І. А., Харченко О. В., Бондаренко Л. Б. и др.* Линолеат-гідроксамовая кислота — ингибитор 5-липоксигеназы // Биохимия.—1994.—59, № 6.—С. 808—812.
3. *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.—Р. 94.
4. *Кухарь В. П., Бутович И. А.* Синтез и исследование простагландинов // Тез. докл. IV Всесоюз. конф.—Минск, 1989.—С. 110.
5. *Holman P. T., Bergstrom F.* The Enzymes / Ed. B.Sumner.— New York; London: Acad. press, 1954.—Vol. 2. pt 1.—Р. 559—580.
6. *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.
7. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики.—М.: Мир, 1990.—334 с.
8. *Бутович І. А., Кухарь В. П.* 5-Липоксигеназа картофеля. Кинетика окисления линолевой кислоты // Укр. біохим. журн.—1989.—61, № 2.—С. 106—108.