

Л. Б. Бондаренко, О. В. Харченко, И. А. Бутович

**ВИТАМИН D₃ И 1,25-ДИОКСИВИТАМИН D₃ —
ИНГИБИТОРЫ 5-ЛИПОКСИГЕНАЗЫ**

Установлено, что витамин D₃ и его гормонально активная форма 1,25-(ОН)₂D₃ ингибируют активность 5-липоксигеназы из клубней картофеля. Подобного влияния данных веществ на активность 15-липоксигеназы соевых бобов не выявлено. Ингибирующий эффект обоих соединений зависит от концентрации субстрата.

Введение. Витамин D₃ и его гормонально активная форма 1,25-диоксिवитамин D₃ помимо поддержания гомеостаза Ca и P в организме способны воздействовать на процессы пролиферации и дифференциации клеток [1], оказывая иммуномодулирующее действие. Такой эффект не опосредован предварительным запуском синтеза кальцийсвязывающего белка и механизм его окончательно не ясен. Исследования последних лет показали, что метаболиты витамина D₃ могут регулировать активность ферментов, встроенных в мембраны, и транспорт Ca через мембраны [2]. Эти соединения изменяют структуру жирнокислых остатков фосфолипидов мембраны и увеличивают текучесть последней [2]. В культуре хондроцитов 1,25-(ОН)₂D₃ и 24,25-(ОН)₂D₃ регулировали обмен арахидоновой кислоты по различным механизмам. Воздействие 1,25-(ОН)₂D₃ на хондроциты зоны роста проявлялось в течение 5 мин. При этом включение арахидоновой кислоты в фосфолипиды достигало максимума через 1 ч, а высвобождение — через 30 мин. 24,25-(ОН)₂D₃ стимулировал постепенное повышение включения после некоторого инкубационного периода. Его максимум достигался через 15 мин, а максимум высвобождения — через 1 ч.

В свою очередь метаболиты арахидоновой кислоты также способны регулировать обмен витамина D₃ [3]. Добавление лейкотриена C₄ в концентрации 10⁻⁶ М увеличивает синтез 1,25-(ОН)₂D₃ альвеолярными макрофагами на 234 %. Помимо прямого эффекта на витамин D₃ и его производные возможно и опосредованное влияние Ca на их метаболизм. Арахидоновая кислота вызывает мобилизацию Ca и уже в концентрации 5 мкМ повышает его содержание в цитозоле в 2,5 раза [4]. При этом ни одна из других жирных кислот такой активностью не обладала.

Важная роль лейкотриенов (липоксигеназных метаболитов арахидоновой кислоты) в развитии воспалительных и аллергических процессов [5] и способность производных витамина D₃ оказывать иммуномодулирующее действие [1] обусловили важность выяснения возможного влияния витамина D₃ и 1,25-(ОН)₂D₃ на ключевой фермент биосинтеза лейкотриенов — 5-липоксигеназу. В связи с трудностями выделения этого фермента из клеток животных для исследований использовали 5-липоксигеназу картофеля.

Материалы и методы. В работе использованы следующие реактивы: 5-липоксигеназа из клубней картофеля, выделенная по модифицированному методу Шимизу [6, 7], 15-липоксигеназа из соевых бобов («Fluka», Швейцария), линолевая кислота и луброл PX («Sigma», США), витамин D₃ (спиртовой раствор), 1,25-диоксिवитамин D₃ (масляный раствор) («Hoffmann — La-Roche», Швейцария), неорганические кислоты, щелочи и соли марки х. ч.

Витамин D₃ вводили в дозах, обеспечивающих его конечную концентрацию в пробах 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ М (обычно применяемых при работе с культурами тканей и системами *in vitro* [1]); 1,25-(ОН)₂D₃ — 10⁻⁹, 10⁻⁸ и 10⁻⁷ М [1]. В контроли добавляли соответствующее количество чистого растворителя.

Скорость ферментативного окисления линолевой кислоты 5-липоксигеназой и 15-липоксигеназой определяли спектрофотометрически по возрастанию оптической плотности реакционной смеси в области 235 нм. Объем смеси составлял 2,5 мл [6, 8].

Результаты и обсуждение. Приведенные в табл. 1 и на рис. 1 данные свидетельствуют о том, что витамин D₃ и его гормонально активная форма способны оказывать заметный ингибирующий эффект на 5-липоксигеназу картофеля при оптимальности ее рН (6, 3). Как и следовало ожидать, гормонально активная форма D₃ оказывала более силь-

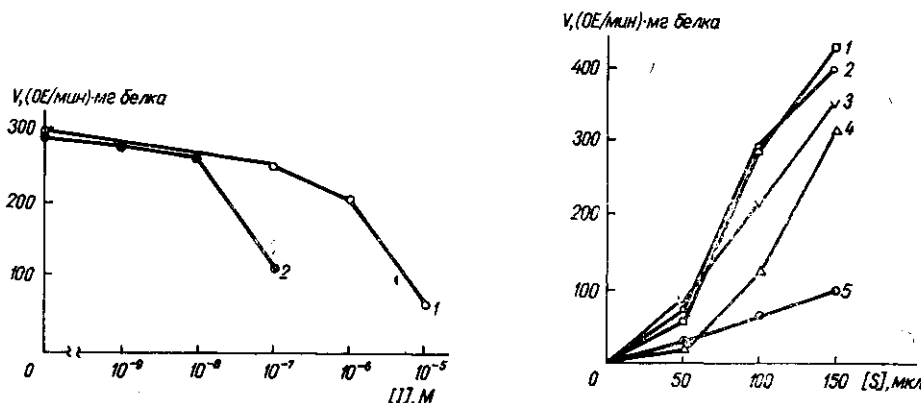


Рис. 1. Влияние витамина D₃ и 1,25-(ОН)₂D₃ на активность 5-липоксигеназы картофеля: 1 — витамин D₃; 2 — 1,25-(ОН)₂D₃

Рис. 2. Зависимость ингибирующего эффекта витамина D₃ и 1,25-(ОН)₂D₃ на активность 5-липоксигеназы картофеля от концентрации субстрата: 1 — контроль с оливковым маслом; 2 — контроль со спиртом; 3 — витамин D₃ (10⁻⁶ М); 4 — 1,25-(ОН)₂D₃ (10⁻⁷ М); 5 — витамин D₃ (10⁻⁵ М)

ное воздействие на фермент по сравнению с самим витамином в такой же концентрации. 1,25-(ОН)₂D₃ (10⁻⁷ М) в 2 раза сильнее ингибировал активность 5-липоксигеназы, чем витамин D₃ (10⁻⁷ М). Наиболее сильным ингибирующим действием как для 1,25-(ОН)₂D₃, так и для витамина D₃ отличались их максимально возможные дозы. Большая активность 1,25-(ОН)₂D₃, чем витамина D₃, возможно, связана и с присутствием двух дополнительных ОН-групп в его молекуле по сравнению с витамином.

Результаты анализа вероятной зависимости эффекта ингибирования витамином D₃ и 1,25-(ОН)₂D₃ 5-липоксигеназы картофеля от концентрации субстрата (линолевой кислоты) приведены на рис. 2. Полученные данные свидетельствуют о наличии определенной зависимости степени ингибирования от концентрации субстрата.

Таблица 1

Кратность снижения активности 5-липоксигеназы в присутствии витамина D₃ и 1,25-(ОН)₂D₃ при различных дозах

Доза, М	Ингибитор	
	1,25-(ОН) ₂ D ₃	Витамин D ₃
10 ⁻⁹	1,03	—
10 ⁻⁸	1,05	—
10 ⁻⁸	2,36	1,16
10 ⁻⁷	—	1,45
10 ⁻⁶	—	4,83

«—» — измерений не проводили.

Таблица 2

Влияние витамина D₃ и 1,25-(ОН)₂D₃ на активность 15-липоксигеназы соевых бобов

Проба	Показатель	
	Удельная активность, (OE/мин) · мг белка	Ингибирование, %
Контроль (спирт)	1600	0
Витамин D ₃ (10 ⁻⁵ М)	1600	—
Контроль (масло)	1150	—
1,25-(ОН) ₂ D ₃ (10 ⁻⁷ М)	1100	4

Аналогичное изучение воздействия витамина D₃ и 1,25-(OH)₂D₃ на 15-липоксигеназу сои показало отсутствие ингибирующего эффекта даже при максимальных дозах исследуемых веществ (табл. 2).

Таким образом, нашими исследованиями установлена способность витамина D₃ и 1,25-(OH)₂D₃ ингибировать активность 5-липоксигеназы, но не 15-липоксигеназы. Эффект ингибиторов, по-видимому, зависит от концентрации субстрата.

Summary. The influence of vitamin D₃ and 1,25-(OH)₂D₃ on the activity of potato 5-lipoxygenase and soy beans 15-lipoxygenase was examined. The inhibitory effect of these compounds on 5-lipoxygenase was established but not 15-lipoxygenase. 1,25-(OH)₂D₃ was stronger as an inhibitor than vitamin D₃. Inhibitory effect of both compounds depended on dose of substrate (linoleic acid).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бауман В. К. Биохимия и физиология витамина D.—Рига: Зинатне, 1989.—480 с.
2. Regulation of arachidonic acid turnover by 1,25-(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ in growth zone and resting zone chondrocyte cultures / Z. Schwartz, L. D. Swain, V. Ramirez, B. D. Boyan // Biochim. et biophys. acta.—1990.—1027, N 3.—P. 278—287.
3. A role for endogenous arachidonate metabolites in the regulated expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylation reaction in cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis / J. S. Adams, M. A. Gacad, M. M. Diz, J. L. Nadler // J. Clin. Endocrinol. and Metab.—1990.—70, N 3.—P. 595—600.
4. Alila H. W., Corradino R. A., Hansel W. Arachidonic acid and its metabolites increase cytosolic free calcium in bovine luteal cells // Prostaglandins.—1990.—39, N 5.—P. 481—496.
5. Bailey D. M., Casey F. B. Lipoxygenase and the related arachidonic acid metabolites // Ann. Rept. Med. Chem.—1982.—17.—P. 203—217.
6. Активизация окисления линолевой кислоты 5-липоксигеназой из клубней картофеля под влиянием фосфатидовой кислоты / И. А. Бутович, В. М. Бабенко, Л. В. Ливарчук и др. // Биохимия.—1991.—56, № 6.—С. 1077—1081.
7. Бутович И. А., Бридня В. П., Кухарь В. П. Линолеатгидроксамовая кислота — суицидный ингибитор липоксигеназы // Биохимия.—1990.—55, № 7.—С. 1211—1221.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН Украины, Киев

Получено 05.03.92