



УДК 577.152.113\*111.2.042:547.587.5'568.1

## ЛИПОФИЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ – ЛИПОКСИГЕНАЗНЫЕ ИНГИБИТОРЫ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ

© 1995 г. О. К. Мирзоева\*, Г. Ф. Судьина, М. А. Пушкарева,  
Г. А. Коршунова, Н. В. Сумбатян, С. Д. Варфоломеев

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119899

Поступила в редакцию 12.01.94 г. После доработки 23.03.94 г.

Фенэтиловый эфир кофейной кислоты входит в состав прополиса и является его активным компонентом. Нами получены два производных кофейной кислоты (СА) по карбоксильной группе: фенэтиловый эфир (САРЕ) и N,N'-дициклогексил-О-(3,4-дигидроксициннамоил)изомочевина (DCHCU), и показано, что оба соединения ингибируют 5- и 15-липоксигеназу в микромолярном диапазоне концентраций. На основании экспериментальных данных с 5-липоксигеназой из ячменя предложена кинетическая схема действия производных кофейной кислоты, соответствующая полному бесконкурентному типу ингибирования. Обнаружено, что САРЕ и DCHCU проявляют антиоксидантные свойства: в нейтрофилах человека и в ферментативной системе ксантин-ксантиноксидаза-САРЕ в концентрации 5 мкМ и DCHCU в концентрации 10 мкМ полностью подавляют образование активных форм кислорода.

*Ключевые слова:* кофейная кислота, липофильные производные; 5-липоксигеназа; ингибирование фермента; респираторный взрыв; ксантиноксидаза.

Липоксигеназы (КФ 1.13.11.12) относятся к классу железосодержащих оксигеназ [1] и катализируют стереоспецифическое окисление полиненасыщенных жирных кислот, содержащих 1Z,4Z-пентадиеновый фрагмент с образованием 1Z,3E-диен-лидропероксидов [2].

Моногидропероксидиеновые кислоты являются предшественниками дигидро(перо)кси и тригидро(перо)кси производных, включая лейкотриены и липоксины [3]. Липоксигеназные метаболиты арахидоновой кислоты играют важную физиологическую и патофизиологическую роль в воспалительных процессах и аллергии, раковых заболеваниях [4 - 8]. Ввиду высокой физиологической активности липоксигеназных продуктов ингибирование их биосинтеза может открыть но-

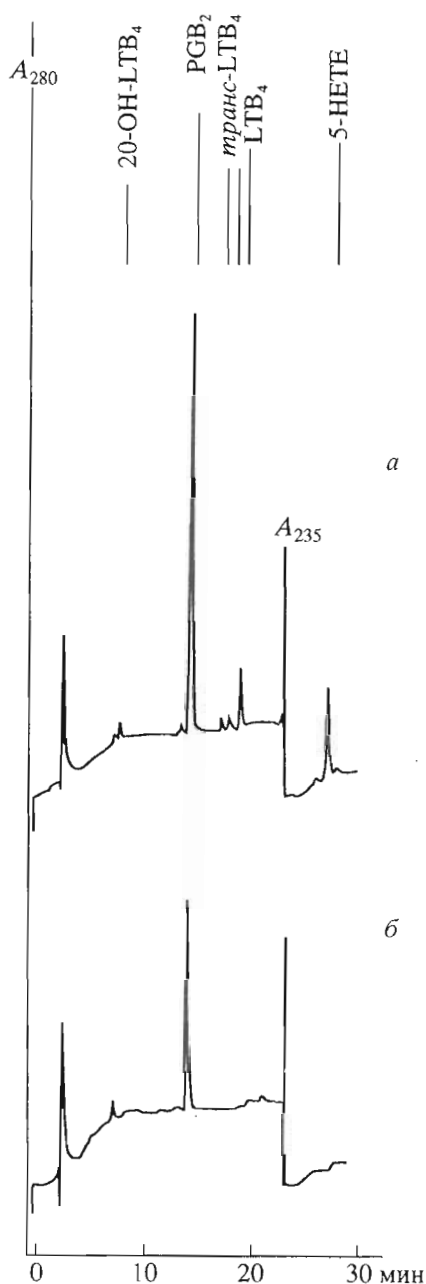
вые подходы к лечению различных заболеваний человека [9].

Известно немало природных и синтетических соединений, являющихся эффективными ингибиторами липоксигеназ как *in vitro*, так и *in vivo* [10 - 18]. Мы синтезировали и исследовали действие двух новых липоксигеназных ингибиторов – производных кофейной кислоты по карбоксильной группе: фенэтилового эфира (САРЕ) и N,N'-дициклогексил-О-(3,4-дигидроксициннамоил)изомочевины (DCHCU). Последнее соединение было выделено из реакционной смеси как промежуточное при синтезе фенэтилового эфира в присутствии дициклогексилкарбодиимида. Обычно O-ацильные производные дициклогексилмочевины, полученные из насыщенных карбоновых кислот, трудно выделить из реакционной смеси, так как они являются высокореакционноспособными соединениями, легко вступающими в дальнейшие превращения. Повышенная устойчивость указанного соединения может быть объяснена присутствием в его молекуле системы сопряженных двойных связей.

Фенэтиловый эфир кофейной кислоты, полученный нами, имел природную E-конфигурацию,

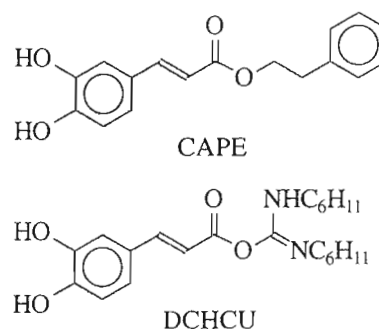
Использованные сокращения: СА – кофейная кислота, САРЕ – фенэтиловый эфир кофейной кислоты, DCHCU – N,N'-дициклогексил-О-(3,4-дигидроксициннамоил)изомочевина, LO – липоксигеназа, 9-HPOD – 9-гидропероксиоктадекадиеновая кислота, PMA – 12-миристал-13-ацетат форбола, PGH – простагландин H, NDGA – нордигидрогваретовая кислота.

\* Автор для переписки.



**Рис. 1.** ВЭЖХ липоксигеназных продуктов, образующихся при стимуляции нейтрофилов человека ( $3.6 \times 10^6$  /мл) кальциевым ионофором А23187 (5 мкМ) в присутствии 2 мкМ CAPE (б) и эквивалентного объема (1 мкл/мл инкубации) этанола (контроль) (а). Ингибитор добавляли к клеткам за 1 мин до стимуляции ионофором. Хроматографию продуктов осуществляли в градиентном режиме: 0 - 30 мин – линейный градиент от 20 до 90% элюента Б, 30 - 35 мин – от 90 до 100% элюента Б. Состав элюентов: метанол–вода–трифторуксусная кислота–триэтиламин в соотношении 50 : 50 : 0.1 : 0.025 (А), 100 : 0 : 0.1 : 0.025 (Б). Детекцию вели от 0 до 23 мин при 280 нм, далее при 235 нм. На хроматограмме отмечены пики (времена удерживания) стандартов: простагландин В<sub>2</sub> (PGB<sub>2</sub>), лейкотриена В<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), 6-*транс*-изомеров лейкотриена В<sub>4</sub>, ω-гидроксильейкотриена В<sub>4</sub> (20-ОН-LTB<sub>4</sub>) и 5-гидроксизейкозатетраеновой кислоты (5-НЕТЕ).

как и соединение, выделенное из прополиса и обладающее цитостатической активностью [19].



Оба соединения, CAPE и DCHCU, ингибировали образование оксигенированных метаболитов линолевой и арахидоновой кислот под действием 5- и 15-липоксигеназ (табл. 1, рис. 1 - 3). На активность PGH-синтетазы CAPE и DCHCU в концентрации 10 мкМ не оказывали влияния, а в концентрации 20 мкМ активировали реакцию (данные не приведены).

Действующая концентрация ингибитора CAPE при взаимодействии с нейтрофилами человека была существенно ниже, чем при взаимодействии с 5-липоксигеназой, выделенной из ячменя (рис. 2, 3). Было также обнаружено, что при взаимодействии с клетками CAPE проявляет более высокую ингибирующую активность, чем кофейная кислота, – при том, что 2 мкМ CAPE полностью ингибирует синтез липоксигеназных метаболитов в нейтрофилах человека (рис. 1), кофейная кислота в концентрации 2 мкМ практически не оказывает ингибирующего действия (данные не приведены). Это связано, по-видимому, с тем, что гидрофобные производные кофейной кислоты легче проникают через клеточную мембрану, чем кофейная кислота.

Используя спектрофотометрический метод, мы исследовали кинетику действия производных кофейной кислоты на 5-липоксигеназу ячменя. Инкубация CAPE и DCHCU с 5-липоксигеназой приводила к быстрой потере ферментативной активности: оба соединения проявляли сильное ингибирующее действие уже через 1 мин инкубации. Концентрационные зависимости падения остаточной ферментативной активности (%) при взаимодействии кофейной кислоты и ее производных с 5-липоксигеназой (рис. 3) демонстрируют тип полного ингибирования: зависимости линейны и при больших концентрациях ингибиторов ферментативная активность уменьшается практически до нуля. CAPE и DCHCU действуют гораздо эффективнее, чем кофейная кислота. Ингибирующая активность возрастает в ряду CA < DCHCU < CAPE (рис. 3). Оба исследуемых соединения действуют обратимо – при разбавлении инкубационной смеси фермента с ингибиторами

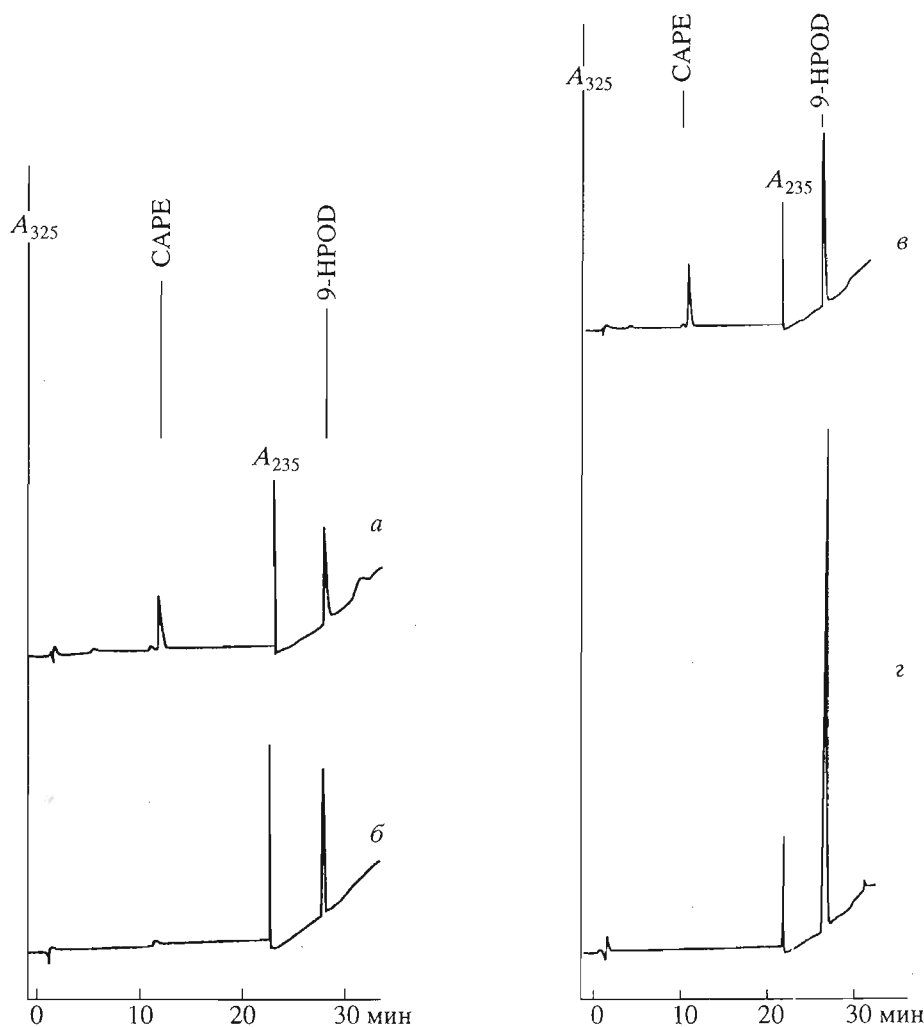


Рис. 2. ВЭЖХ продуктов реакции, полученных при окислении линолевой кислоты (100 мкг<sup>-1</sup>) 5-липоксигеназой ячменя (0.01 ед./мл) в присутствии 10 мкМ CAPE (а, в) и в отсутствие ингибитора (б, г). Хроматограммы в, г соответствуют реакционным смесям, полученным при окислении, проведенном с добавлением 20 мкМ 9-HPPOD (продукт реакции).

в 10 раз активность фермента возвращалась к первоначальной (табл. 2).

В литературе имеются данные об ингибирующем действии кофейной кислоты на липоксигеназу по неконкурентному механизму [20], однако

особенности ингибирования ее синтетическими производными изучены далеко не достаточно. CAPE в своей структуре сочетает остаток кофейной кислоты, для которой постулирован неконкурентный механизм взаимодействия с липоксигеназами, и спирта. Алифатические спирты с длиной

Таблица 1. Ингибирование 15-липоксигеназы соевых бобов

рН	Субстрат	Активность 15-липоксигеназы, %		
		в отсутствие ингибиторов	в присутствии 20 мкМ	
			CAPE	DCHCU
8.7	Линолевая кислота	100	38	52
	Арахидоновая »	100	47	63
6.8	Линолевая »	100	28	32
	Арахидоновая »	100	46	53

Таблица 2. Обратимость действия ингибиторов

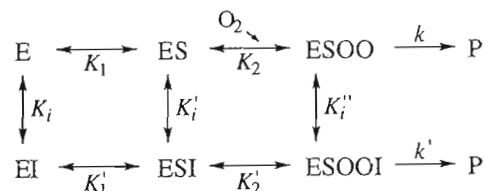
Соединение	Концентрация ингибиторов, мкМ	Активность 5-липоксигеназы, нмоль/мин мг	
		в отсутствие ингибиторов	в присутствии ингибиторов*
CAPE	5	800 ± 50	384 ± 30; 790 ± 20
	10		300 ± 20; 810 ± 40
DCHCU	15	800 ± 50	123 ± 10; 786 ± 30
	25		94 ± 5; 813 ± 40

\* Вторая цифра соответствует активности 5-липоксигеназы после 10-кратного разбавления смеси фермента с ингибиторами.

углеводородной цепи от 2 до 12 вели себя как конкурентные ингибиторы при взаимодействии с 15-липоксигеназой [21]. Предсказать характер взаимодействия изучаемых соединений с 5-липоксигеназой было довольно сложно.

Механизм ингибирования мы анализировали, используя графический метод, предложенный Иошино [22]: построение зависимости скорости реакции от концентрации ингибитора в координатах:  $v/(v_0 - v)$  от  $1/[I]$ , где  $v$  и  $v_0$  – скорости реакции в присутствии и в отсутствие ингибитора соответственно (рис. 4). В координатах Иошино (рис. 4а) мы получили пучок прямых, пересекающихся в начале координат, с наклоном, уменьшающимся с увеличением концентрации субстрата. Для реакции, протекающей по схеме Михаэлиса–Ментен, такой вид зависимости означает полное бесконкурентное ингибирование, когда ингибитор способен связываться не со свободным ферментом, а только с фермент-субстратным комплексом. Мы предложили следующую простейшую схему взаимодействия производных кофейной кислоты с липоксигеназой (схема): фер-

мент образует комплекс с субстратом, субстрат в таком комплексе оксигенируется при взаимодействии с молекулой  $O_2$ , ингибитор может присоединяться на любой стадии. На этой схеме E – активная форма липоксигеназы, P – продукты реакции,  $K_1, K_2, K_1', K_2', K_i, K_i', K_i''$  – константы диссоциации фермент-лигандных комплексов,  $k$  и  $k'$  – константы скорости распада комплексов ESOO и ESOOI соответственно.



Уравнение для скорости реакции в соответствии с данной схемой мы выводили в предположении о быстро устанавливающихся равновесиях между ферментом и комплексами фермента с эффекторами:

$$\frac{v}{v_0 - v} = \frac{\{1 + (K_2/[O_2]) (1 + K_1/[S])\} (K_i''/[I] + k'/k)}{\{1 + K_i'' (K_2/[O_2]) (1/K_i' + (1/K_i) (K_1/[S]))\} - (k'/k) \{1 + (K_2/[O_2]) (1 + K_1/[S])\}}$$

Учитывая вид экспериментальных данных в координатах Иошино – пучок прямых, проходящих через начало координат при постоянной концентрации кислорода, можно предположить, что в схеме, описывающей экспериментальные дан-

ные,  $K_i = \infty, K_1' = 0, k' = 0$ , что соответствует полному бесконкурентному механизму ингибирования (рис. 4). С учетом упрощений угол наклона прямых описывается следующей функцией:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\{1 + ([S]/K_1) (1 + [O_2]/K_2)\} K_i''}{([S]/K_1) ([O_2]/K_2 + K_i''/K_i')}$$

График зависимости  $\operatorname{tg} \alpha$  от концентрации субстрата (рис. 4б), полученный на основании экспериментальных данных рис. 4а, позволяет оценить величину константы ингибирования  $K_i''$ , принимая, что  $K_i'' = K_i'$ . Для CAPE  $K_i'' \leq 8$  мкМ (рис. 4б), для DCHCU (данные не показаны)  $K_i'' \leq 11$  мкМ.

Построение экспериментальных данных в координатах Диксона ( $1/v$  от концентрации ингибитора  $[I]$ ) дает серию параллельных прямых как для CAPE, так и для DCHCU, что также подтверждает бесконкурентный механизм ингибирования (рис. 5а, б).

Мы обнаружили способность CAPE и DCHCU ингибировать реакции образования активных форм кислорода как клетками (на примере респираторного взрыва в нейтрофилах), так и в бесклеточной ферментативной системе ксантиноксидазы. Рис. 6 иллюстрирует ингибирующую активность CAPE и DCHCU при действии их на люминолзависимую хемилюминесценцию

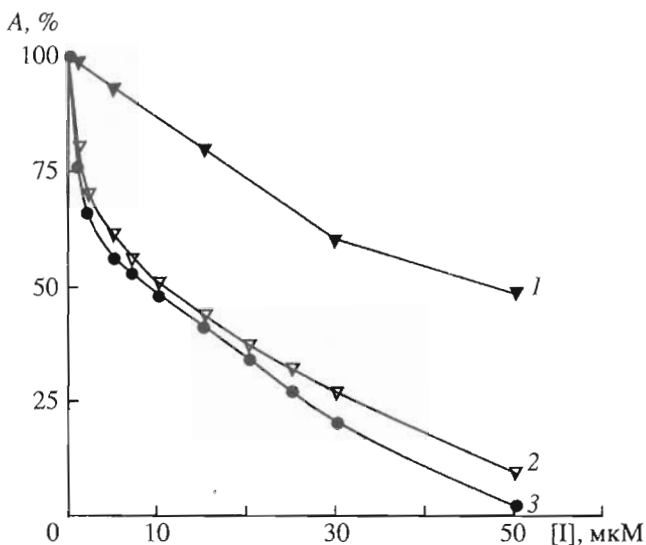


Рис. 3. Концентрационная зависимость изменения остаточной ферментативной активности при окислении линолевой кислоты 5-липоксигеназой в присутствии CA (1), DCHCU (2) и CAPE (3). Ингибиторы в различных концентрациях прибавляли к ферменту за 1 мин до иницирования реакции субстратом.

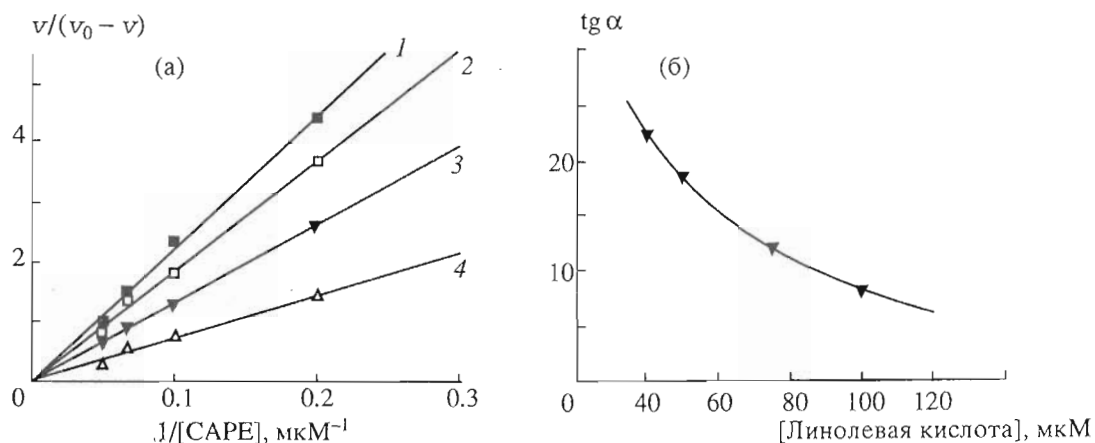


Рис. 4. Зависимость скорости реакции 5-липоксигеназы с линолевой кислотой от концентрации ингибитора CAPE в координатах Иошино [22] при концентрациях линолевой кислоты 40 (1), 50 (2), 75 (3), 100 мкМ (4) (а) и зависимость тангенса наклона прямых, приведенных на рис. 4а, от концентрации субстрата (б).

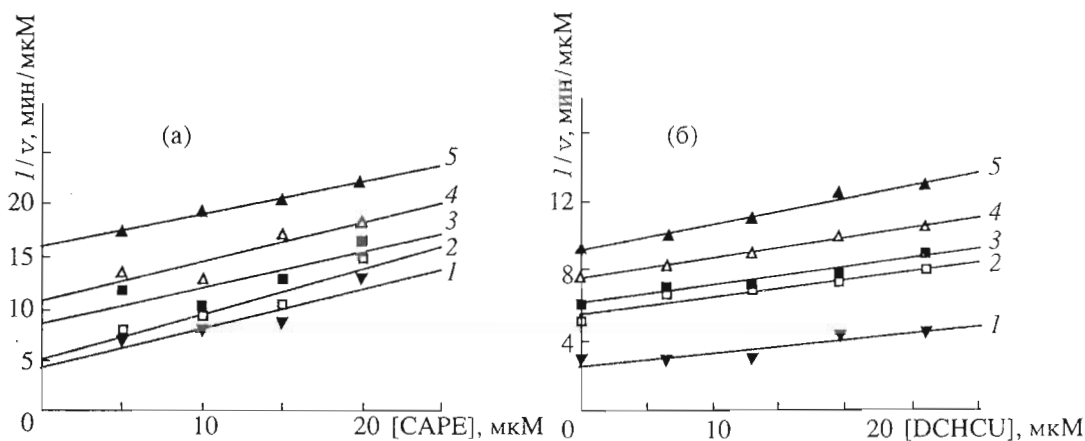


Рис. 5. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации ингибиторов в координатах Диксона при концентрациях субстрата 100 (1), 75 (2), 50 (3), 40 (4), 35 мкМ (5) для CAPE (а) и для DCHCU (б).

нейтрофилов, индуцированную добавлением стимула – PMA. Ингибирующая активность CAPE и DCHCU, а также NDGA и кофейной кислоты при действии их на люминолусиленную хемиллюминесценцию, сопряженную с образованием супероксидрадикалов в ферментативной системе ксантин–ксантинооксидаза возрастала в ряду NDGA < CA < DCHCU < CAPE (рис. 7), что коррелирует с антилипоксигеназной активностью перечисленных соединений.

Механизм полного бесконкурентного ингибирования 5-липоксигеназы под действием CAPE и DCHCU сочетается с неспецифическими антиоксидантными свойствами этих соединений. Можно предположить, что ингибиторы с такими антиоксидантными свойствами связываются с активными промежуточными фермент-лигандными комплексами, захватывая радикальные интермедиаты. По механизму реакции, предложенному для 15-липоксигеназы [23], такими интермедиатами, приводящими к гидропероксидным продуктам,

являются пероксильные и пентадиенильные радикалы, связанные с ферментом. Основываясь на этом механизме, мы можем предположить, что антиоксидантные ингибиторы блокируют перенос электронов между ионом железа в активном центре фермента и активированной молекулой субстрата на ферменте и препятствуют восстановлению пероксильных радикальных комплексов до продукта – пероксида жирной кислоты.

Таким образом, полученные нами производные кофейной кислоты являются ингибиторами липоксигеназ с антиоксидантным характером действия. Антиоксидантная и антилипоксигеназная активность CAPE может обуславливать противовоспалительное действие прополиса.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы линолевая и арахидоновая кислоты, NDGA, PMA, ксантин и ксантинооксидаза (Sigma, США); Ficoll-Paque и декстран

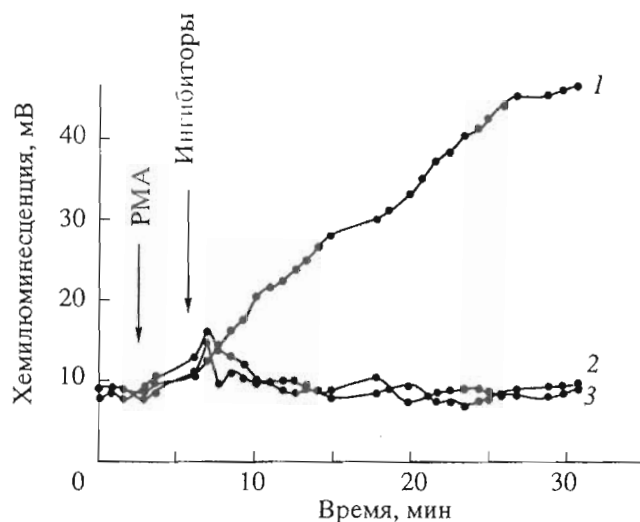


Рис. 6. Действие CAPE и DCHCU на люминоусиленную хемилюминесценцию PMA-стимулированных нейтрофилов человека. Клетки ( $2 \times 10^6$ /мл) стимулировали 0.5 нг/мл PMA и через 2 мин прибавляли 10 мкМ CAPE (2), DCHCU (3) или равный объем (6 мкл) этанола (1).

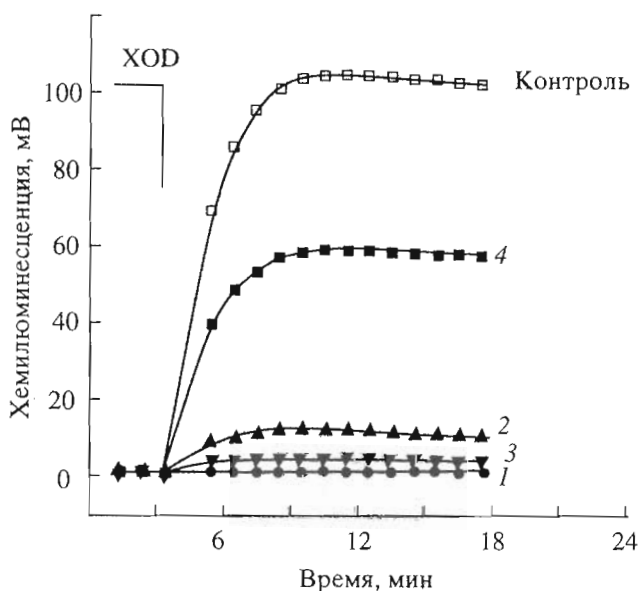


Рис. 7. Действие CAPE (1), DCHCU (2), SA (3) и NDGA (4) на люминоусиленную хемилюминесценцию ферментативной системы ксантин-ксантинооксидаза. 5 мкМ спиртовой раствор CAPE, DCHCU, NDGA и 30 мкМ SA или 3 мкл этанола (контроль) прибавляли за 10 с до инициирования реакции ксантинооксидазой (XOD).

T-500 (Pharmacia), диметилсульфоксид и трифторуксусная кислота (Merck, ФРГ), Sep-Pak (Waters), феноэтиловый спирт (PEA) и 4-диметиламинопиридин (DMAP) (Fluka), метанол, дициклогексилкарбодиимид (DCC) и перекристаллизованная из воды кофейная кислота фирмы "Реахим" (Лат-

вия). Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР соединений в ацетоне- $d_6$  получены на спектрометре Bruker WH-360 (ФРГ) при 200 МГц. Приведены химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) и константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ , Гц).

**Синтез феноэтилового эфира кофейной кислоты и  $N,N'$ -дициклогексил- $O$ -(3,4-дигидроксициннамойл)изомочевины.** К раствору 0.9 г (5 ммоль) кофейной кислоты в 4 мл диметилформамида прибавляли 12 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и 60 мг (5 ммоль) DMAP, растворенного в 0.6 мл смеси DMFA и  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 : 1), а затем 0.66 мл PEA. Раствор охлаждали на ледяной бане и при перемешивании прибавляли раствор 1.1 г (5.5 ммоль)  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимида в 1 мл хлористого метилена. После перемешивания в течение 1 ч при охлаждении и 2 ч при комнатной температуре осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали и фильтрат упаривали. Остаток разделяли в системе бензол-ацетон-уксусная кислота, 100 : 50 : 2 (система А), на колонке с силикагелем L 40/100 ( $4 \times 55$  см). Контроль за ходом разделения осуществляли с помощью ТСХ на пластинках Silufol U-254 в той же системе растворителей. Собрали две фракции, соответствующие веществам с  $R_f$  (А) 0.7 (фракция I) и 0.6 (фракция II).

После упаривания растворителей фракции I и II очищали дополнительно на колонке с силикагелем L 40/100 ( $2.5 \times 35$  см) в системе 4% *i*-PrOH в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (система Б). Из фракции I получили 40 мг феноэтилового эфира кофейной кислоты, т. пл. 124 - 125°C (разл., перекристаллизация из воды);  $R_f$  0.70 (А), 0.30 (Б), 0.67 (система В: хлороформ-метанол, 4 : 1), 0.57 (система Г: этилацетат-этанол-уксусная кислота, 85 : 10 : 5); УФ (MeOH),  $\lambda$ , нм ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 325 (18300), 300 (плечо, 14000), 235 - 245 (10300);  $^1\text{H}$ -ЯМР: 8.52; 8.26 (уш. с, 2H, OH), 7.53 (д,  $J$  16, 1H, 7-H), 7.35 - 7.20 (м, 5H, 13-H - 17-H), 7.17 (д,  $J$  2.0, 1H, 2-H), 7.05 (дд,  $J$  8.0 и 2.0, 1H, 6-H), 6.84 (д,  $J$  8.0, 1H, 5-H), 6.26 (д,  $J$  16.0, 1H, 8-H), 4.36 (т,  $J$  7.0, 2H, 10-H), 3.00 (т,  $J$  7.0, 2H, 11-H).

Из фракции II получили 28 мг  $N,N'$ -дициклогексил- $O$ -(3,4-дигидроксициннамойл)изомочевины с т. пл. 130 - 132°C (разл., иглы из бензола);  $R_f$  0.60 (А), 0.25 (Б), 0.67 (В), 0.57 (Г); УФ (MeOH), нм ( $\epsilon$ ): 325 (15300), 300 (плечо, 10600), 235 - 245 (8900);  $^1\text{H}$ -ЯМР: 8.48; 8.28 (с, 2H, OH), 7.44 (д,  $J$  15, 1H, 7-H), 7.09 (д,  $J$  2, 1H, 2-H), 6.93 (дд,  $J$  8.0 и 2.0, 1H, 6-H), 6.85 (д,  $J$  8.0, 1H, 5-H), 6.85 (д,  $J$  15, 1H, 8-H); ИК (KBr): 3440 (OH), 3160 (NH), 1670 (C=O), 1650 (CH=CH), 1280 (O-C=O)  $\text{cm}^{-1}$ , EI-MS (Varian MAT-112):  $m/z$  386 ( $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $M^+$  386.49), основные фрагменты -  $m/z$  368, 305, 224, 163, 97, 82.



### Получение ферментных препаратов

15-Липоксигеназу выделяли из соевых бобов сорта "Лучезарная" согласно методике, описанной в работе [24]. Грубый экстракт фермента наносили на колонку (26 × 300 мм) с DEAE-сефадексом, уравновешенным 50 мМ натрий-фосфатным буферным раствором, pH 7.0. Элюцию вели со скоростью 1 мл/мин в том же буфере с линейным градиентом NaCl 0 - 0.3 М. Фракции, содержащие липоксигеназную активность (см. ниже), подвергали повторной хроматографии в этих же условиях. После очистки и лиофилизации получали фермент со специфической активностью 115 мкмоль/(мин мг), для расчета специфической активности использовали молярный коэффициент поглощения фермента 160 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> при 280 нм [25].

5-Липоксигеназу выделяли из ячменя сорта "Риск". 70 г зерен ячменя мелко измельчали в кофемолке, избегая значительного нагревания. Затем порошок экстрагировали перегнанным гексаном или ацетоном до тех пор, пока элюент не становился бесцветным. Органический слой сливали, осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме. Обезжиренную сухую муку экстрагировали 5 объемами 50 мМ натрий-фосфатного буферного раствора с 50 мМ NaCl, pH 6.8, при медленном механическом перемешивании в течение 1 ч. Суспензию отфильтровывали через четыре слоя марли и центрифугировали 10 мин при 13000g. К супернатанту добавляли твердый сульфат аммония до 30% насыщения (0.21 г на 1 мл) и перемешивали 1 - 1.5 ч. Суспензию центрифугировали 10 мин при 13000g, супернатант отделяли от осадка и добавляли твердый сульфат аммония до 60% насыщения. Через 1.5 ч раствор центрифугировали 10 мин при 13000g и осадок растворяли в 10 мл фосфатного буфера (50 мМ фосфат натрия, pH 6.8). Полученный грубый экстракт фермента подвергали диализу против 0.07 М натрий-ацетатного буфера, pH 4.8, и наносили на колонку (26 × 120 мм) с CM-целлюлозой (Whatman), уравновешенной тем же буфером. Элюцию вели в градиенте ацетат натрия от 0.07 до 0.77 М со скоростью 30 мл/ч. Фракции с 5-липоксигеназной активностью диализовали 3 ч против 20 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 6.8, затем наносили на колонку (16 × 200 мм) с DEAE-сефарозой (Pharmacia), уравновешенной тем же буфером. Фермент элюировали в градиенте NaCl (0 - 0.3 М). Специфическая активность полученного фермента составляла 38 мкмоль/(мин мг). Фракции, содержащие 5-липоксигеназу, диализовали против воды и лиофилизовали. Сухой препарат белка хранился при -20°C. Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм, используя молярный коэффициент поглощения 5-липоксигеназы картофеля [26] и принимая, что поглоще-

нию 1.6 OE<sub>280</sub> соответствует концентрация белка 1 мг/мл.

### Определение ферментативной активности.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически по методу Хольмана [27]. Накопление продукта регистрировали по нарастанию оптического поглощения в области характерного максимума поглощения гидропероксидов жирных кислот ( $\lambda_{\max}$  235 нм). Измерения проводились на спектрофотометре Shimadzu UV-240 (Япония) при 20°C. Стандартная реакционная смесь содержала 100 мкМ линолеат калия и 0.3 - 1.5 мкг/мл 5-липоксигеназы ячменя в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 6.8, или 100 мкМ арахидонат аммония и 0.5 - 2.0 мкг/мл 15-липоксигеназы сои в 0.1 М натрий-боратном буфере, pH 8.7. Удельную активность фермента выражали в микромолях продукта, образующегося в 1 мин на 1 мг белка. Раствор линолеата калия и арахидоната аммония готовили непосредственно перед экспериментом прибавлением щелочи к линолевой или арахидоновой кислоте.

### Действие ингибиторов на 5-липоксигеназу

**ячменя.** 40 мкл раствора 5-липоксигеназы инкубировали при 20°C в 8 мл 50 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 6.8, с кофейной кислотой, CAPE или DCNCSU в концентрациях 0.5 - 30 мкМ, отбирали во времени аликвоты по 1 мл и смешивали с 1 мл 200 мкМ раствора линолевой кислоты в том же буфере для определения активности. Скорость образования 9-гидропероксиоктадекадиновой кислоты (9-НРОД) из линолевой кислоты под действием 5-липоксигеназы ячменя максимальна при добавлении фермента к растворенному в буфере субстрату. Однако, поскольку исследование концентрационных и временных зависимостей взаимодействия фермента с ингибитором требовало их преинкубации, мы инициировали реакцию добавлением субстрата к смеси ингибитор-фермент. Предварительно мы установили, что процент остаточной ферментативной активности по отношению к активности в отсутствие ингибитора не зависит от последовательности смешения реагентов.

### Анализ продуктов методом ВЭЖХ.

Продукты липоксигеназного окисления линолевой и арахидоновой кислот разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ согласно методике [28]. Инкубации с 5-липоксигеназой ячменя останавливали равным объемом метанола, аликвоты по 100 мкл анализировали на колонке (4.6 × 250 мм) Altex C18, 5 мкм, с использованием ультрафиолетового детектора (Jasco, 875-UV) и интегратора (Shimadzu C-R18). Инкубации с нейтрофилами останавливали прибавлением равного объема метанола, содержащего простагландин В<sub>2</sub>, который мы использовали в качестве внутреннего стандарта. Пробы концентрировали твердофазной экстракцией

на C18 Sep-Pak [29]. Детекцию сопряженных диенов вели при 235 нм, лейкотриенов и простагландина В<sub>2</sub> – при 280 нм, ингибиторов – при 325 нм. Подробнее условия хроматографии см. в подписях к рис. 1 и 2.

**Действие ингибиторов на простагландинэндопероксид-синтетазу.** РGH-синтетазу (КФ 1.14.99.1) получали согласно описанной методике [30]. Для регистрации ферментативной активности использовали спектрофотометрический анализ с адреналином [31]. Ингибиторы вводили в раствор фермента за 1 мин до иницирования реакции субстратом – арахидоновой кислотой.

**Влияние ингибиторов на образование активных форм кислорода.** Действие ингибиторов на респираторный взрыв в нейтрофилах, стимулированных 12-мирилат-13-ацетатом форбола (РМА), исследовали согласно методике [32] путем измерения усиленной люминолом хемилюминесценции на приборе LKB Model 1251 при 37°C. Нейтрофилы выделяли из свежееотобранной донорской крови с помощью декстрана Т-500 и фракционированием плазмы на двойном градиенте Ficoll-Paque (1.077 и 1.125), как описано в работе [33]. Клетки суспендировали в среде Хэнкса, свободной от бикарбоната и содержащей 10 мМ НЕРЕС, рН 7.4, и до начала эксперимента хранили при 4°C.

Образование супероксид-аниона O<sub>2</sub><sup>-</sup> контролировали путем измерения люминесценции в клеточно-свободной системе люминол-ксантин-ксантинооксидаза, согласно методике [34]. Все ингибиторы, NDGA, кофейную кислоту и ее производные прибавляли к смеси, содержащей 1 мкМ люминол и 50 мкМ ксантин в буферном растворе 20 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (рН 10) с 0.1 мМ EDTA и 1 мМ NaN<sub>3</sub>, за 1 мин до иницирования реакции ксантинооксидазой. Измерения проводились в течение 35 мин каждые 30 с при 20°C.

Мы благодарны А.Т. Мевх и Н.Ю. Милицыной за проведение экспериментов с РGH-синтетазой.

Данная работа выполнена с использованием средств из международных грантов, финансируемых Министерством науки РФ, и из грантов от Комитета по науке и технике РФ по программе “Новые направления в биотехнологии”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Axelrod B. // Adv. Chem. Ser, 1974. № 136. P. 324 - 346.
2. Vliegenthart J.F.G., Veldink G.A. // Free Radical in Biology. V. 5. / Ed. Pryor W.A. N.Y.: Acad. Press, 1982. P. 29 - 63.
3. Samuelsson B., Dahlen S.E., Lindgren J.A., Rouzer C., Serhan C.N. // Science. 1987. V. 237. P. 1171 - 1176.
4. Higgs G.A. // Prostaglandins Leuk. Med. 1984. V. 13. P. 80 - 82.
5. Zakrzewski J.T., Barnes N.C., Piper P.J., Costello J.F. // Brit. J. Pharmacol. 1985. V. 19. P. 574P.
6. Brain S.D., Camp R.D.R., Cunningham F.M., Dowd P.M., Greaves M.W., Black A.K. // Brit. J. Pharmacol. 1984. V. 83. P. 313 - 317.
7. Piper P.J. // Development of Anti-Astmatic Drugs Butterworth / Eds Buckle A.F., Smith V.K. London, 1984. P. 55 - 72.
8. Marx J.L. // Science. 1982. V. 215. P. 1380 - 1383.
9. Ford-Hutchinson A.W. / Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 1985. V. 44. P. 25 - 29.
10. Papatheofanis F.J., Lands W.E.M. // Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism / Ed. Lands W.E.M. Boston: Martinus Nijhoff Publishing, 1st edn. 1985. P. 9 - 39.
11. Cashman J.R. // Pharm. Res. 1985. V. 6. P. 253 - 261.
12. Salmon J.A. // Adv. Drug Res. 1986. V. 15. P. 111 - 167.
13. Cucurou C., Battioni J.P., Thang D.C., Nam N.H., Mansuy D. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 8964 - 8970.
14. Corey E.J., Cashman J.R., Kantner S.S., Wright S.W. // J. Am. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 1503 - 1504.
15. Kerdesky F.A.J., Holms J.H., Schmidt S.P., Dyer R.D., Carter G.W. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. P. 2143 - 2146.
16. Payne A.N., Garland L.G., Lees I.W., Salmon J.A. // Brit. J. Pharmacol. 1988. V. 94. P. 540 - 546.
17. Corey E.J., Cashman J.R., Eckrich T.M., Corey D.R. // J. Am. Chem. Soc. 1985. V. 107. P. 713 - 715.
18. Kerdesky F.A.J., Schmidt S.P., Holms J.H., Dyer R.D., Carter G.W., Brooks D.W. // J. Med. Chem. 1987. V. 30. P. 1177 - 1186.
19. Grunberger D., Banerjee R., Eisinger K., Oltz E.M., Efros L., Caldwell M., Estu vez V., Nakanishi K. // Experientia, 1988. V. 44. P. 230 - 232.
20. Bach M.K. // The Leukotrienes. Chemistry and Biology / Eds L.W. Chakrin, D.M. Bailey. Orlando: Acad. Press, 1984. P. 163 - 194.
21. Kuninori T., Nishiyama J., Shirakawa M., Shimoyama A. // Biochim. et biophys. acta. 1991. V. 1125. P. 49 - 55.
22. Yoshino M. // Biochem. J. 1987. V. 248. P. 815 - 820.
23. Gardner H.W. // Biochem. et biophys. acta. 1991. V. 1084. P. 221 - 239.
24. Axelrod B., Cheesbrough T.M., Laakso S. // Meth. Enzymol. / Ed. Lowenstein P.D. N.Y.: Acad. Press, 1981. V. 71. P. 441 - 451.
25. Garley J.B., Bombard S., Chopard C., Girerd J.J., Ledere F., Thang D.C., Nam N.H., Mansuy D., Chottard J.C. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 1058 - 1066.
26. Mulliez E., Leblanc J.-P., Girerd J.-J., Rigaud M., Chottard J.-C. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 916. P. 13 - 23.
27. Holman R.T. // Arch. Biochem. and Biophys. 1946. V. 10. P. 519 - 529.



28. Sud'ina G.F., Galkina S.L., Barsky O.A., Margolis L.B. // FEBS Lett. 1993. V. 336. P. 201 - 204.
29. Судьина Г.Ф., Кобельков Г.М., Барский О.А., Варфоломеев С.Д. // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 1341 - 1353.
30. Mevkh A.T., Sud'ina G.F., Golub N.B., Varfolomeev S.D. // Analyt. Biochem. 1985. V. 150. P. 91 - 96.
31. Takeguchi C., Sih C.J. // Prostaglandins. 1972. V. 2. P. 169 - 184.
32. Sud'ina G.F., Tatarintsev A.V., Koshkin A.A., Zaitsev S.V., Fedorov N.A., Varfolomeev S.D. // Biochim. et biophys. acta. 1991. V. 1091. P. 257 - 260.
33. Boyum A. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968. V. 21. (Suppl. 97). P. 77 - 89.
34. Metcalf J.A., Gallin J.I., Nauseef W.M., Root R.K. // Laboratory Manual of Neutrophil Function. N.Y.: Raven Press, 1986. P. 116.

## Lipophilic Derivatives of Caffeic Acid as Lipoxygenase Inhibitors with Antioxidant Properties

O. K. Mirzoeva, G. F. Sud'ina, M. A. Pushkareva, G. A. Korshunova,  
N. V. Sumbatyan, and S. D. Varfolomeev

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology  
Lomonosov Moscow State University, Moscow 119899*

**Abstract** – We have prepared two lipophilic derivatives of caffeic acid at the carboxylic function – caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, and N,N'-dicyclohexyl-O-(3,4-dihydroxycinnamoyl)-isourea. Both substances inhibit barley 5-lipoxygenase and soybean 15-lipoxygenase at micromolar concentrations. The inhibition is uncompetitive, dose-dependent and reversible. The caffeic acid derivatives also exhibit antioxidant properties and at a concentration 5 - 10  $\mu\text{M}$  completely block the production of the reactive oxygen species in human neutrophils and in the cell-free xanthine/xanthine oxidase system.

*Key words: caffeic acid, lipophilic derivatives; lipoxygenase; enzyme inhibition, respiratory burst; xanthine oxidase.*