



УДК 577.152.1:577.334

## ГИДРОФОБНЫЕ НИТРОКСИЛЬНЫЕ РАДИКАЛЫ – ИНГИБИТОРЫ ОКИСЛЕНИЯ ЛИНОЛЕВОГО СПИРТА 5-ЛИПОКСИГЕНАЗОЙ

© 2004 г. А. И. Вовк<sup>#</sup>, О. В. Харченко, А. И. Харитоненко, В. П. Кухарь, Л. В. Бабий, М. Г. Казачков, А. К. Мельник, А. Н. Хильчевский

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины,  
02094, Украина, Киев, ул. Мурманская, 1

Поступила в редакцию 28.10.2003 г. Принята к печати 10.12.2003 г.

Установлено, что стабильные нитроксильные радикалы – 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-овые эфиры 1-бицикло[2,2,2]октановой, адамантил-1-уксусной, додекановой и октадекановой кислот – являются эффективными ингибиторами окисления линолевого спирта, катализируемого 5-липоксигеназой из клубней картофеля. Проанализирована зависимость кажущихся значений  $IC_{50}$  от времени корреляции вращательной диффузии 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила и его производных в модельных мицеллярных системах. Предполагается, что механизм ингибирования включает взаимодействие гидрофобного нитроксильного радикала с промежуточным радикальным фермент-субстратным комплексом.

*Ключевые слова:* нитроксильный радикал; липоксигеназа, ингибирование; линолевый спирт.

### ВВЕДЕНИЕ

Липоксигеназы (КФ 1.13.11.12) относятся к группе железосодержащих диоксигеназ, распространенных в растительных и животных клетках и катализирующих окислительные превращения полиненасыщенных жирных кислот. Липоксигеназы играют ключевую роль при синтезе важнейших природных биорегуляторов, однако повышенная активность этих ферментов может приводить к развитию патологий [1, 2].

Субстратом мембраноактивной 5-липоксигеназы из клубней картофеля является также линолевый спирт, окисляющийся при действии молекулярного кислорода до 9- и 13-гидропероксилинолевых спиртов. Главное направление ферментативной реакции обеспечивает образование (9*S*)-гидроперокси-10*E*,12*Z*-октадиен-1-ола [3, 4]. Механизм окисления включает ионизацию фермент-субстратного комплекса и перенос электрона на содержащийся в активном центре ион  $Fe^{3+}$ . В результате присоединения молекулярного кислорода радикальный интермедиат ферментативной реакции превращается в комплекс  $E(Fe^{2+})S_LOO^{\bullet}$  (где  $E$  – фермент,  $S_L$  – субстрат липоксигеназной реакции), содержащий пероксильный фрагмент. Последний восстанавливается при взаимодействии с ионом  $Fe^{2+}$ . Отщеплению продукта реакции от

фермента предшествует стадия протонирования. Нарушения ферментативного пути накопления гидропероксидов вызваны распадом промежуточных комплексов  $E(Fe^{2+})S_L^{\bullet}$  и  $E(Fe^{2+})S_LOO^{\bullet}$  с образованием свободных радикалов, не связанных с 5-липоксигеназой [5] (схема 1).

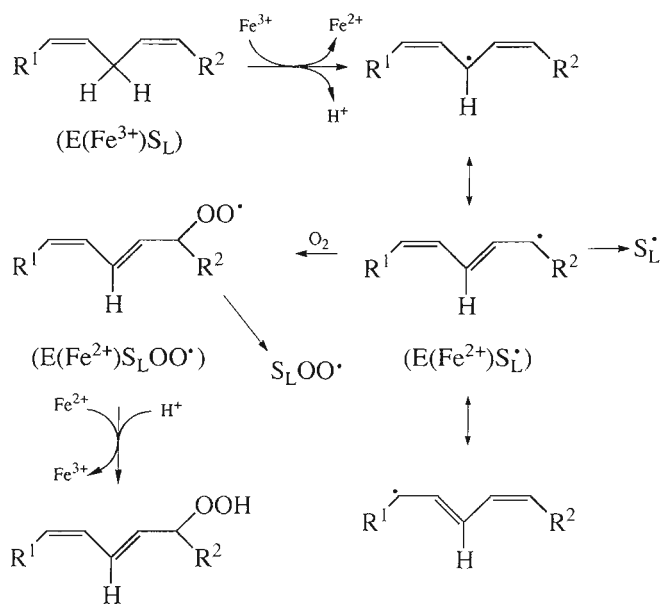


Схема 1. Превращения субстрата 5-липоксигеназной реакции.

Сокращение: ТЕМПО – 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил.

<sup>#</sup>Автор для переписки (факс: (38044) 543-51-52; эл. почта: vovk@bpci.kiev.ua).

Ранее было установлено, что стабильный нитроксильный радикал – 4-гидрокси-ТЕМРО (I) – снижает стационарную скорость ферментативной реакции  $V_{st}$ , катализируемой 5-липоксигеназой из клубней картофеля, и влияет на соотношение образующихся изомерных продуктов. На основании полученных результатов был сделан вывод, что соединение (I) блокирует неферментативные свободнорадикальные превращения в растворе, не изменяя при этом функциональных свойств фермента [3–5].

Мы предположили, что эффективными ингибиторами катализируемого 5-липоксигеназой окисления линолевого спирта могут быть свободные нитроксильные радикалы, содержащие в своей структуре липофильный заместитель. Настоящая работа посвящена исследованию ингибирующего действия гидрофобных сложноэфирных производных 4-гидрокси-ТЕМРО – свободных радикалов (II)–(V) (схема 2).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ кинетических данных окисления линолевого спирта, катализируемого в мицеллярной среде 5-липоксигеназой из клубней картофеля, показал, что наличие в реакционной смеси 0.2 мкМ соединений (II)–(V) приводило к заметному снижению стационарной скорости ферментативной реакции. При этом влияние 4-бидкило[2,2,2]октан-1-карбоновой, адамантилуксусной, лауриновой и стеариновой кислот в той же концентрации было несущественным. Эффективность ингибирующего действия эфиров (II)–(V) значительно превышала действие 4-гидрокси-ТЕМРО (см., например, рис. 1) Из рисунка видно, что с увеличением концентрации нитроксильного радикала (III) наблюдалось сначала резкое, затем более слабое снижение активности 5-липоксигеназы (рис. 1, кривая 2). В условиях опытов (рис. 1, кривая 1) при дальнейшем увеличении концентрации 4-гидрокси-ТЕМРО до 50 и 100 мкМ остаточная активность фермента составляла 35 и 31% соответственно.

Колоколообразная форма зависимости стационарной скорости липоксигеназного окисления линолевого спирта от рН (рис. 2, 1) свидетельствует о возможных каталитических функциях двух ионогенных групп фермента. При действии нитроксильного радикала кажущиеся значения  $pK_a$  этих групп существенно не изменялись –  $4.7 \pm 0.1$  и  $7.5 \pm 0.1$  в опытах без ингибитора,  $5.1 \pm 0.1$  и  $7.2 \pm 0.1$  в присутствии радикального соединения (III).

Ингибирующий эффект нитроксильного радикала (III) при различных концентрациях линолевого спирта демонстрируют зависимости, представленные на рис. 3. Видно, что в присутствии 0.1 мкМ оксила (III) и при концентрациях линоле-

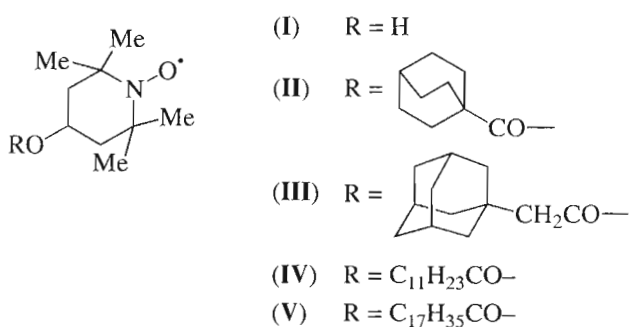


Схема 2. Нитроксильные радикалы (I)–(V).

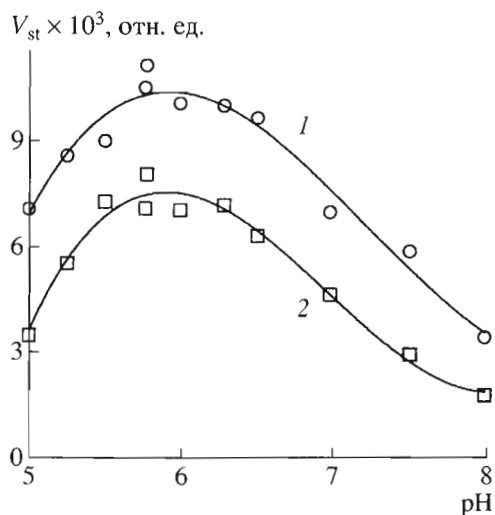
вого спирта, превышающих 40 мкМ, стационарная скорость липоксигеназной реакции по сравнению с данными контрольных опытов снижается более, чем в два раза.

Кажущиеся значения  $IC_{50}$  ингибирования 5-липоксигеназы свободными радикалами (II)–(V) были рассчитаны из зависимостей остаточной активности 5-липоксигеназы от концентрации эффектора. Для ингибиторов (II)–(V) они составляют (мкМ): для (II) – 0.23; (III) – 0.06; (IV) – 0.08; (V) – 0.28; в таких же условиях опытов  $IC_{50}$  ингибирования оксидом (I) равняется 12.6 мкМ, что более, чем на два порядка выше.

Исследование ингибирующего действия свободных радикалов (I)–(V) на активность 5-липоксигеназы выполнено в системе, содержащей Lubrol PX и додецилсульфат натрия. Важно отметить, что взаимодействие ингибиторов со смешанными мицеллами приводило к изменению вращатель-

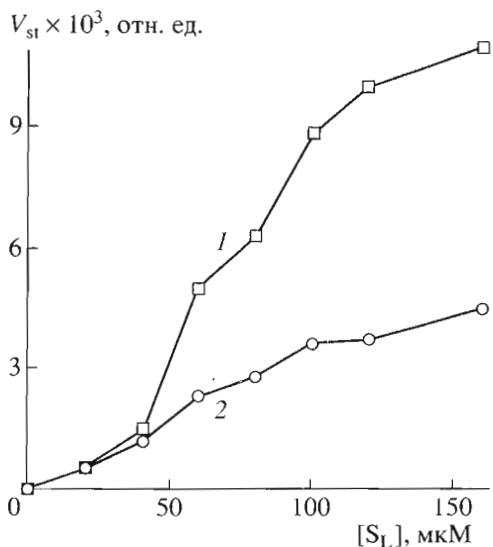


Рис. 1. Ингибирование 5-липоксигеназы 4-гидрокси-ТЕМРО (1) и 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-овым эфиром адамантил-1-уксусной кислоты (III) (2). Концентрация линолевого спирта 0.12 мМ.



**Рис. 2.** pH-Зависимость стационарной скорости катализируемого 5-липоксигеназой окисления 0.12 мМ линолевого спирта в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0.029 мкМ 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-ового эфира адамантил-1-уксусной кислоты (III).

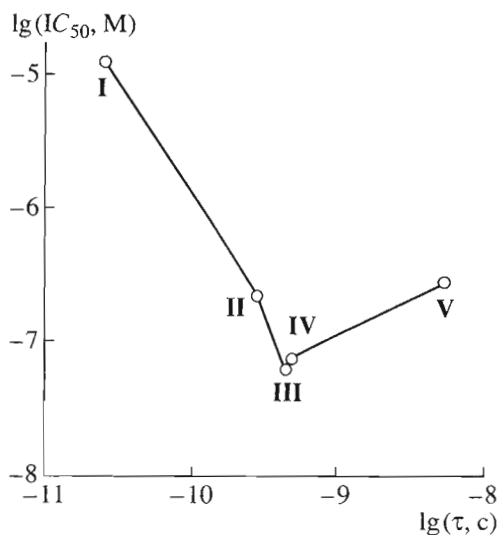
ной подвижности свободных радикалов. Рассчитанные из формы спектров ЭПР кажущиеся времена корреляции вращательной диффузии составляли значения порядка  $10^{-11}$  с для соединения (I) и  $5 \times 10^{-10} - 5 \times 10^{-9}$  с в случае нитроксильных радикалов (II)–(V). То есть, 4-гидрокси-ТЕМРО (I) в условиях реакции характеризовался значи-



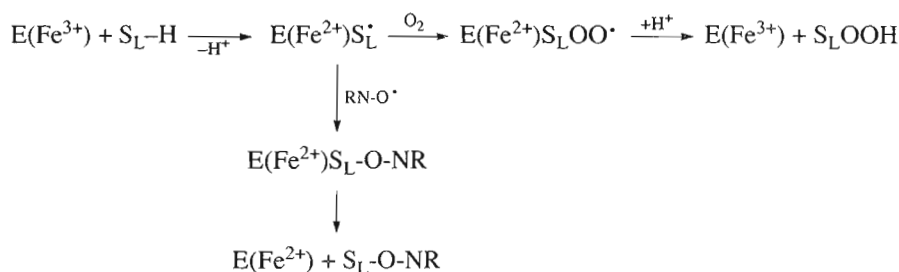
**Рис. 3.** Зависимость стационарной скорости липоксигеназной реакции от концентрации линолевого спирта в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0.1 мкМ 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-ового эфира адамантил-1-уксусной кислоты (III).

тельной частотой вращения, тогда как наличие гидрофобного сложноэфирного фрагмента в структуре нитроксильного радикала приводило к заметному уменьшению его подвижности. Сравнение значений  $IC_{50}$  и кажущихся времен корреляции вращательной диффузии в ряду соединений (I)–(IV) (рис. 4) свидетельствует об увеличении эффекта ингибирования с увеличением степени локализации нитроксильного радикала в мицелле. Отклонение в случае 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-ового эфира стеариновой кислоты (V) может быть вызвано его “непродуктивным” связыванием.

В процессе ферментативного окисления линолевого спирта наблюдалось уменьшение интенсивности сигнала ЭПР парамагнитных ингибиторов. Гибель радикалов происходила только в условиях липоксигеназной реакции, а в контрольных опытах в отсутствие фермента интенсивность сигнала ЭПР изменялась мало. Линеаризация кинетических зависимостей гибели радикалов в координатах “логарифм относительной интенсивности сигнала ЭПР – время” позволила оценить наблюдаемую константу скорости псевдопервого порядка, изменяющуюся при переходе от соединения (I) к ингибиторам (II)–(V). Полученные значения наблюдаемых констант скорости гибели нитроксильных радикалов (I)–(V) составляют ( $s^{-1}$ ): для (I) –  $2.3 \times 10^{-5}$ ; (II) –  $1.4 \times 10^{-3}$ ; (III) –  $1.1 \times 10^{-3}$ ; (IV) –  $2.5 \times 10^{-3}$ ; (V) –  $1.8 \times 10^{-3}$ .



**Рис. 4.** Зависимость величины  $IC_{50}$  ингибирования реакции окисления линолевого спирта, катализируемого 5-липоксигеназой, от логарифма времени корреляции вращательной диффузии 4-гидрокси-ТЕМРО (I) и 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-овых эфиров 1-бицикло[2,2,2]октановой (II), адамантил-1-уксусной (III), додекановой (IV) и октадекановой кислот (V).



**Схема 3.** Предполагаемый механизм ингибирования липоксигеназных превращений линолевого спирта гидрофобными нитроксильными радикалами.

В целом, для выяснения механизма ингибирующего действия гидрофобного нитроксильного радикала на активность 5-липоксигеназы в реакции окисления линолевого спирта важными являются следующие факты: снижение  $IC_{50}$  с увеличением кажущегося времени корреляции вращательной диффузии и скорости гибели радикала; отсутствие влияния ингибитора на ионогенные группы, существенные для катализа; слабое изменение остаточной активности фермента при насыщающих концентрациях нитроксильного радикала. Исходя из полученных результатов, предполагаемый механизм ингибирования липоксигеназных превращений линолевого спирта можно представить схемой 3.

Очевидно, спин-меченый ингибитор ( $RN-O\cdot$ ) взаимодействует с радикальным фермент-субстратным комплексом в активном центре фермента. Это взаимодействие конкурирует со стадией присоединения молекулярного кислорода, обеспечивающего образование перекисного радикального интермедиата. Ковалентная модификация промежуточного фермент-субстратного комплекса в результате его рекомбинации с нитроксильным радикалом приводит к нарушению нормального каталитического цикла ферментативной реакции. Нельзя исключить, что формирующийся комплекс  $E(Fe^{2+})S_L-O-NR$  способен медленно распадаться с образованием модифицированного субстрата и 5-липоксигеназы с ионом двухвалентного железа в активном центре. Последующее окисление иона  $Fe^{2+}$  продуктами, содержащимися в реакционной смеси, будет приводить к регенерации активности фермента.

Таким образом, нами продемонстрировано ингибирующее действие липофильных 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-овых эфиров карбоновых кислот в реакции окисления линолевого спирта, катализируемого 5-липоксигеназой из клубней картофеля. Эффективность ингибирования может быть вызвана гидрофобным связыванием парамагнитного эффектора, а также реакционной способностью нитроксила по отношению к алкильному радикалу, промежуточному в ферментативном процессе.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 4-гидрокси-ТЕМРО, линолевый спирт, Lubrol PX (Sigma), додецилсульфат натрия (Fluka, Швейцария). 1-Оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-овый эфир октадекановой кислоты (V) [6] и другие спин-меченые производные насыщенных жирных кислот (II)–(IV) синтезированы взаимодействием 4-гидрокси-ТЕМРО (I) с хлорангидридами соответствующих кислот в бензоле в присутствии триэтиламина. Продукты очищали на колонке с Silicagel L 250, подвижная фаза: хлороформ–бензол (3 : 1). Спектры ЭПР нитроксильных радикалов (I)–(V) регистрировали при 25°C на спектрометре E-3 (Varian), внутренний стандарт  $Mn^{2+}/MgO$ . УФ-спектры сняты в этиловом спирте на спектрофотометре Specord M-40, ИК-спектры – в диметилформамиде на спектрометре Specord M-80.

**1-Оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-овый эфир 1-бицикло[2,2,2]октановой кислоты (II).** Выход 30%, т. пл. 78°C. ИК ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 1726 (C=O). УФ [ $\lambda_{max}$ , нм ( $Ig\epsilon$ )]: 231 (3.78), 420 (1.45). Найдено, %: C 70.29, H 9.64, N 4.61.  $C_{18}H_{30}NO_3$ . Вычислено, %: C 70.09, H 9.80, N 4.54.

**1-Оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-овый эфир адамантил-1-уксусной кислоты (III).** Выход 35%. ИК ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 1732 (C=O). УФ [ $\lambda_{max}$ , нм ( $Ig\epsilon$ )]: 230 (3.91), 418 (1.31). Найдено, %: C 72.51, H 9.78, N 4.07.  $C_{21}H_{34}NO_3$ . Вычислено, %: C 72.37, H 9.83, N 4.02.

**1-Оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-4-овый эфир октадекановой кислоты (IV).** Выход 32%. ИК ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 1736 (C=O). УФ [ $\lambda_{max}$ , нм ( $Ig\epsilon$ )]: 241 (3.81), 422 (1.52). Найдено, %: C 71.31, H 11.38, N 4.27.  $C_{21}H_{40}NO_3$ . Вычислено, %: C 71.14, H 11.37, N 3.95.

**5-Липоксигеназу из клубней картофеля** выделяли по методике, включающей фракционное высаливание сульфатом аммония (25–55%) [7] и последующую гель-фильтрацию на сефадексе G-25. Затем препарат фермента пропускали через (C18)-картридж (B&J, Inc.).

**Кинетические измерения** проводили на спектрофотометре Spereord M-40 при температуре  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Стандартная реакционная смесь (2.5 мл, 0.1 М натрий-фосфатный буферный раствор, рН 6.3) содержала 0.02% Lubrol PX, 0.1 мМ додецилсульфат натрия, 0.025–0.24 мМ линолевый спирт, 0–0.02 ммоль/л нитроксильных радикалов (I)–(V); реакцию инициировали добавлением 10–30 мкг 5-липоксигеназы. Регистрировали увеличение оптического поглощения при 235 нм (максимальное поглощение сопряженного диенового фрагмента в молекуле образующегося гидропероксида,  $\epsilon$  23000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [8]). В связи с наличием лаг-периода в кинетике накопления продукта для оценки активности фермента использовали значения  $V_{st}$  (единица оптического поглощения в минуту, отн. ед.). Для построения рН-зависимостей использовали 0.1 М натрий-ацетатный буфер (рН 5–5.8) и 0.1 М натрий-фосфатный буфер (рН 5.8–8). Приведенные значения  $pK_a$  рассчитаны в соответствии с рН-функцией Михаэлиса [5] по уравнению  $V_{st} = (V_{st})_{opt} / (1 + [H^+]/K_1 + K_2/[H^+])$ , где  $(V_{st})_{opt}$  – стационарная скорость реакции при оптимальном значении рН;  $K_1$  и  $K_2$  – константы диссоциации ионогенных групп фермента. Значения  $IC_{50}$  ингибирования 5-липоксигеназы соединениями (I)–(V) определены при концентрации линолевого спирта 0.12 мМ.

**Регистрация спектров ЭПР** проводилась в ампулах диаметром 1.5 мм. Время корреляции вращательной диффузии радикалов (I)–(V) описывалось закономерностями “быстрого” диффузионного вращения [9]. Кажущиеся значения времени корреляции вращательной диффузии свободного радикала ( $\tau$ ) рассчитаны из формы спектров ЭПР радикалов (I)–(V) (концентрация свободного

радикала в ампуле – 0.01 мМ, 5-липоксигеназы – 0.046 мг/мл) в присутствии 0.02 % Lubrol PX и 0.1 мМ додецилсульфата натрия (в этих условиях интенсивность сигнала ЭПР нитроксильного радикала не изменяется). Скорость гибели нитроксильных радикалов изучена в реакционной смеси, содержащей 0.02% Lubrol PX, 0.1 мМ додецилсульфат натрия, 0.12 мМ линолевый спирт и 5-липоксигеназу (0.046 мг/мл). Начальную интенсивность сигнала ЭПР принимали за 100%.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jakobsson P., Shaskin P., Larsson P., Feltenmark S., Odlander B., Aguilar-Santelises M., Jondal M., Biberfeld P., Claesson H. // Eur. J. Biochem. 1995. V. 232. P. 37–46.
2. Ghosh J., Myers C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13182–13187.
3. Butovich I., Lukyanova S., Reddy C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. V. 249. P. 344–349.
4. Butovich I., Lukyanova S., Reddy C. // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 378. P. 65–77.
5. Харченко О.В., Казачков М.Г., Скатерная Т.Д., Бутович И.А. // Биополимеры и клетка. 2001. Т. 17. С. 147–151.
6. Розанцев Э.Г., Сускина В.И. // Изв. АН. Серия хим. 1969. № 5. С. 1191–1193.
7. Бутович И.А., Бабенко В.М., Ливарчук Л.В., Могилович Т.В., Кухарь В.П. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 1077–1081.
8. Gibian M., Vanderberger B. // Analyt. Biochem. 1987. V. 163. P. 343–349.
9. Бучаченко А.Л., Вассерман А.М. Стабильные радикалы. М.: Химия, 1973.

## Hydrophobic Nitroxyl Radicals Inhibit Linoleyl Alcohol Oxidation by 5-Lipoxygenase

A. I. Vovk<sup>#</sup>, O. V. Kharchenko, A. I. Kharitonenko, V. P. Kukhar, L. V. Babii, M. G. Kazachkov, A. K. Melnyk, and A. N. Khilchevsky

<sup>#</sup>Fax: (38044) 543-5152, e-mail: vovk@bpce.kiev.ua

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Murmanskaya ul. 1, Kiev, 02094 Ukraine

The linoleyl alcohol oxidation catalyzed by potato tuber 5-lipoxygenase was found to be efficiently inhibited by stable nitroxyl radicals: 1-oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl 1-bicyclo[2,2,2]octane-1-carboxylate, 1-adamantylacetate, dodecanoate, and octadecanoate. The dependence of apparent  $IC_{50}$  values on the rotational correlation times of times of 4-hydroxy-1-oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine and its derivatives in model micellar systems was analyzed. The inhibition mechanism was proposed; it involves the interaction of hydrophobic nitroxyl radical with the intermediate radical enzyme–substrate complex. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* inhibition, linoleyl alcohol, lipoxygenase, nitroxyl radical