



ПИСЬМА
РЕДАКТОРУ

УДК 547.392.52.057:577.152.113*111.2.037

**СЕРОТОНИНАМИД АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ –
НЕОБРАТИМЫЙ ИНГИБИТОР СОЕВОЙ 15-ЛИПОКСИГЕНАЗЫ**

© 1996 г. В. В. Безуглов[#], А. В. Арчаков, М. Ю. Бобров, Г. С. Когтева, Е. М. Маневич*

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;*

** Отдел радиационной онкологии медицинского центра Пенсильванского университета,
Филадельфия, США*

Поступило в редакцию 21.06.96 г.

Описано ацилирование 5-гидрокситриптамина (серотонина) и его аналогов – триптамина и 5-метокситриптамина арахидоновой кислотой. Показано, что полученные замещенные амиды ингибируют окисление арахидоновой кислоты соевой 15-липоксигеназой и не являются субстратами этого фермента. Установлено, что серотонинамид арахидоновой кислоты необратимо инактивирует липоксигеназу по двустадийному механизму.

Ключевые слова: арахидоновая кислота; амиды жирных кислот; соевая 15-липоксигеназа, ингибиторы; серотонин.

Работами последнего времени установлено, что амидные производные жирных кислот составляют, по-видимому, новый класс липидных биорегуляторов. Так, было показано, что актиномицеты синтезируют амиды различных жирных кислот, эффективно ингибирующие секретлируемые фосфолипазы A_2 из различных источников [1]. Этаноламид арахидоновой кислоты (анандамид) является эндогенным лигандом каннабиноидных рецепторов [2], а природный этаноламид пальмитиновой кислоты повышает неспецифическую устойчивость к различным бактериальным токсинам и травматическому шоку [3, 4]. Из производных ненасыщенных жирных кислот с другими аминами следует упомянуть синтетические жирнокислотные аналоги капсаицина, из которых амид олеиновой кислоты с ванилинамином обладает высокой анальгезирующей и противовоспалительной активностью [5].

Недавно нами была предложена новая группа липидных биорегуляторов – искусственно функционализированные жирные кислоты, представляющие собой амиды полиненасыщенных жирных кислот с биологически активными аминами, например серотонином [6]. Продолжая наши исследования липоксигеназного окисления амидов полиненасыщенных жирных кислот [7], в настоящем сообщении мы описываем модулирование активности соевой 15-липоксигеназы (15-LO) серото-

нинамидом арахидоновой кислоты и родственными соединениями.

Амиды арахидоновой кислоты (I)–(III) с 5-гидрокситриптамином, 5-метокситриптамином и триптамином соответственно синтезировали по методу смешанных ангидридов с изобутиловым эфиром угольной кислоты, как описано ранее [8]. Продукты реакции очищали хроматографией на силикагеле (Kieselgel G 60, Merck, Германия). Серотонинамид (I) получен с выходом 45% в виде бесцветного масла, R_f 0.25 (бензол–ацетон, 5 : 1, система А). 1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0.90 (3H, т, $J_{20,19}$ 7 Гц, H₂₀), 1.30 (4H, м, H₁₈, H₁₉), 1.36 (2H, м, H₁₇), 1.69 (2H, м, H₃), 2.07 (4H, м, H₄, H₁₆), 2.14 (2H, т, $J_{2,3}$ 8 Гц, H₂), 2.81 (6H, м, H₇, H₁₀, H₁₃), 2.91 (2H, т, $J_{2,1}$ 7 Гц, H₂'), 3.58 (2H, дт, $J_{1,2}$ 7, $J_{1,NH}$ 6 Гц, H₁'), 5.36 (8H, м, H₅, H₆, H₈, H₉, H₁₁, H₁₂, H₁₄, H₁₅), 5.55 (1H, с, NH), 6.61 (1H, дд, $J_{6,7}$ 9.0, $J_{6,4}$ 2.5 Гц, H₆"), 7.00 (1H, с, H₂"'), 7.03 (1H, д, $J_{4,6}$ 2.5 Гц, H₄"'), 7.22 (1H, д, $J_{7,6}$ 9.0 Гц, H₇"'), 7.94 (1H, с, H₁"'). Масс-спектр*: 463 ([M + H]⁺).

5-Метокситриптаминамид (II) получен с выходом 38% в виде бесцветного масла, R_f 0.40 (А). 1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0.90 (3H, т, $J_{20,19}$ 7 Гц, H₂₀), 1.30 (4H, м, H₁₈, H₁₉), 1.36 (2H, м, H₁₇), 1.69 (2H, м, H₃), 2.07 (4H, м, H₄, H₁₆), 2.13 (2H, т, $J_{2,3}$ 8 Гц, H₂), 2.82 (6H, м, H₇, H₁₀, H₁₃), 2.95 (2H, т, $J_{2,1}$ 7 Гц, H₂'), 3.57 (3H, с, OMe), 3.62 (2H, дт, $J_{1,2}$ 7, $J_{1,NH}$ 6 Гц, H₁'), 5.37 (8H, м, H₅, H₆, H₈, H₉, H₁₁, H₁₂, H₁₄, H₁₅),

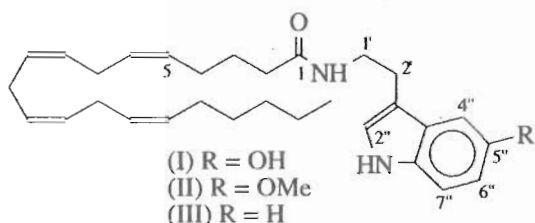
Сокращения: 15-NPETE – (5Z,8Z,11Z,13E)-15-гидропероксиэйкоза-5,8,11,13-тетраеновая кислота, 15-LO – соевая 15-липоксигеназа.

[#] Автор для переписки. Факс: (095) 335-71-03, электронная почта: vvbez@ibch. siobc. ras. ru (Internet).

* Масс-спектры получены в режиме ионизации быстрыми атомами с использованием в качестве матрицы *n*-нитро-бензилового спирта на приборе MS 50 TC (Kratos).

5.48 (1H, с, NH), 6.89 (1H, дд, $J_{6'',7''}$ 9.0, $J_{6'',4''}$ 2.5 Гц, H6''), 7.02 (1H, с, H2''), 7.05 (1H, д, $J_{4'',6''}$ 2.5 Гц, H4''), 7.27 (1H, д, $J_{7'',6''}$ 9.0 Гц, H7''), 7.95 (1H, с, H1''). Масс-спектр: 477 ([M + H]⁺).

Триптаминамид (III) получен с выходом 45% в виде бесцветного масла, R_f 0.43 (А). ¹H-ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0.90 (3H, т, $J_{20,19}$ 7 Гц, H20), 1.30 (4H, м, H18, H19), 1.36 (2H, м, H17), 1.69 (2H, м, H3), 2.07 (4H, м, H4, H16), 2.12 (2H, т, $J_{2,3}$ 8 Гц, H2), 2.81 (6H, м, H7, H10, H13), 2.97 (2H, т, $J_{2,1'}$ 7 Гц, H2'), 3.63 (2H, дт, $J_{1',2'}$ 7, $J_{1',NH}$ 6 Гц, H1'), 5.37 (8H, м, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H14, H15), 5.47 (1H, с, NH), 7.07 (1H, с, H2''), 7.14 (1H, т, J 8 Гц, H5'' или H6''), 7.22 (1H, т, J 8 Гц, H5'' или H6''), 7.38 (1H, д, J 8 Гц, H4'' или H7''), 7.62 (1H, д, J 8 Гц, H4'' или H7''), 8.07 (1H, с, H1''). Масс-спектр: 447 ([M + H]⁺).



Степень ингибирования липоксигеназного окисления определяли по изменению начальной скорости окисления арахидоновой кислоты в присутствии ингибитора. Для этого раствор соединений (I)–(III) и фермента (КФ 1.13.11.12, тип I, 130000 ед. акт./мг белка; Sigma, США) с концентрацией 10 и 5 мкг/мл соответственно в боратном буфере (0.2 М, рН 9.0, буфер Б) выдерживали при комнатной температуре от 5 мин до 3 ч, отбирали 1 мл, смешивали с 1 мл раствора арахидоновой кислоты (20 мкг/мл) в буфере Б и фиксировали оптическое поглощение на спектрофотометре Ultraspres II (ЛКВ, Швеция) при длине волны 237 нм. В экспериментах по обращению ингибирования с помощью диализа смесь, содержащую 15-ЛО и ингибитор (оба в концентрации 10 мкг/мл), и контрольную смесь, не содержащую его, инкубировали 2.5 ч при комнатной температуре и диализовали против буфера Б в течение 20 ч при 6°C. Затем определяли начальную скорость окисления арахидоновой кислоты, как описано выше.

При инкубации серотонинамида арахидоновой кислоты (I) с 15-ЛО не было отмечено образования продуктов его окисления. ТСХ липидного экстракта инкубационной среды (в системе А) показала наличие только исходных соединений. В УФ-спектрах реакционной смеси липоксигеназного окисления амидов (I)–(III) не отмечено характерного поглощения диенового хромофора при λ 237 нм [9], которое появлялось лишь после добавления арахидоновой кислоты (см. рис. 1). Таким образом, было установлено, что амиды арахидоновой кислоты с триптамином и его окси- и метоксипроизводными (I)–(III) не являются субстратами 15-ЛО.

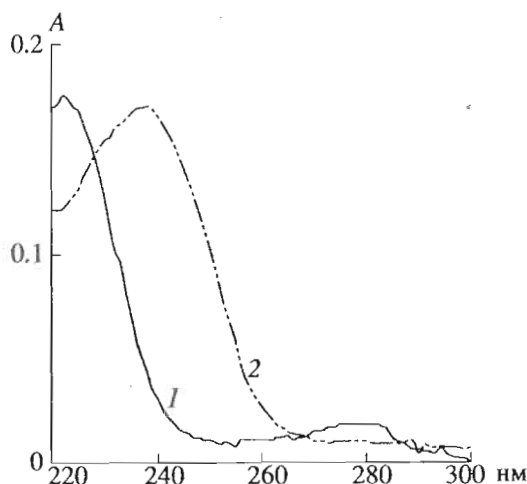


Рис. 1. УФ-спектр инкубационной смеси окисления 21.5 мкМ серотонинамида (I) ~22 нМ 15-липоксигеназой в буфере Б через 30 мин инкубации при 24°C (I). Кривая 2 представляет собой разность УФ-спектра той же смеси в присутствии 16 мкМ арахидоновой кислоты и кривой 1.

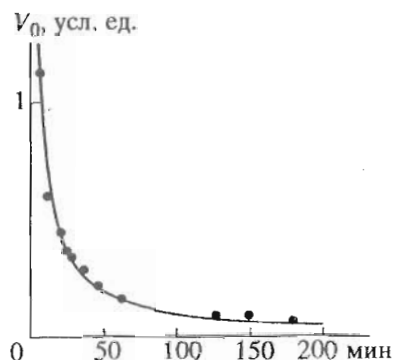


Рис. 2. Зависимость начальной скорости липоксигеназного окисления арахидоновой кислоты от времени преинкубации фермента с серотонинамидом арахидоновой кислоты (I); кривая представляет собой аппроксимацию экспериментальных данных по уравнению (1).

Добавление серотонинамида (I) к ферменту одновременно с арахидоновой кислотой не оказывает заметного влияния на выход продукта ее окисления (15-НРЕТЕ), тогда как предварительная инкубация 15-ЛО с серотонинамидом (I) приводит к понижению скорости окисления арахидоновой кислоты (см. рис. 2). Продолжительная инкубация 15-ЛО с серотонинамидом (I) (более 5 ч) вызывает практически полное ингибирование фермента, тогда как в контроле 15-ЛО сохраняла высокую липоксигеназную активность. Более того, диализ образца 15-ЛО, инактивированной серотонинамидом (I), не приводил к восстановлению липоксигеназной активности. Из этого можно заключить, что ингибирование 15-ЛО серотонинамидом (I) необратимо.

Зависимость начальной скорости реакции окисления арахидоновой кислоты 15-ЛО от времени

преинкубации с серотонинамидом (I) может быть аппроксимирована кривой вида

$$V_0(t) = \frac{1}{\alpha + \beta t} \quad (1)$$

(см. рис. 2). Гиперболический вид кривой может быть объяснен в предположении, что ингибирование двустадийно (уравнение 2):



где E – свободный фермент, I – свободный ингибитор, (E ~ I) – временный ассоциат фермента и ингибитора, E* – инактивированный фермент. Первая стадия представляет собой обратимую ассоциацию ингибитора и фермента, а вторая – необратимую инактивацию фермента связанным ингибитором. Для первой стадии константа диссоциации

$$K = \frac{[E][I]}{[(E \sim I)]}$$

Для второй стадии имеем

$$\frac{d[E^*]}{dt} = k[(E \sim I)]^2 \quad (3)$$

Принимая концентрацию работоспособного фермента $[\tilde{E}] = [E] + [(E \sim I)]$ и учитывая, что $[I] \gg [E]$, интегрированием уравнения (3) получаем

$$[\tilde{E}(t)] = \frac{1}{\frac{1}{[\tilde{E}(0)]} + k \left(\frac{[I]}{[I] + K} \right)^2 t}$$

Так как начальная скорость липоксигеназного окисления арахидоновой кислоты (V_0) пропорциональна величине $[\tilde{E}]$, а $[I] \approx \text{const}$, получаем уравнение (1).

Амиды (II) и (III), будучи обратимыми ингибиторами 15-ЛО с $K_i \approx 20$ мкМ, не проявляли вышеуказанной зависимости начальной скорости ли-

поксигеназного окисления арахидоновой кислоты от времени преинкубации с ферментом. Из этого можно заключить, что наличие свободной гидроксильной группы в индольном фрагменте существенно для проявления серотонинамидом (I) способности к необратимому ингибированию 15-ЛО.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 0449191). Авторы выражают благодарность А.В. Сулиме (ИБХ РАН) за измерение масс-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jain M.K., Ghomashchi F., Yu B.Z., Bayburt T., Murphy D., Houck D., Brownell J., Reid J.C., Solowiej J.E., Wong S.M., Mocek U., Jarrell R., Sasser M., Gelb M.H. // J. Med. Chem. 1992. V. 35. P. 3584–3586.
2. Devane W.A., Hanuš L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. // Science. 1992. V. 258. P. 1946–1949.
3. Raskova H., Masek K. // Therapie. 1967. V. 22. P. 1241–1246.
4. Raskova H., Masek K., Linet O. // Toxicon. 1972. V. 10. P. 485–490.
5. Janusz J.M., Buckwalter B.L., Young P.A., LaHann T.R., Farmer R.W., Kasting G.B., Loomans M.F., Kerckaert G.A., Maddin C.S., Berman E.F., Bohne R.L., Cupps T.L., Milstein J.R. // J. Med. Chem. 1993. V. 35. P. 2595–2606.
6. Bezuglov V.V. // IUPAC Third International Symposium on Bioorganic Chemistry. Abstracts. Dagomys, Russia, 1995. P. 25.
7. Бобров М.Ю., Арчаков А.В., Когтева Г.С., Фомина-Агеева Е.В., Зинченко Г.Н., Грецькая Н.М., Куклев Д.В., Безуглов В.В. // Биооргани. химия. 1996. Т. 22. С. 875–877.
8. Куклев Д.В., Безуглов В.В. // Биооргани. химия. 1994. Т. 20. С. 67–70.
9. Graff G., Anderson L.A., Jaques L.W. // Anal. Biochem. 1990. V. 188. P. 38–47.

Serotoninamide of Arachidonic Acid as an Irreversible Inhibitor of Soybean 15-Lipoxygenase

V. V. Bezuglov*, A. V. Archakov*, M. Yu. Bobrov*, G. S. Kogteva*, and E. M. Manevich**

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia

**Department of Radiation Oncology, Medical Center of Pennsylvania State University, Philadelphia, USA

Abstract—Acylation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) and its analogues, tryptamine and 5-methoxytryptamine, with arachidonic acid is described. It has been shown that the substituted amides synthesized inhibit oxidation of arachidonic acid by soybean 15-lipoxygenase and are not the substrates of this enzyme. It has been found that serotoninamide of arachidonic acid irreversibly inactivates lipoxygenase by a two-step mechanism.

Key words: arachidonic acid; fatty acid amides; soybean 15-lipoxygenase; inhibitors; serotonin.

Сдано в набор 05.07.96 г.

Подписано к печати 04.10.96 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 20.0

Усл. кр.-отг. 8.0 тыс.

Уч.-изд. л. 21.0

Бум. л. 10.0

Тираж 390 экз.

Зак. 534