



УДК 547.426.2.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ФОСФАТИДИЛНУКЛЕОЗИДОВ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФОСФОЛИПАЗ© 2000 г. Т. И. Новожилова, С. И. Малекин, В. И. Кожухов, Ю. Л. Кругляк[#], В. К. КурочкинГосударственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии,
111024, Москва, шоссе Энтузиастов, 23

Поступило в редакцию 22.09.99 г. Принято к печати 03.11.99 г.

Для выявления возможных внутриклеточных превращений фосфатидилнуклеозидов – 5'-(*rac*-1-гексадецил-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо)производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина и 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидина – изучен их гидролиз под действием фосфолипаз (PL) A₂, C, D. Показано, что PLA₂ вызывает дезацилирование в положении 2 глицеринового остатка, PLC неактивна, а PLD полностью гидролизует фосфатидилнуклеозиды с выделением свободных нуклеозидов.

Ключевые слова: нуклеозид; фосфатидилнуклеозид; фосфолипаза; анти-ВИЧ-активность.

При поиске химиотерапевтических средств против вируса иммунодефицита человека наряду с разработкой принципиально новых соединений не прекращаются попытки модифицировать хорошо известные анти-ВИЧ-препараты на основе аналогов нуклеозидов AZT, ddC, ddI, d4T и др. [1]. В частности, замена водорода в положении 5' этих нуклеозидов на остаток фосфатидовой кислоты, родственной фосфолипидам клеточных мембран, позволила получить ряд высокоактивных анти-ВИЧ-агентов, проникающих внутрь лимфоцитов [2–4]. Это породило предположение, что проникшие в клетку фосфатидилнуклеозиды в результате гидролиза под действием фосфолипаз (PL) способны выделять свободные нуклеозиды, ингибирующие воспроизводство вирусов. Проверке этого предположения и посвящено настоящее исследование.

В качестве фосфатидилнуклеозидов использованы 5'-(*rac*-1-гексадецил-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-3'-азидо-3'-дезокситимидин (I) и 5'-(*rac*-1-гексадецил-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин (II). Эти два синтезированных нами фосфорорганических соединения при анти-ВИЧ-испытаниях в опытах *in vitro* проявили активность на уровне свободных нуклеозидов, входящих в их состав (AZT и d4T соответственно [5]). Действие PLA₂ изучалось с целью выяснения способности иссле-

дуемых синтетических липидов к внутриклеточному метаболизму.

Фосфатидилнуклеозиды (I) и (II) были получены из пиридиниевой соли *rac*-1-гексадецил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфорной кислоты и соответствующих нуклеозидов (AZT или d4T) по описанной методике [5, 6].

В работе использованы бактериальные фосфолипазы: PLA₂, PLC, PLD, имитирующие фосфолипазы лимфоцитов. Известно, что по ряду параметров (субстратная специфичность, pH-оптимум и др.) бактериальные фосфолипазы, аналогичны фосфолипазам клеток животных [7, 8]. Характеристики фосфолипаз:

– фосфолипаза A₂ (фосфатидилхолин-2-ацетилгидролаза, КФ 3.1.1.4) выделена из яда пчелы *Apis mellifera* с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50sf [6]; активность 800 мкмоль/(мг мин);

– фосфолипаза C (фосфатидилхолин – холинфосфогидролаза, КФ 3.1.4.3), тип III, из *Bacillus cereus* (Sigma, США), активность 120 мкмоль/(мг мин);

– фосфолипаза D (фосфатидилхолин – фосфатидогидролаза, КФ 3.1.4.4), тип IV, из *Streptomyces chromophuscus* (Sigma, США); активность 44 мкмоль/(мг мин).

Растворы фосфолипидов (I), (II) (1 мг/мл) в 0.05 М Трис-НСI-буфере, pH 8.0, содержащем 0.02 М CaCl₂ и Тритон X-100 (6.15 г/л) (буфер А), подвергали ультразвуковой обработке (2 × 5 мин) при 0°С.

Реакционная смесь содержала 0.1 мл подготовленного раствора фосфолипида и аликвоту фермента в буфере А: 10 мкл (1 мг/мл) фосфолипазы

Сокращения: AZT – 3'-азидо-3'-дезокситимидин; ddC – 2',3'-дидезоксицитидин; ddI – 2',3'-дидезоксиинозин; d4T – 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокситимидин; PLA₂, PLC и PLD – фосфолипазы A₂, C и D; ЯФХ – фосфатидилхолин яичного желтка.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 273-87-53).

фатидовой кислоты R_f 0.19, для нуклеозидов – 0.72–0.80.

Проведенное исследование позволяет с высокой вероятностью полагать, что фосфатидилнуклеозиды, преодолевшие клеточную мембрану лимфоцита, могут подвергаться гидролизу под действием внутриклеточных фосфоэстераз с образованием свободного нуклеозида, который, блокируя обратную транскриптазу, вызывает ингибирование воспроизводства ВИЧ-1 в инфицированном лимфоците. Механизм антивирусного действия нуклеозидов и их фосфатидильных производных, вероятно, идентичен. Мы полагаем, что наблюдаемые в ряде случаев факты более высокой анти-ВИЧ-активности фосфатидилированных нуклеозидов по сравнению со свободными (например, концентрация, вызывающая 100%-ное ингибирование репродукции ВИЧ-1, для d4T составляет 1.34 нмоль/мл, а для его фосфатидильного производного 0.59 нмоль/мл [5]) объясняются их более легким трансмембранным переходом в клетку (несмотря на более высокую молекулярную массу).

Работа выполнена при поддержке Международного научно-технического центра (грант № 127).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *De Clercq E.* // *Med. Chem.* 1995. V. 38. P. 2491–2517.
2. *Hostetler K.Y., Stuhmiller L.M., Lenting H.B.M., van den Bosch H., Richman D.D.* // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 6112–6117.
3. *Водовозова Е.Л., Павлова Ю.Б., Полушкина М.А., Ржанинова А.А., Гараев Н.Н., Молотковский Ю.Г.* // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. С. 451–457.
4. *Piantadosi C., Marasco C.J., Morris-Nataschke S.L., Meyer K.L., Gumus F., Surles J.R., Ishaq K.S., Kucera L.S., Iyer N., Wallen C.A., Piantadosi S., Modest E.J.* // *J. Med. Chem.* 1991. V. 34. P. 1408–1414.
5. *Малекин С.И., Круглыак Ю.Л., Хромова Н.Ю., Аксенова М.Ю., Соколов В.П., Кисин А.В., Новожилова Т.И., Попова С.Г., Курочкин В.К., Миллер Г.Г., Покидышева Л.Н.* // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 648–654.
6. *Shkenderov S.* // *Animal, Plant and Microbial Toxins / Eds Ohsaka A., Hayashi K., Sawai Y. N.Y.*: Plenum Press, 1976. V. 2. P. 319–336.
7. *Imamura S., Horiuchi Y.* // *J. Biochem.* 1979. V. 85. P. 79–85.
8. *De Pierre J.W., Ernster L.* // *Ann. Rev. Biochem.* 1977. V. 46. P. 201–262.

The Phospholipase-Induced Degradation of Phosphatidyl nucleosides

T. I. Novozhilova, S. I. Malekin, V. I. Kozhukhov, Yu. L. Kruglyak[#], and V. K. Kurochkin

State Research Institute of Organic Chemistry and Technology, sh. Entuziastov 23, Moscow, 111024 Russia

Hydrolysis of phosphatidyl nucleosides, 5'-(*rac*-1-hexadecyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoryl)-3'-azido-3'-deoxythymidine and -2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine, effected by phospholipases (PL) A₂, C, and D was studied to reveal the metabolism of these derivatives. It was shown that PLA₂ deacetylates the glycerol residue at position 2, PLC is inactive, and PLD hydrolyzes the phosphatidyl nucleosides to give free nucleosides.

Key words: anti-HIV activity, nucleoside, phosphatidyl nucleoside, phospholipase

[#] To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 273-8753.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 3. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru>.

Сдано в набор 26.11.99 г.

Подписано к печати 31.01.2000 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 10.0

Усл. кр.-отт. 2.7 тыс.

Уч.-изд. л. 10.4

Бум. л. 5.0

Тираж 254 экз.

Зак. 3374

Свидетельство о регистрации № 0110214 от 08.02.93 г. в Министерстве печати и информации Российской Федерации
Учредители: Российская академия наук, Отделение биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений РАН, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Адрес издателя: 117864, Москва, Профсоюзная ул., 90

Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099, Москва, Шубинский пер., 6