АКТИВНОСТЬ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 В ПРИСУТСТВИИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ НУКЛЕОЗИДОВ

Лях А.В.[1], Литвинко Н.М.[2], Михайлопуло И.А.[2], Зинченко А.И.[3], Герловский Д.О.[1,2]
[1]Белорусский государственный университет, Минск,
annaliakh91@gmail.com
[2]Институт биоорганической химии НАН Беларуси
[3]Институт микробиологии НАН Беларуси

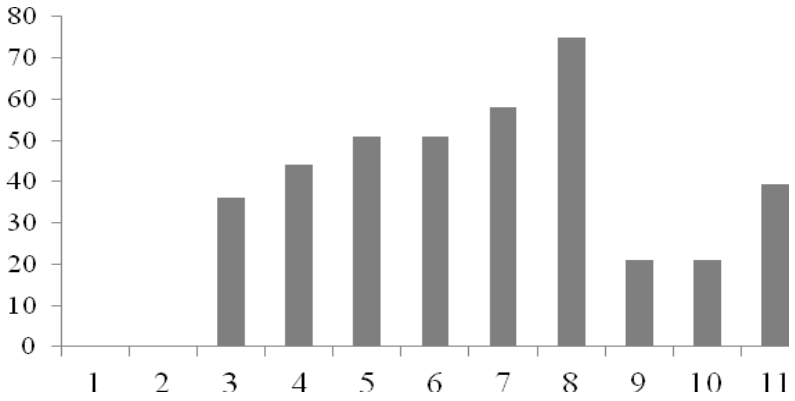
Модифицированные нуклеозиды – одна из наиболее важных групп лекарственных препаратов в онкологии. Однако использование таких препаратов имеет ряд побочных эффектов, например, действие на здоровые быстро делящиеся клетки, что обуславливает высокую токсичность и ограничения в использовании данных соединений. Для устранения названных недостатков было предложено использовать модифицированные нуклеозиды, конъюгированные с фосфолипидами, активация которых происходит непосредственно в очаге патологии и, таким образом, снижается токсичность по отношению к клеткам других органов и тканей [1].

В Институте биоорганической химии НАН Беларуси были синтезированы аналоги пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов, соединения **2**-**22** (таблица 1). Часть из синтезированных соединений чужеродны для организма и могут являться эффекторами по отношению к ферментам метаболизма, и, в первую очередь, липолиза, поскольку в дальнейшем планируются к использованию в составе модифицированных фосфолипидов [2, 3]. Ранее нами показано, что конъюгаты фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина с рядом модифицированных нуклеозидов, подвергаются гидролизу фосфолипазой A_2 (ФЛА$_2$, КФ 3.1.1.4) в разной степени. Обнаружено, что субстратные свойства таких конъюгатов по отношению к ФЛА$_2$ зависят от нуклеозидной составляющей [4].

Целью настоящей работы являлось изучение эффекторного действия модифицированных аналогов нуклеозидов, используемых в качестве лекарственных препаратов, по отношению к ферменту метаболизма ФЛА$_2$, для установления структур, подходящих для использования в качестве биоконъюгатов с фосфолипидами. Для достижения указанной цели использовался метод диффузии фермента в агарозный гель после преинкубации с модифицированными нуклеозидами и их природными аналогами, используемыми в качестве лекарственных препаратов (таблица 1). Среди исследованных соединений найдены ингибиторы реакции липолиза с участием ФЛА$_2$ (рисунок 1).

Таблица 1 – Аналоги пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов синтезированные для дальнейшего включения в состав молекулы фосфолипида

Модифицированные нуклеозиды, используемые в качестве лекарственных препаратов		Количество, мкмоль/лунку	Природные аналоги модифицированных нуклеозидов		Количество, мкмоль/лунку
1	Контроль				
2	2-FU (2'-фторуридин)	15	**12**	2'-d Ado (2'-дезоксиаденозин)	15
3	BVDU (бривудин)	15	**13**	Ado (аденозин)	15
4	6GTD (6-тио-2'-дезокси-гуанозин)	4	**14**	2'-dGuo (2'-дезоксигуанозин)	15
5	Кинетин	4	**15**	Guo (гуанозин)	15
6	Флударабин	4	**16**	2'-dCyd (2'-дезоксицитидин)	15
7	Неларабин	4	**17**	Cyd (цитидин)	15
8	5-BrU (5-бром-уридин)	15	**18**	Thd (тимидин)	15
9	Кладрибин	15	**19**	Ribo-Thd (2'-гидрокситимидин)	15
10	2Fado (2-фтор-аденозин)	15	**20**	2-dUrd (2'-дезоксиуридин)	15
11	2ClAdo (2-хлор-аденозин)	15	**21**	Urd (уридин)	15
			22	Ino (инозин)	15



Условия реакции: агарозная пластинка с желтковой эмульсией, объем лунки = 70 мкл, C(ФЛА$_2$) = 5 мкг на лунку, соединения 2-11 = 4-15 мкмоль на лунку, преинкубация фермента с эффектором 24 часа, [Ca^{2+}]= 0,2 мкмоль/мг ФЛА2, 0,05 М Трис-HCl-буферный раствор, pH 8,0, инкубация в течение 24 ч при t°=50°C.

Рисунок 1 – Действие модифицированных нуклеозидов на ФЛА$_2$, (% ингибирования) при диффузии в липид-содержащий гель.

Диффузия фермента в агарозный гель в присутствии природных аналогов модифицированных нуклеозидов **12**-**22** не обнаружила значительного ингибирующего эффекта по отношению к липолизу с участием ФЛА$_2$. Наибольший ингибирующий эффект оказало соединение 5-BrU (**8**), менее выраженное действие оказали соединения кинетин (**5**), флударабин (**6**),

неларабин (7) (75, 51, 51, 57 % снижение активности фермента, соответственно), которые могут быть отобраны для дальнейшей биоконъюгации с фосфолипидами и исследований метаболизма в составе конъюгированных препаратов.

Работа выполнена в рамках отдельного проекта фундаментальных и прикладных научных исследований НАН Беларуси, ПБП № 116-12-03-2019.

Литература

1. Gandhi , V. Clofarabine and nelarabine: two new purine nucleoside analogs / V. Gandhi, W.Plunkett // CurrOpinOncol. – 2006, №6, P. 580-590.

2. Mikhailopulo, I. New Trends in Nucleoside Biotechnology / I.A. Mikhailopulo, I. Miroshnikov // ActaNaturae. – 2010, №2, P. 39-56.

3. Opitz, P. Modified Nucleosides - Molecular Markers Suitable for Small-volume Cancer /P. Opitz, O. Herbarth, A. Seidel Anticancer Reseach. – 2018, №38, P. 613-619.

4. Литвинко Н.М., Кучуро С.В., Рахуба Г.Н., Скоростецкая Л.А., Калиниченко Е.Н., Жерносек Е.В. Действие фосфолипаз на химерные субстраты, созданные на основе фосфолипидов и компонентов нуклеиновых кислот // ДАН Беларуси.- 2005. Т.49, № 4, С.70-73.