

УДК 547.9:615.37

Ингибирование обратной транскриптазы ВИЧ-1 фенольными соединениями солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

Т. В. ИЛЬИНА¹, Е. А. СЕМЕНОВА¹, Т. Н. ИЛЬЧЕВА¹, Т. Р. ПРОНЯЕВА¹,
А. Г. ПОКРОВСКИЙ¹, Э. Э. ШУЛЬЦ², Г. А. ТОЛСТИКОВ²

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор",
пос. Кольцово Новосибирской обл. 633159 (Россия)

²Новосибирский институт органической химии имени Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН,
проспект Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090 (Россия)

E-mail: schultz@nioch.nsc.ru

(Поступила 23.04.2001; после доработки 24.05.2001)

Аннотация

Получены данные об иммуностимулирующей и анти-ВИЧ активности индивидуальных фенольных компонентов солодки уральской. Определена ингибирующая активность индивидуальных фенольных компонентов – ликопиранокумарина и ликвиритина – в отношении обратной транскриптазы (ОТ) с использованием рекомбинантной ОТ дикого типа, а также ее мутантных форм, содержащих аминокислотные замены, обуславливающие устойчивость к азидотимидину (АЗТ). Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения вышеперечисленных соединений (или их структурных аналогов) для ингибирования АЗТ-резистентных мутантов ВИЧ.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых ненуклеозидных препаратов – ингибиторов обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) – в последнее время приобретает все большее значение ввиду высокой способности этого вируса проявлять резистентность к действию применяемых анти-ВИЧ лекарств. Ненуклеозидные соединения составляют многочисленный класс потенциальных ингибиторов репликации ВИЧ. Эти соединения могут ингибировать различные стадии вирусной репродукции, включая этап обратной транскрипции вирусной нуклеиновой кислоты. Как правило, эти препараты менее токсичны для клеток организма, чем нуклеозидные ингибиторы, из-за отсутствия ингибирующего действия на клеточные ДНК полимеразы [1].

К ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ относятся соедине-

ния различных структурных типов: замещенные пиримидины, имидазолбензодиазепины, индолобензодиазепины, хиназолиноны, бензоксазиноны, индолопиперазины, тиазолоизоиндолы, тиентиадиазины [2]. Необходимым структурным фрагментом перечисленных гетероциклических соединений зачастую является алкоксильный, циклопропильный или пренильный заместитель. К перспективным кислородсодержащим полифункциональным ингибиторам ВИЧ-1 относятся различные фенольные соединения. Достаточно отметить природные хиноны и гидрохиноны ряда аварола [3] и флавоноиды – кверцетегетин, лутеолин и др. [4].

Источником фенольных соединений могут служить растения рода *Glycyrrhiza* sp., из которых выделены фенольные компоненты различных структурных типов: флавоноиды, флаваны, изофлаваны и кумарины [5]. У некоторых из них обнаружены противоопухолевые и противовирусные свойства [6].

Цель данной работы – изучение ингибирования ОТ ВИЧ индивидуальными фенольными компонентами корня солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) сибирских популяций, а также исследование иммуностимулирующей активности этих компонентов и их суммарных экстрактов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ингибирование изучали с использованием рекомбинантной ОТ дикого типа, а также ее мутантных форм, содержащих аминокислотные замены, обуславливающие устойчивость к азидотимидину (АЗТ). Проводился анализ кинетических характеристик выделенных ферментов с целью оценки влияния той или иной замены на ингибирующие свойства соединений.

Использовались плазмиды pBRP-NR, несущие встройки гена *pol*, кодирующие обратную транскриптазу дикого типа и ОТ с аминокислотными заменами, обуславливающими устойчивость к азидотимидину. Плазмиды и клетки *E. coli* BL21 (DE3)plys S получены в институте молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН (Москва), в качестве сорбента для аффинной хроматографии применяли Ni-NTA-агарозу (QIAGEN, USA).

Анти-ВИЧ препараты. Азидотимидин трифосфат (АЗТ-ТР), используемый в качестве ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1, синтезирован в Институте молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН (Москва). В качестве известного ненуклеозидного ингибитора ВИЧ-1 применяли неврирапин.

Выделение обратной транскриптазы. Рекомбинантная обратная транскриптаза ВИЧ-1 в виде гомодимера р66/р66 была наработана из клеток *E. coli* BL21 (DE3)plys S и очищена, как описано в [7]. Гомогенность препаратов обратной транскриптазы оценивали по данным SDS-электрофореза в диссоциирующих условиях. Концентрация выделенных ферментов составила от 0.7 до 1.1 мг/мл. Данная работа проводилась с использованием четырех форм обратных транскриптаз: ОТ дикого типа, ОТ с заменой Asp67@ Asn, ОТ с заменой Thr215@ Phe и мутантной ОТ с тремя заменами Asp67@ Asn; Lys70@ Arg; Thr215@ Phe (впервые описаны в [8]). Характеристики полученных форм ОТ представлены в табл. 1 и 2.

ТАБЛИЦА 1

Формы ОТ, использованные в работе

Мутантная форма	Замена в кодоне	Аминокислотная замена
ДТ (дикый тип)	–	–
М(67)	GAC @ AAC	Asp67 @ Asn
М(215)	ACC @ TCC	Thr215 @ Phe
М(67, 70, 215)	GAC @ AAC	Asp67 @ Asn
	AAA @ TAA	Lys70 @ Arg
	ACC @ TCC	Thr215 @ Phe

ТАБЛИЦА 2

Кинетические характеристики выделенных форм ОТ ВИЧ-1

Мутантная форма	K_m (для dTTP), мкМ	k_{cat} , с ⁻¹	V_{max} , %
ДТ	1.24±0.11(6)	2.81±0.15(4)	100
М(215)	1.47±0.08(6)	2.40±0.22(3)	82
М(67)	8.03±0.22(6)	1.95±0.15(3)	84
М(67,70,215)	12.0±0.26(6)	1.52±0.12(3)	75

Примечание. K_m – константа ингибирования реакции полимеризации, k_{cat} – каталитическая константа, V_{max} – скорость реакции полимеризации. В скобках указано число независимых экспериментов.

Определение кинетических параметров реакции полимеризации, катализируемой ОТ *in vitro*, и констант ингибирования. Реакцию полимеризации, катализируемую ОТ, проводили при 30 °С в течение 40 мин [9]. Реакционная смесь (30 мкл) содержала 50 мМ трис-HCl (рН 8.0), 2.5 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, 80 мМ KCl, 0.1 мМ ЭДТА, 5 мкг/мл поли (rA), 0.5 мкг/мл олиго d(T)₁₆, 40 мкМ [³³P] dTTP (в случае определения K_i брали пять точек в интервале концентраций dTTP от 2 до 20 мкМ) и исследуемые препараты с концентрацией в интервале от 0.1 до 100 мкМ (для определения K_i брали четыре-пять точек). Конечная концентрация ДМСО в реакции составляла 10 %.

Реакцию полимеризации инициировали добавлением обратной транскриптазы (50–100 нг). В процессе инкубации отбирали аликвоты по 5–10 мкл через каждые 5–10 мин и наносили их на сухие фильтры из бумаги Whatman 3М, предварительно пропитанные 7 % раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Фильтры промывали 7-кратно 10 % раствором ТХУ, отмывали от кислоты охлажденным этанолом, сушили и измеряли их радиоактивность с по-

мощью счетчика радиоактивности (Marck-3) в толуольном сцинтиляторе.

Кинетические параметры реакции (K_m , V_{max} и k_{cat}) находили по уравнениям Михаэлиса–Ментен с использованием программы Enzfitter (Elsevier Biosoft, Голландия) и Origin Professional 5.0 (Microcal Inc.). Значения K_i и тип ингибирования находили графически с помощью координат Лайнуивера–Берка и Диксона [10] в серии из трех–пяти независимых экспериментов. Все измерения проводили на линейных участках зависимости накопления продуктов от времени и концентрации фермента.

Для оценки цитотоксичности и противовирусной активности исследуемых соединений использовали перевиваемую линию лимфоцитов человека МТ-4, высокочувствительную к вирусу иммунодефицита человека. Клетки культивировали на среде RPMI-1640, содержащей 10 % сыворотки плода коровы фирмы ICN, 0.06 % L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина и 60 мкг/мл линкомицина, с посевной концентрацией 5×10^5 клеток/мл в присутствии препаратов (экспериментальные образцы) либо в их отсутствие (контроль) в культуральных флаконах фирмы «Flow Laboratories» при температуре 37 °C в течение 4 сут. В конце каждого пассажа определяли концентрацию и долю жизнеспособных клеток в образце с помощью камеры Горяева после окрашивания клеток 0.4 % раствором трипанового синего. Противовирусную активность препаратов оценивали, как описано в [11].

Иммуностимулирующие свойства соединений изучали на беспородных мышах массой 18–20 г при иммунизации слабым антигеном (бычий сывороточный альбумин (БСА)). Схема иммунизации была следующей. Первичный иммунный ответ у животных индуцировали путем подкожного введения 500 мкг БСА в 0.5 мл стерильного физиологического раствора (без адъювантов). Вторичный иммунный ответ вызывали повторным введением антигена через 28 дней (в дозе 100 мкг).

Исследуемые вещества вводили однократно после проведения первичной иммунизации в дозе 5 мг/кг в 0.5 мл стерильного физиологического раствора внутривенно (в/в) или подкожно (п/к). Кровь для получения исследуемой сыворотки забирали на 14-е и 36-е сутки после первой иммунизации индивидуально от каждого животного, уровень специфических антител в сыворотках оценивали иммуферментным анализом (ИФА) по стандартной методике [11]. Индекс иммуногенности оценивали как отношение обратной величины титра сыворотки опытных животных к обратной величине титра сыворотки животных, иммунизированных БСА без последующего введения препаратов. В качестве положительного контроля использовали неполный адъювант Фрейнда (НАФ).

Структурные формулы изучаемых в работе фенольных соединений солодки приведены на схеме 1. Флаванон ликвиритин (I), изофлаван (R)-ликорицидин (III) и ликопирано-

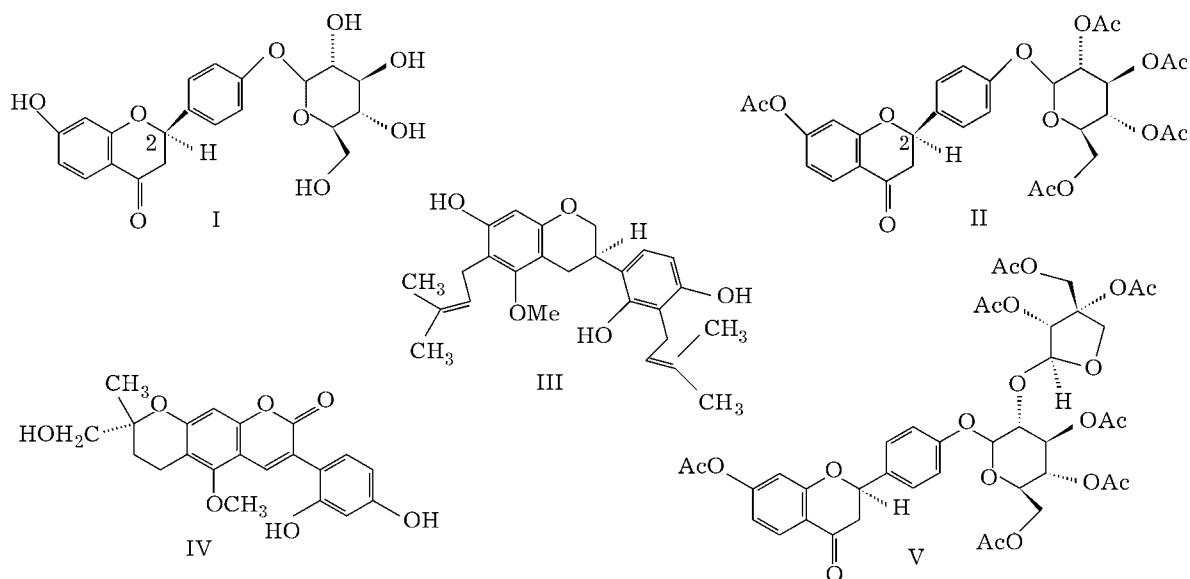


Схема 1.

кумарин (IV) выделяли из корня солодки уральской *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. по методике [12]. Полные ацетаты ликвиритина (II) и ликвиритин-4 β -D-апиофуранозида (V) получали ацелированием этилацетатного извлечения метанольного экстракта с последующей колоночной хроматографией. Характеристика соединений приведена в работе [12]. Для проведения биологических исследований соединения растворяли в ДМСО.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибирующая активность соединений I–V оценивалась на описанных выше формах обратной транскриптазы (см. табл. 1, 2).

Первоначально ингибирующую способность новых соединений оценивали по снижению относительной активности фермента при добавлении исследуемых соединений в концентрации 100 мкМ и при насыщающих концентрациях других субстратов на 4 формах ОТ (концентрация ингибитора 100 мкМ была выбрана произвольно). За 100 % была принята скорость включения [³³P]dTMP в кислотонерастворимый продукт в реакции полимеризации, катализируемой обратной транскриптазой, без добавления ингибитора. Соединения, у которых степень подавления активности ОТ составила 50 % и более, отбирались для дальнейших исследований. Таким образом были отобраны два соединения – IV и V, при этом степень ингибирования ими была одинакова для ОТ, содержащих и не содержащих мутации, обеспечивающие устойчивость к АЗТ. Для этих соединений были определены значения констант ингибирования и тип ингибирования (табл. 3).

Из полученных данных следует, что ингибирование активности ОТ ликопиранокумарином (IV) и флавоноидом (V) проходит по неконкурентному типу, причем K_i для мутантных форм ОТ практически не отличается от K_i для дикого типа. Эти результаты свидетельствуют о перспективности использования вышеуказанных соединений (или их структурных аналогов) для ингибирования АЗТ-резистентных мутантов ВИЧ.

При оценке противовирусной активности исследуемых соединений на культуре клеток МТ-4, инфицированной ВИЧ-1, установлено, что соединения IV и V в концентрации 100 мкМ вызывают полное подавление репродукции вируса. Вместе с тем такая доза этих соединений оказывала цитотоксическое действие на неинфицированные клетки. Таким образом, индекс селективности для них составил около 10 (отношение концентрации соединения, вызывающей 50 % цитотоксический эффект, к концентрации, вызывающей 50 % подавление размножения вируса). Такое значение индекса селективности значительно ниже, чем у АЗТ или невирапина (около 2000 и 5000 соответственно). Тем не менее последующие химические трансформации исследованных соединений могут привести к увеличению их противовирусной активности.

В последние годы большинство исследователей признали необходимость комбинированной терапии ВИЧ-инфекции – сочетание двух, трех или более анти-ВИЧ препаратов. В таком случае различные анти-ВИЧ препараты, одновременно воздействуя на различные белки (ферменты) вируса или на различные участки одного фермента, оказывают синергический противовирусный эффект, способствуя уменьшению дозы вносимого препара-

ТАБЛИЦА 3

Константы (K_i , мкМ) и тип ингибирования ОТ и ее мутантных форм разными ингибиторами

Ингибитор	ДТ	М (67)	М (215)	М(67, 70, 215)
IV	43±1.9*(4)	46±3.7*(3)	48±5.3*(3)	49±2.5*(3)
V	112±4.3*(4)	127±5.8*(3)	90±6.7*(3)	136±5.9*(3)
АЗТ-ТР	0.35±0.02 # (4)	0.73±0.04# (3)	0.61±0.05# (3)	0.84±0.04# (3)
Невирапин	4.31±0.1*(4)	5.58±0.1*(3)	6.12±0.1*(3)	7.16±0.1*(3)

Примечание. Звездочкой отмечен неконкурентный к субстратам реакции тип ингибирования, знаком # – конкурентный; в скобках указано число независимых экспериментов.

ТАБЛИЦА 4

Влияние индивидуальных фенольных компонентов солодки и наиболее активных экстрактов на уровень антител против БСА в сыворотках животных

Образец	Способ введения соединения	Титр в ИФА (обратная величина) \pm SD	Индекс иммуногенности
Экстракт 1	в/б	1760 \pm 868	4.4 \pm 2.17
Экстракт 2	в/б	720 \pm 469	1.8 \pm 2.2
	п/к	1600 \pm 565	4 \pm 1.41
Экстракт 3	в/б	1120 \pm 329	2.8 \pm 0.82
	п/к	1040 \pm 441	2.6 \pm 1.1
Экстракт 4	в/б	1280 \pm 329	3.2 \pm 0.8
	п/к	1920 \pm 678	4.8 \pm 1.7*
I	в/б	800 \pm 375	2 \pm 1
	п/к	1120 \pm 375	2.8 \pm 0.9
III	в/б	2080 \pm 654	5.2 \pm 1.6*
	п/к	1280 \pm 375	3.2 \pm 0.9
Н А Ф	п/к	5120 \pm 1352	12.8 \pm 3.38
Без препарата		400 \pm 70	

Примечание. Содержание соединения III в экстрактах составляет 20 (1), 11 (2), 45 (3) и 50 % (4) (определено по данным ВЭЖХ); в случаях, отмеченных звездочкой, различия с контролем достоверны с $P < 0.05$.

рата и снижению вероятности возникновения мутаций, приводящих к резистентности. Поэтому дальнейшее изучение растительных флавоноидов, кумаринов и куместанов представляет не только практический интерес (для использования их в анти-ВИЧ терапии), но и научный, в плане исследования механизмов клеточной регуляции. Необходимо подчеркнуть, что активность фенольных соединений солодки интенсивно изучается. Так, для соединения IV, выделенного из солодки голой, произрастающей в Китае, приведены данные об ингибировании ксантиноксидазы, что приводит к замедлению роста опухоли [13].

Была исследована иммуностимулирующая активность наиболее доступных растительных флавоноидов I и III, а также экстрактов, содержащих 12–50 % соединения III. Результаты приведены в табл. 4. Из приведенных дан-

ных видно, что среди исследованных индивидуальных соединений и экстрактов, их содержащих, наибольшей иммуностимулирующей активностью обладают соединения III и экстракт, в состав которого входит 50 % этого соединения.

Несмотря на то что исследованные нами соединения проявили низкую эффективность по сравнению с известными ингибиторами ОТ ВИЧ-1, дальнейшее исследование биологической активности фенольных соединений растительного происхождения и их аналогов представляется весьма перспективным. Изучение химических трансформаций исследованных в работе доступных фенольных компонентов может привести к получению более активных и менее токсичных соединений.

Исследования поддержаны грантами Минобразования РФ "Фундаментальные исследования в области естественных наук" и Федеральной целевой программы "Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 E. De Clercq, *Medical virology*, 6 (1996) 97.
- 2 R. Garg, S. P. Gupta, H. Gao et al., *Chem. Rev.*, 99 (1999) 3525.
- 3 S. Loya, A. Hizi, *FEBS Lett.*, 269 (1990) 131.
- 4 K. Ono, H. Nakane, M. Fukushima et al., *Eur. J. Biochem.*, 190 (1990) 469.
- 5 Г. А. Толстикова, Э. Э. Шульц, Л. А. Балтина, Т. Г. Толстикова, *Химия в интересах устойчивого развития*, 5 (1997) 57.
- 6 T. Hatano, T. Yasuhara, T. Fukuda et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 37 (1989) 3005.
- 7 Д. К. Похолок, С. О. Гудима, Л. В. Мемелова и др., *Биохимия*, 61 (1996) 142.
- 8 V. A. Larder, S. D. Kemp, *Science*, 246 (1989) 1155.
- 9 Ph. W. Mui, S. P. Jacober, K. D. Hargrave, J. Adams, *Med. Chem.*, 35 (1992) 201.
- 10 Л. Узбб, *Ингибиторы ферментов и метаболизма*, Мир, Москва, 1966, с. 864.
- 11 F. P. Svinarchuk, D. A. Konevets, O. A. Pliasunova et al., *Biochimie*, 75 (1993) 243.
- 12 Э. Э. Шульц, Т. Н. Петрова, М. М. Шакиров и др., *Химия в интересах устойчивого развития*, 8 (2000) 453.
- 13 T. Hatano, T. Yasuhara, K. Miyamoto, T. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.*, 36 (1988) 2286.