

Рекомендована д.ф.н., професором В.С.Кисличенко

УДК 578.835.15.083.33

СИНТЕЗ ТА ВЛАСТИВОСТІ СУКЦИНІЛЬОВАНИХ ПОЛІНУКЛЕОТИДІВ

А.В.Мартинов

Національний фармацевтичний університет

Представлені результати дослідження властивостей сукцинільованих полінуклеотидів, отриманих з нуклеїнату натрію, РНК з *Candida albicans*, ДНК з селезінки мишей. У дослідженні використовували тільки найлегші фракції кожного з полінуклеотидів, які розподіляли на 2 частини — одну з них ацилювали та очищали, а іншу використовували як контроль та для гібридизації. Для виділення та дослідження схильності до специфічної гібридизації полінуклеотидів використовували метод гель-електрофорезу та гель-фільтрації при спектрофотометричній детекції фракції (260 нм). У результаті досліджень було встановлено, що між сукцинільованими полінуклеотидами та їхніми нативними попередниками утворюються специфічні кон'югати. При використанні гетерогенних полінуклеотидів, наприклад, сукцинільованого нуклеїнату та нативної РНК з кандиди, кон'югат не утворюється. Цей ефект може бути використаний для створення селективних інгібіторів генів на основі сукцинільованих ДНК та РНК, для розробки методів генної корекції уроджених вад та при лікуванні ракових і вірусних захворювань.

Останнім часом зріс інтерес учених до полінуклеотидів як лікарських засобів. Понад 30 років успішно використовується такий лікарський препарат, як нуклеїнат натрію з імуномодуючою дією [4]. Зараз його додають до вакцин та використовують окремо як сильний індуктор інтерферону та індуктор клітинного ланцюга імунітету [2, 3]. В останнє десятиріччя з'явився ряд публікацій про можливість використання полінуклеотидів у розробці ДНК (РНК) вакцин та полінуклеотидів у генній терапії раку і ряду вірусних інфекцій [9]. Останній факт пов'язаний з такою здатністю полінуклеотидів, як специфічна кон'югація між комплементарними ланцюгами. Цей ефект використовують у різноманітних гібридизаційних методах (блот-гібридизація, полімеразна ланцюгова реакція та ін.) для діагностики ряду інфекційних захворювань та генних порушень [8, 11]. Але незважаючи на останні досягнення в дослідженні полінуклеотидів, не були синтезовані та досліджені

їхні напівсинтетичні похідні: ацильовані чи алкільовані полінуклеотидами, не були вивчені їх властивості щодо комплементарного зв'язування.

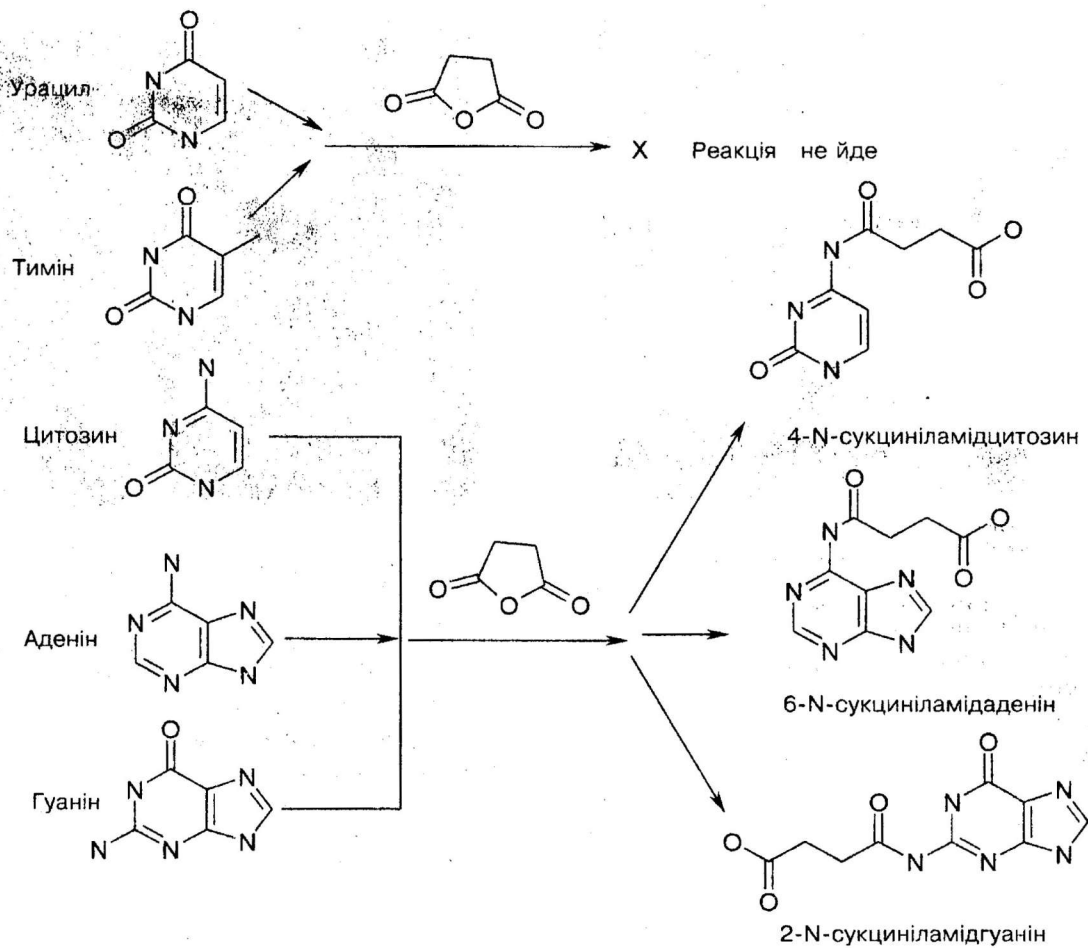
Метою дослідження був синтез ряду сукцинільованих похідних полінуклеотидів та дослідження їхніх фізико-хімічних та біологічних властивостей.

Матеріали та методи

Як об'єкти для ацилювання використовували лікарський препарат "Нуклеїнат натрію" та отримані за відомими методиками [6] РНК *Candida albicans* та ДНК із селезінки миші. З метою очищення виділених полінуклеотидів від білків препарати обробляли протеїназою К.

У зв'язку з тим, що досліджувані речовини представляють собою суміш полінуклеотидів з різними молекулярними масами, у дослідженні використовували тільки найлегші фракції після гель-фільтрації. Вони давали чіткі смуги та добре ідентифікувалися. Реакція ацилювання полінуклеотиду у слабко лужному середовищі на холоді перебігає виключно за депротейнованими аміногрупами цитозину, аденіну та гуаніну [7]. У структурах урацилу та тиміну аміногрупи стерично недоступні для ацилювання, а сама аміногрупа поводить як кислотна у складі гетероциклів (схема).

Ацилювання полінуклеотидів проводили у слабко лужному середовищі при рН=7,2-7,8 (гідрокарбонат натрію). Перерахунок бурштинового ангідриду проводили на концентрацію полінуклеотиду у розчині, що складало 1 мг/мл полінуклеотиду (за спектрофотометричними даними при 260 нм) [1]. До слабко лужного розчину полінуклеотиду додавали розчин бурштинового ангідриду в діоксані у відповідній кількості. Реакція між бурштиновим ангідридом та аміногрупами амінокислот у білках перебігає за 15-20 хв [15], а нуклеотидами у складі полінуклеотидів є більш нуклеофільними агентами, тому відповідно реакція повинна здійснюватись швидше. Але для більш повного її завершення ацилювання проводили на холоді протягом години при постійному перемішуванні. Як відомо, 6-аміногрупа аденіну характеризується значенням $pK_a=4,2$, а 2-аміногрупа гуаніну — значенням $pK_a=3,2$ [12]. Відповідно, при рН=7,0



Схема

ці аміногрупи не протоновані та можуть бути ацильовані.

Полінуклеотиди відмивали від амінокислот та низькомолекулярних речовин з використанням гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-50 [10] (до появи смуги з поглинанням при 260 нм, для досліду використовували останню найлегшу фракцію) [6]. Молекулярні маси синтезованих полінуkleотидів встановлювали з використанням імпульсного гель-електрофорезу в агарозі з етігію бромідом за методикою [14]. Наявність специфічної кон'югації досліджували шляхом змішування ацильованих та неацильованих похідних один з одним, плавлення та віджигу [5] полінуkleотидів протягом 2 годин (для дослідження специфічної кон'югації) або доби (для дослідження ефекту неспецифічної кон'югації) в термостаті з наступним розділенням і використанням гель-електрофорезу. Наявність важких смуг кон'югатів (за масою вдвічі більших за нативні речовини) свідчило про специфічну кон'югацію.

Результати та їх обговорення

Велика гетерогенність досліджених препаратів була основною перешкодою у дослідженні їх властивостей. Фактично нуклеїнат натрію складається з двох інтенсивних широких смуг та 12 малих смуг з різними Rf та вагою (не наведені). Для досліджень ми відібрали тільки одну смугу (першу — при гель-електрофорезі, а останню — при гель-

фільтрації), яка була найбільш чіткою. Аналогічна картина спостерігалася і при дослідженні фракції РНК з *Candida Albicans*. Але розподіл 12 легких фракцій був іншим, тому відповідно перша смуга знаходилася в іншому місті, ніж смуга нуклеїнату. Зовсім інша картина спостерігалася при дослідженні фракції ДНК з селезінки миші: велика кількість смуг (більше 20) при наявності 3 чітких смуг поряд зі стартом, характерним для хромосом. Найлегші фракції після виділення з колонки розділяли на 2 частини, з яких одну ацилювали бурштиновим ангідридом, а іншу використовували для дослідження ефекту специфічної кон'югації.

На рис. 1 представлені результати дослідження специфічної кон'югації між першою фракцією нуклеїнату та її ацильованим похідним.

Як видно з електрофореграми, при 5-кратному повторі підтвердилася гіпотеза про специфічну кон'югацію між РНК та її сукцинільованим похідним. Також спостерігалася утворення преципітату у пробірці між нативним та сукцинільованим похідним (через 5 год). Далі необхідно було дослідити можливість чи відсутність неспецифічної кон'югації між гетерогенними РНК. Для цього інкубували як гомогенні, так і гетерогенні суміші полінуkleотидів із сукцинільованими похідними протягом доби, які потім вносили в лунки та розділяли за допомогою електрофорезу.

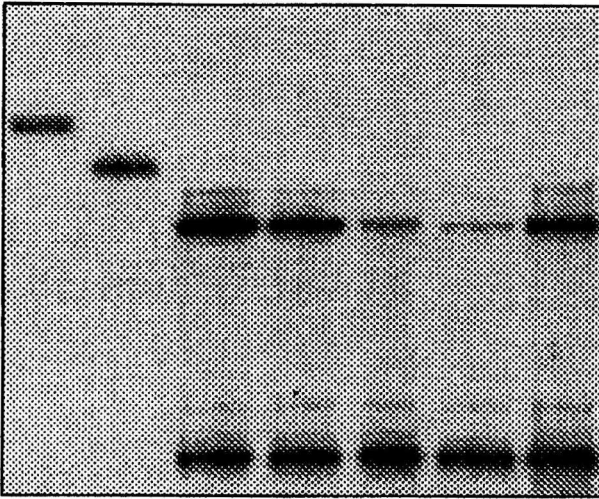


Рис. 1. Результати дослідження ефекту специфічної кон'югації між РНК з нуклеїнату та його сукцинільованого похідного (перша смуга — нуклеїнат натрію, друга смуга — сукцинільований нуклеїнат, 3-7 смуги — суміш після спільного інкубування).

На рис. 2 представлені результати дослідження гетерогенної кон'югації.

Як видно з рисунку, з лунок 2,3,5, куди вводили суміш гомогенних полінуклеотидів та їхніх сукцинільованих похідних, кон'югати так і не змінили свого об'єму. Цей ефект обумовлений утворенням преципітату у пробірці після спільної інкубації протягом доби та перед внесенням до лунки суміші гомогенного полінуклеотиду та його сукцинільованого похідного. При змішуванні суміші сукцинільованого нуклеїнату та нативної РНК з кандиди та інкубації їх протягом доби преципітат не утворювався, а суміш добре розділялася на характерні смуги (смуга №4). Цей факт підтверджує відсутність неспецифічної кон'югації між сукцинільованими та несукцинільованими гетерогенними полінуклеотидами.

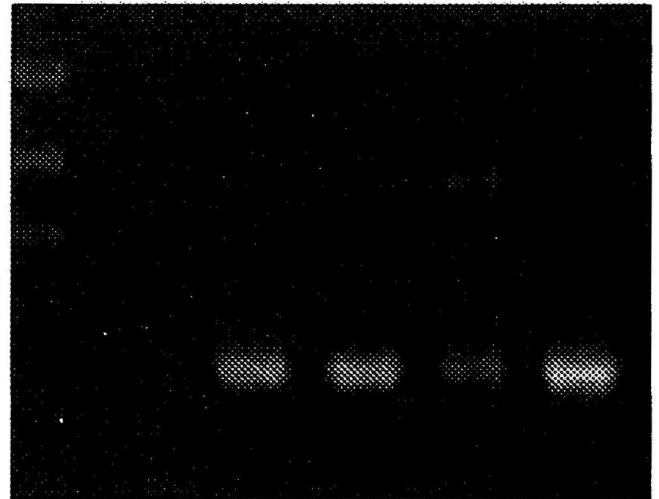


Рис. 2. Дослідження кон'югації гетерогенних РНК (перша смуга — суміш перших фракцій нуклеїнату та РНК з кандиди, 2,3 смуги — суміші гомогенних полінуклеотидів зі своїми сукцинільованими аналогами відповідно, 4 — суміш сукцинільованого нуклеїнату та нативної РНК з кандиди, 5 смуга — суміш ДНК зі своїм сукцинільованим похідним).

Таким чином, можна зробити попередній висновок про наявність у сукцинільованих полінуклеотидів характерної здатності до специфічної кон'югації зі своїм нативним попередником з утворенням нерозчинного преципітату подібно до імунних комплексів. Цей ефект може бути використаний для створення селективних інгібіторів генів на основі сукцинільованих ДНК та РНК з метою розробки методів генної корекції уроджених вад та лікування ракових і вірусних захворювань.

Ми плануємо продовжити дослідження з плазмідами (лінійними формами) з метою підтвердження ефекту та вивчення біофізичних властивостей сукцинільованих полінуклеотидів — плавлення ДНК, сукциніл-ДНК та їх кон'югатів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аффинная хроматография: Методы. — М.: Мир, 1988. — 278 с.
2. Донченко А.С., Аликин Ю.С., Найманов Д.И. Применение биологически активных веществ в качестве иммуномодуляторов в ветеринарии и медицине. — Новосибирск: Изд-во НГУ, 1989. — С. 8-29.
3. Донченко А.С., Багрин В.А., Донченко В.Н. // Рекомендации РАСХН. — Новосибирск, 1992. — С. 8-16.
4. Земсков А.М. Иммуномодулирующее, детоксицирующее и ростостимулирующее свойство нуклеината натрия. Автореф. ... дисс. — Л., 1983. — 19 с.
5. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: — М.: Мир, 1999. — С. 395-401.
6. Транскрипция и трансляция. Методы: — М.: Мир, 1987. — С. 16-18.
7. Data for biochemical research. — Oxford.: Clarendon Press, 1991. — P. 333-334.
8. Houg H.-S.H., Chen R.C.-M., Vaughn D.W. and Kanesa-Thanan N. // J. Virol. Methods. — 2001. — Vol. 95. — P. 19-32.
9. Josefsson A.M., Magnusson P.K.E., Ylitalo N. et al. // Lancet. — 2000. — Vol. 355. — P. 2189-2193.
10. Kaur M., Jumel K., Hardie K.R. et al. // J. Chromatogr. — 2002. — Vol. 957, №2. — P. 139-148.
11. Koenig M., Reynolds K.S., Aldous W. and Hickman M. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 40. — P. 107-110.

Дослідження проводилися за пріоритетного фінансування АМН України за темою АМН 41/2001, № держреєстрації 0101U001117 "Розробка засобів імунореабілітації онкологічних хворих при герпесвірусній персистенції"

Подяка: Висловлюємо щирю подяку за консультації та надання обладнання і реактивів для гель-електрофорезу заступнику директора з наукової роботи ІМІ ім.І.І.Мечникова АМН України, завідувачу лабораторії нових та маловивчених інфекційних захворювань к.мед.н., ст.н.с. Похилу Сергію Івановичу та завідувачу лабораторії епізоотології ІЕКВМ УААН к.вет.н., ст.н.с. Бабкіну Михайлу Валерійовичу за надані консультації, реактиви та обладнання при проведенні гель-фільтрації.

12. Lehninger A. *Biochemistry*. — New York.: Worth Publishers, 1992. — P. 286-287.
13. US Patent 5869457 of Feb. 9. 1999. Jansen R.W., Mejer D.K.F., Molemo C. et al.
14. Vilagines R. // *Arch. Gesamte Virusforsch.* — 1970. — Vol. 29. — P. 109-112.
15. Zaghoul M., Prakash V. // *L. Nahrung.* — 2002. — Vol. 46, №5. — P. 364-369.

УДК 578.835.15.083.33

СИНТЕЗ І СВОЙСТВА СУКЦИНИЛІРОВАННИХ ПОЛІНУКЛЕОТИДІВ

А.В.Мартынов

Представлены результаты изучения свойств сукцинилированных полинуклеотидов, полученных из нуклеината натрия, РНК из *Candida albicans*, ДНК из селезенки мыши. В исследовании использовали только наиболее легкие фракции каждого из полинуклеотидов, которые разделяли на 2 части — одну ацилировали и очищали, а вторую использовали как контроль и для гибридизации. Для изучения способности полинуклеотидами к специфической гибридизации использовали методы гель-электрофореза и гель-фильтрации при спектрофотометрической детекции фракций (260 нм). В результате исследований было установлено, что между сукцинилированными полинуклеотидами и их предшественниками образуются специфические конъюгаты. При использовании гетерогенных полинуклеотидов, например, сукцинилированного нуклеината и нативной РНК из кандиды, конъюгат не образуется. Этот эффект может быть использован для получения селективных ингибиторов генов на основе сукцинилированных ДНК и РНК, для разработки методов генной коррекции врожденных дефектов и при лечении раковых и вирусных заболеваний.

UDC 578.835.15.083.33

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF SUCCINYLATED POLYNUCLEOTIDES

A.V.Martynov

In article the results of succinylated polynucleotides properties study are submitted obtained from sodium nucleinat, RNA from *Candida albicans*, DNA from the mouse' lien. We have used in the research only the most mild fractions of each polynucleotides, which parted in 2 — one acylated and cleared, and the other has been used as the control and for a hybridization. For study of polynucleotides ability to a specific hybridization have used methods of gel-electrophoresis and gel-filtration with spectroscopic detection of fractions (260 nm). As a result of researches we have fixed, that between succinylated polynucleotides and their precursors have formed specific conjugates. At use of heterogenous polynucleotides, for example, succinylated nucleinat and native RNA from *Candida*, conjugate is not formed. This effect can be used for reception of selective genes inhibitors on the basis of succinylated DNA and RNA, for development of gene correction methods of inherent defects infringements and at treatment of cancer and virus diseases.

Продовження. Початок див. на стор. 15.

До питання про контроль механічних включень у парентеральних препаратах із застосуванням апаратів та приладів доповів к. ф. н. *Доля В.Г.* (ДП ДНЦЛЗ).

Доповідь про створення нового вітчизняного препарату для лікування епілепсії зробила к. ф. н. *Науменок Л.Г.* (ДП ДНЦЛЗ).

З доповіддю про прогнозування якості при розробці твердих лікарських форм препаратів-генериків виступив проф. *Штенгарт М.В.* (ДП ДНЦЛЗ).

Про розробку складу та технології лікарського препарату для знеболювання твердих тканин зуба доповіла асп. *Маслій Ю.С.* (НФаУ).

Про розробку складу та технології таблеток на основі синтетичного цеоліту марки NaA, які забезпечують антиоксидантну дію, доповів доц. *Зайцев О.І.* (НФаУ).

Питання про технологічні аспекти створення комбінованого препарату на основі панкреатину і гепатопротектора розкрив у своїй доповіді м. н. с. *Пашнев П.П.* (ДП ДНЦЛЗ).

На конференції були заслухані також інші доповіді (програма додається). Всього виступило 22 доповідача.

За "круглим столом" були обговорені питання, винесені на конференцію. Виступили спеціалісти: проф. *Гриценко І.С.* (НФаУ), проф. *Діхтярьов С.І.* (ДП ДНЦЛЗ), к. х. н. *Шаламай А.С.* (Борщагівський ХФЗ, м. Київ), *Максумджанов Ф.К.* (ФК "Здоров'я"), *Лікін А.Н.* (ФФ "Дарниця"), *Осітова К.І.* (ЗАТ "Лікхім-Харків"), проф. *Россіхін В.В.* (Мед. ак. ПДО, м. Харків), к. ф. н. *Гурєєва С.Н.* (ЗАТ "Фармак"), технолог *Бондар В.М.* (концерн "Стирол Біо Фарм"), хімік *Гудзь М.І.* ("Біолік", м. Львів), нач. БРіС *Перемот З.П.* (ЗАТ "Дарниця"), *Русанов М.В.* (журнал "Провізор"), доц. *Голіков В.І.* (Нац. політехн. університет, м. Одеса), зав. каф. заводської технології ліків НФаУ, проф. *Чуєшов В.І.*, проф. кафедри ЗТЛ *Пашнев П.Д.*, доц. каф. ЗТЛ *Січкара А.А.*, доц. каф. ЗТЛ *Рибачук Д.В.*, які відмітили важливість піднятих питань розробки нових готових лікарських засобів та впровадження їх у промислове виробництво. В цілому конференція пройшла на високому науковому рівні.

Рішення конференції:

1. Відзначити наукову та практичну значимість заслуханих доповідей.

2. Необхідно систематично проводити конференції на подібну тематику та більш широко залучати представників медичних установ, керівників ПО "Фармація" як завідувачів кафедр та деканів фармацевтичних факультетів медуніверситетів, що буде сприяти плідній співпраці у вивченні нових ГЛЗ.

3. Відзначити актуальність та велику кількість доповідей провідних спеціалістів фармації та молодих науковців; різноманітність наукових установ та виробництв фармацевтичної галузі, які були представлені на конференції.

4. Науково-практична конференція, що відбулася, стала дієвою школою для багатьох магістрантів, аспірантів, здобувачів і співробітників практичної фармації.