

<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.10.078>

УДК 577:113.7:577.3

М.М. Вівчарик¹, О.О. Ільченко², С.М. Левченко¹, З.Ю. Ткачук¹

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

² Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

E-mail: vivcharykma11@rambler.ru, radastasi@gmail.com

Комплексоутворення РНК з манітолом, його спектральні характеристики та біологічна активність

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д.М. Говоруном)

Вивчено спектральні характеристики комплексоутворення РНК з лігандами — манітолом, сорбітолом та лактозою, за допомогою методів ІЧ та раманівської фур'є-спектроскопії, а також математичної моделі MCR-ALS. Визначено оптимальні співвідношення комплексоутворення в системі РНК—ліганд: у суміші РНК : манітол це співвідношення становить 3 : 1 з комплексоутворенням близько 100 %. У випадку суміші РНК : лактоза комплексоутворення зменшується до 30 % та в суміші РНК : сорбітол — до 25 %. Отримані результати добре узгоджуються з даними щодо противірусної активності препаратів на культурі клітин. Оптимальне співвідношення та найкраще комплексоутворення в суміші РНК : манітол практично збігаються з найкращою біологічною активністю цієї системи. Заміна манітолу на лактозу в системі РНК—ліганд призводить до зміни біологічної активності препарату з противірусної на імуномодулюючу та протизапальну активність.

Ключові слова: препарати на основі РНК, манітол, ІЧ фур'є-спектроскопія, раманівська спектроскопія.

Останніми роками лікарські препарати на основі рибонуклеїнової кислоти широко використовуються в медичній практиці. Вони є ефективними, не токсичними, підвищують імунну реактивність, стимулюють утворення гемоглобіну та еритроцитів, а також забезпечують нормалізацію різних метаболічних процесів [1].

Новий лікарський засіб “Нуклекс[®]” створений у нашій лабораторії для лікування захворювань, спричинених вірусом грипу, пташиного грипу, герпес вірусом 1-го та 2-го типів, гепатиту С і СНІД [2–6]. Складовими Нуклексу є високоочищена дріжджова РНК (без домішок ДНК, полісахаридів та білків) і спиртовий цукор манітол. Під час процесингу між молекулами олігорибонуклеотидів і манітолу відбувається комплексоутворення, що зумовлює появу специфічної противірусної дії та забезпечує стабільність препарату протягом тривалого часу. Нуклекс проявляє мембраностабілізуючу та протизапальну дію, стимулює процеси клітинного метаболізму, підвищує біосинтез ендогенних нуклеїнових кислот, специфічних білків і ферментів [7]. Він характеризується широкою противірусною активністю, що показано на експериментальних моделях і в клінічній практиці [8]. Манітол — це поліморфна кристалічна тверда речовина, яка широко використовується у фармакології як наповнювач завдяки його здатності структурува-

ти водяну оболонку, підвищувати розчинність і стабільність лікарських засобів [9]. Аналог манітолу — сорбітолу — не має таких властивостей. Манітол може мати декілька кристалічних форм, що впливає на фізико-хімічні властивості речовин, до складу яких він входить.

Інший лікарський засіб — Нуклеїнат — також складається з РНК, але як наповнювач у ньому використовують лактозу. Він стимулює міграцію стовбурових клітин із кісткового мозку та підвищує формування імунологічних клітин пам'яті [10].

Метою нашого дослідження було встановити можливість комплексоутворення між РНК і манітолом, сорбітолом та лактозою, а також визначити оптимальне співвідношення між РНК і вказаними лігандами, яке забезпечуватиме максимальну біологічну активність створених лікарських засобів.

Матеріали та методи. Для вимірювання ІЧ спектрів бінарні суміші препаратів отримували шляхом змішування дріжджової РНК з лігандами в різних концентраційних співвідношеннях у деіонізованій воді. Концентраційний крок становив 15 %. Вимірювали спектри чистої сумарної дріжджової РНК, манітолу, сорбітолу та лактози, а також їхні бінарні суміші (РНК:манітол, РНК:сорбітол і РНК:лактоза) з проміжними концентраційними кроками. Антигрипозну активність препарату *in vitro* визначали на перещеплюваній культурі клітин MDCK (клітини нирки собаки) із суцільним шаром відповідно до рекомендацій [11]. Нейрамінідазну активність визначали за методом Aminoff [12]. ІЧ фур'є-спектри пропускання вимірювали на спектрометрі Nicolet iS50 (Thermo Scientific). Нормування ІЧ спектрів здійснювали за допомогою програмного забезпечення OMNIC. КР спектри вимірювали з FT-Raman модулем на спектрометрі Nicolet iS50 (Thermo Scientific).

Результати та обговорення. ІЧ фур'є-спектральний аналіз. Спектри ІЧ фур'є-пропускання суміші РНК—манітол отримані та проаналізовані в спектральному діапазоні 800—1800 см^{-1} , який був обраний з огляду на оптимальні умови для MCR-ALS аналізу. Наприклад, РНК вібраційні піки при 1608 см^{-1} (в основному належать до коливань аденіну), 1654 см^{-1} (здебільшого урацил), 1698 см^{-1} (в основному гуанін) [13] не перекриваються з вібраційними піками манітолу в діапазоні 1500—1800 см^{-1} . Це дає нам можливість оцінити концентрацію комплексу, що спостерігається в разі зміни форм і зсувів РНК піків, пов'язаних з міжмолекулярними взаємодіями РНК з манітолом. У діапазоні 800—950 см^{-1} спектр манітолу не перекривається з піками РНК, що також мінімізує помилку в MCR-ALS аналізі. РНК піки при 1068—1087 см^{-1} (симетричне PO_2 коливання), 1244 см^{-1} (симетричне PO_2 коливання), 1488 см^{-1} (коливання, що належать в основному до коливань цитозину) [13] перекриваються з піками манітолу в цих діапазонах.

У дослідженні використовували структурний підхід, який базується на трикомпонентному MCR-ALS аналізі ІЧ спектрів сумішей РНК—ліганд. Для ALS оптимізації були використані не негативні, унімодальні обмеження. Виявлено, що необхідно мати три компоненти для доброго узгодження отриманих даних (з точністю більш як 1 %). Дві “чисті” компоненти визначені зі спектрів чистих РНК і манітолу, третя компонента — зі спектра суміші РНК : манітол. Застосовували також графічний інтерфейс (GUI) у середовищі програмного забезпечення MATLAB, для визначення концентрацій та спектральних матриць [14].

Результат розділених ІЧ спектрів та концентрацій наведено на рис. 1.

Аналіз кривих на рис. 1, *a* свідчить про те, що максимум утворення комплексу між РНК та манітолом, майже 100 %, відбувається при співвідношенні РНК : манітол — 75 : 25 %. Це означає, що за таких умов комплексоутворення між РНК та манітолом є максимальним.

Результат MCR-ALS аналізу квантово-хімічних конфігурацій сумішей РНК—лактоза та РНК—сорбітол і міжмолекулярних зв'язків відображено на рис. 2. Показано, що максимум концентрації комплексу для суміші РНК : лактоза формується при співвідношенні 75 : 25 %, і в цьому випадку концентрація комплексу становить близько 38 ± 3 % (див. рис. 2, *a*). Концентрація комплексу для суміші РНК : сорбітол дорівнює близько 25 % при співвідношенні 65 : 35 % (див. рис. 2, *b*).

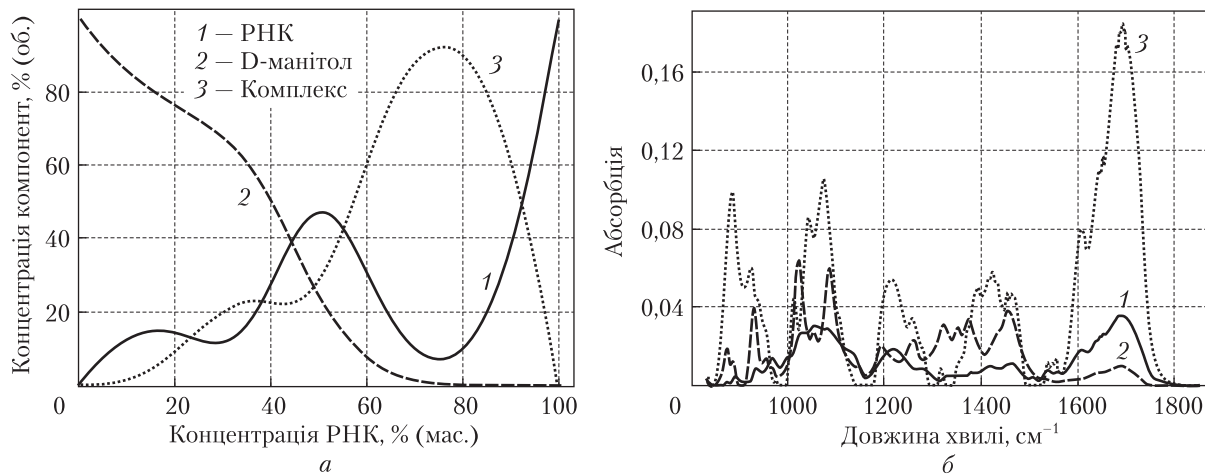


Рис. 1. Концентрація (а) та спектральні профілі (б) компонент, отримані за допомогою методів MCR-ALS аналізу для ІЧ фур'є-спектрів, суміші РНК–манітол

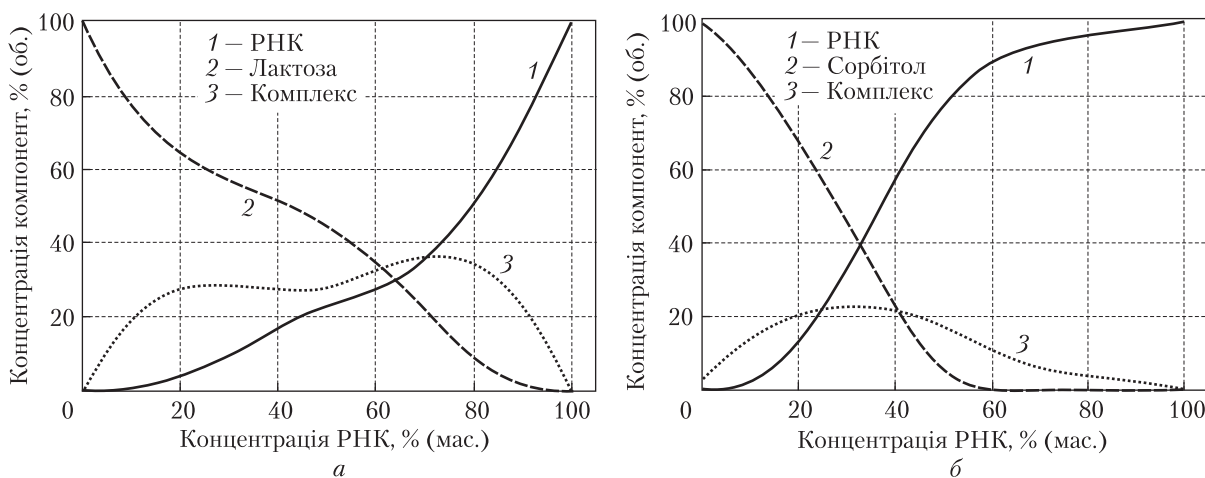


Рис. 2. Концентраційні профілі компонент, отримані за допомогою MCR-ALS аналізу для ІЧ спектрів, сумішей РНК–лактоза (а) та РНК–сорбітол (б)

На підставі одержаних результатів можна зробити висновок, що манітол показує найкращу взаємодію з РНК порівняно з його аналогом сорбітолом та лактозою. Тому в подальшому дослідженні ми зосередили увагу на взаємодії між РНК і манітолом.

Раманівський фур'є-спектральний аналіз. Для аналізу комплексоутворення в системі РНК : цукор недостатньо однієї техніки ІЧ спектроскопії. Тому для підтвердження результатів формування комплексу в суміші РНК–манітол було застосовано комплементарну техніку комбінаційного розсіювання світла (КРС).

КРС спектри сумішей РНК : манітол отримані в спектральному діапазоні 180–4000 см⁻¹. Був обраний повний спектральний діапазон, оскільки вібраційні піки, які нас цікавлять у КР, спектра РНК перекриваються з піками манітолу.

Для забезпечення MCR-ALS аналізу КРС спектрів, як і у випадку ІЧ спектроскопії, необхідні три компоненти даних. Результат КРС спектрів (S^T) та концентрацій (C) показано на рис. 3. З рисунка видно, що максимум концентрації комплексу РНК–манітол спостерігається при співвідношенні РНК : манітол 70 : 30 %. При такому співвідношенні компонент концентрація комплексу є найбільшою і становить майже 100 %.

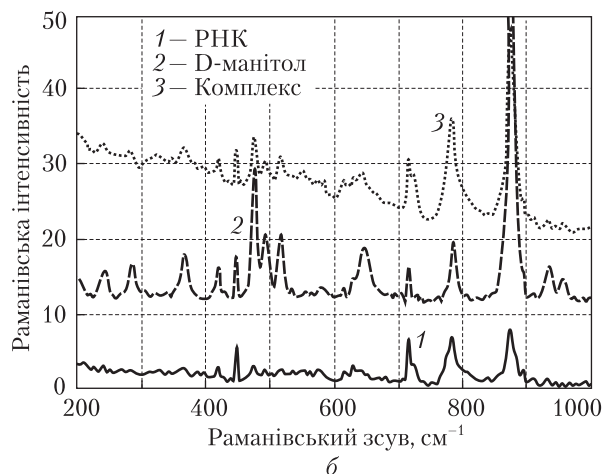
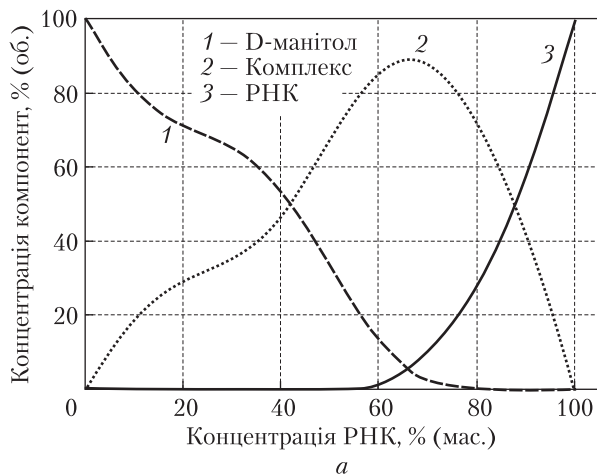


Рис. 3. Концентрації (а) та спектральні профілі (б) компонент, отримані за допомогою MCR-ALS аналізу КРС спектрів, сумішей РНК–манітол

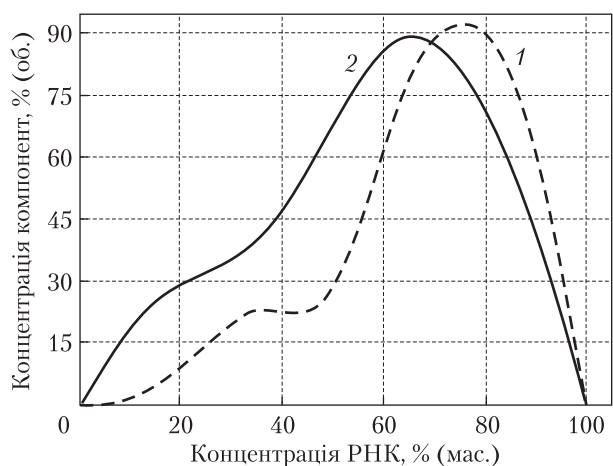


Рис. 4. Концентраційні профілі комплексу РНК–манітол, отримані за допомогою MCR-ALS аналізу з ІЧ фур'є-спектрів (1) та КРС фур'є-спектрів (2)

Згідно з результатами порівняльного аналізу концентраційних профілів, комплексу РНК–манітол, отриманих за допомогою двох різних технік вібраційної спектроскопії, концентрація комплексу спостерігається в діапазоні від 65 % до 75 % концентрації РНК у ньому (рис. 4). Значення концентрації комплексу, отримане за допомогою ІЧ та КРС спектроскопії, добре корелює з вимірним у діапазоні хвильових чисел та MCR-ALS помилкою.

Противірусна активність сумішей РНК–манітол і РНК–лактоза. Ми також досліджували противірусну активність сумішей РНК–ліганд.

Відомо, що окремі компоненти суміші РНК і манітол не мають противірусної та нейрамінідазної активності щодо вірусу грипу. Суміш РНК : манітол після процесингу у співвідношенні 1 : 1 виявляє низьку противірусну активність (табл.). Деяко вища противірусна активність спостерігається в суміші РНК : манітол при співвідношенні 2 : 1. Найкращу противірусну та не-

Таблиця 1. Противірусна та нейрамінідазна активність лікарського препарату Нуклекс®

| Показник | РНК/манітол, % | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0/100 | 15/85 | 35/65 | 50/50 | 65/35 | 75/25 | 85/15 | 100/0 |
| Пригнічення вірусу, lg ₅₀ | 0 | 0 | 0 | 3 | 6 | 7 | 4 | 0 |
| Пригнічення нейрамінідази, % | 0 | 0 | 5 | 22 | 40 | 49 | 10 | 0 |

йрамінідазну активність комплекс РНК : манітол проявляє при співвідношенні 3 : 1. У схожому співвідношенні дріжджова РНК і манітол входять до складу лікарського препарату Нуклекс® .

У разі заміни манітолу на його аналог сорбітол у системі РНК-ліганд противірусної та нейрамінідазної активності не спостерігається. Тому, ми припускаємо, що поява згаданої противірусної активності забезпечується тільки шляхом утворення комплексу між РНК : манітолом у співвідношенні 3 : 1.

Порівняно з “Нуклексом®” інший комерційний препарат – Нуклеїнат, який складається з дріжджової РНК і лактози, має імуномодуючу та протизапальну, але не противірусну дію. Ми припускаємо, що різниця в біологічній активності цих двох препаратів, незважаючи на спільну субстанцію РНК, пов’язана з природою комплексоутворення лігандів манітолу та лактози, які використовуються як компоненти у виготовленні вказаних препаратів.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. *Нуклекс*: інструкція для медичного застосування препарату. – Затв. 01.09. 2010 р. наказом МОЗ України № 752.
2. *Андрейчин М. А., Ткачук З. Ю., Йосик Я. І.* Ефективність Нуклексу при гострих респіраторних вірусних інфекціях // Журн. НАМН України. – 2013. – № 1. – С. 100–103.
3. *Ткачук З.Ю., Рибалко С.Л., Дядюн С.Т., Старосила Д.Б.* Антигерпетична активність препарату Нуклекс // Доп. НАН України. – 2011. – № 4. – С. 182–188.
4. *Ткачук З.Ю., Дикий Б.М., Кондрин О.Є., Пришляк О.Я., Васкул Н.В.* Застосування препарату нуклекс в терапії гепатиту С // Укр. мед. альманах. – 2011. – № 4. – С. 200–203.
5. *Порва Ю., Ткачук З., Рибалко С.* Антивірусна активність препарату Нуклекс на клітинній моделі вірусу гепатиту С // Вісн. фармакології та фармації. – 2010. – № 9. – С. 10–16.
6. *Дикий Б.М., Грижак І.Г., Ткачук З.Ю., Остяк Р.С., Васкул Н.В.* Вірусно-імунологічні та гематологічні ефекти нуклексу у ВІЛ-інфікованих осіб // Інфекційні хвороби. – 2011. – № 4. – С. 31–34.
7. *Ткачук З.Ю., Ткачук В.В., Ткачук Л.В.* Вивчення мембраностабілізуючої та протизапальної дії дріжджової РНК *in vivo* та *in vitro* // Біополімери і клітина. – 2006. – № 22. – С. 109–116.
8. *Tkachuk Z.* Multiantivirus compound, composition and method for treatment of virus diseases. – Pat. US 8420617 B2. – Filing 11.03.2011, Bull. N 13/046240.
9. *Qian J., Chandler L., Bergles E.* Characterization and Transformation Monitoring of Polymorphs of D-Mannitol with Raman Spectroscopy. Process monitoring with 1064nm Raman/ Copyright BaySpec, Inc. – San Jose, 2013.
10. *Фролов В.М., Ткачук З.Ю., Круглова О.В.* Сучасний вітчизняний препарат Нуклеїнат– фармакологічна активність та клінічне застосування // Укр. мед. альманах. – 2012. – № 4. – С. 217–227.
11. *Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней.* – Москва: Медицина, 1965. – 592 с.
12. *Aminoff D.* Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids // Biochem. J. – 1961. – № 81. – P. 384–392.
13. *Loprete M., Hartman K. A.* Conditions for the stability of the B, C and Z structural forms of poly(dG-dC) in the presence of lithium, potassium, magnesium, calcium and zinc cations // Biochemistry. – 1993. – № 32. – P. 4077–4082.
14. *Jaumot J., Gargallo R., de Juan A., Tauler R.* A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB // Chemometr. Intell. Lab. – 2005. – № 76. – P. 101–110.

REFERENCES

1. Ministry of Health of Ukraine. Nuclex: instruction for use (approved 01.09. 2010 № 752) (in Ukraine).
2. *Andreychyn M.A., Tkachuk Z.Yu., Yosyk Ya.I.* Zhurn. NAMN Ukraine, 2013, 19, No 1: 100-103 (in Ukrainian).
3. *Tkachuk Z.Yu., Rybalko S.L., Diadiun S.T., Starosyla D.B.* Dopov. NAN Ukraine, 2011, No 4: 182-188 (in Ukrainian).
4. *Tkachuk Z., Dykyi B., Kondryn A., Prishliak O., Vaskul N.* Ukr. Med. Almanakh, 2011, 14, No 4: 200-203 (in Ukrainian).
5. *Porva Y., Tkachuk Z.Y., Rybalko S.L.* Visnyk farmakolohii ta farmatsii, 2010, No 9: 10-16 (in Ukrainian).
6. *Dykyi B.M., Hryzhak I.H., Tkachuk Z.Y., Ostiak R.S., Vaskul N.V.* Infektsiini khvoroby, 2011, No 4: 31-34 (in Ukrainian).
7. *Tkachuk Z.Yu., Tkachuk V.V., Tkachuk L. V.J.* Biopolym. Cell, 2006, 22: 109-116.

8. *Pat. 8420617B2*, US, Multiantivirus compound, composition and method of treatment of virus diseases, *Tkachuk Z.*, Publ. 11.03.2011.
9. *Qian J., Chandler L., Bergles E.* Characterization and Transformation Monitoring of Polymorphs of D-Mannitol with Raman Spectroscopy, Process monitoring with 1064 nm Raman, Copyright BaySpec, Inc., San Jose, 2013.
10. *Frolov V.M., Tkachuk Z.Y., Kruglova O.V.* Ukr. Med. Almanakh, 2012, **15**, No 4: 217-227 (in Ukrainian).
11. *Manual* for the laboratory diagnosis of viral and rickettsial diseases, Moscow: Medicine, 1965 (in Russian).
12. *Aminoff D.* Biochem. J., 1961, **81**: 384-392.
13. *Loprete M., Hartman K.A.* Biochemistry, 1993, **32**: 4077-4082.
14. *Jaumot J., Gargalloa R., de Juan A., Tauler R.* Chemometr. Intell. Lab., 2005, **76**: 101-110.

Надійшло до редакції 23.04.2016

М.М. Вивчарик¹, А.А. Ильченко², С.Н. Левченко¹, З.Ю. Ткачук¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

² Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко

E-mail: vivcharykma11@rambler.ru, radastasi@gmail.com

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ РНК С МАННИТОЛОМ, ЕГО СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Изучены спектральные характеристики комплексообразования между РНК и лигандами: маннитолом, сорбитолом и лактозой, с помощью методов ИК- и рамановской фурье-спектроскопии, а также математической модели MCR-ALS. Определены оптимальные соотношения комплексообразования в системе РНК—лиганд. В смеси РНК : маннитол это соотношение составляет 3 : 1 с комплексообразованием около 100 %. В случае смеси РНК : лактоза комплексообразование уменьшается до 30 % и в смеси РНК : сорбитол — до 25 %. Полученные результаты хорошо согласуются с данными относительно противовирусной активности препаратов на культуре клеток. Оптимальное соотношение и лучшее комплексообразование в смеси РНК : маннитол практически совпадают с лучшей биологической активностью этой системы. Замена маннитола на лактозу в системе РНК—лиганд приводит к изменению биологической активности препарата с противовирусной на иммуномодулирующую и противовоспалительную активность.

Ключевые слова: препараты на основе РНК, маннитол, ИК фурье-спектроскопия, рамановская спектроскопия.

М.М. Vivcharyk¹, О.О. Ilchenko², S.M. Levchenko¹, Z.Yu. Tkachuk¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kyiv

² Taras Shevchenko National University of Kyiv

E-mail: vivcharykma11@rambler.ru, radastasi@gmail.com

COMPLEXATION OF RNA WITH MANNITOL, ITS SPECTRAL CHARACTERISTICS AND BIOLOGICAL ACTIVITY

The spectral characteristics of the complexation between the RNA and ligands such as mannitol, sorbitol, and lactose, by using the methods of FTIR and FT-Raman spectroscopy and the mathematical model MCR-ALS, are studied. The complexation optimal ratios are determined in the RNA ligand system. In the RNA: mannitol mixture, the ratio is 3 : 1 with complexation about 100 %. In the case of a RNA: lactose mixture, the complexation decreases up to 30 %, and for a RNA: sorbitol mixture, up to 25 %. The results are in a good agreement with the antiviral activity of drugs on the cell culture. The optimal ratio and the better complexation in a RNA: mannitol mixture correspond to the best biological activity of this system. As a result of the replacement of mannitol by lactose in the RNA-ligand system, the biological activity of the preparation changes from antiviral preparation to immunomodulating and anti-inflammatory ones.

Keywords: RNA-based drug, mannitol, FTIR spectroscopy, FT-Raman spectroscopy.