
doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.07.085>

УДК 577:113, 7: 577, 3

**В.Б. Щодрий¹, О.Д. Качковський²,
Ю.Л. Сломінський³, Є.О. Шайдюк⁴, З.Ю. Ткачук¹**

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

² Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ

³ Інститут органічної хімії НАН України, Київ

⁴ Інститут фізики НАН України, Київ

Email: shodryj1992@gmail.com, ztkachuk@bigmir.net

Дослідження взаємодії манітолу з нуклеозидами за допомогою флуоресцентного зонда

Представлено членом-кореспондентом НАН України М.А. Тукалом

Досліджено взаємодію рибонуклеозидів (РН) з манітолом за допомогою флуоресцентного зонда. Встановлено, що при титруванні тестового барвника зростаючими концентраціями розчинів РН та комплексу РН з манітолом (РНМ) зменшується інтенсивність флуоресценції розчину барвника. При цьому падіння інтенсивності флуоресценції комплексу РНМ значно менше, ніж у випадку з розчином РН. Також показано відмінність у спектральних характеристиках розчинів РН і комплексу РНМ з тестовим барвником. Такі результати можуть свідчити про зв'язування манітолу з азотистими основами нуклеозидів. Взаємодія між манітолом і нуклеозидами, найімовірніше, відбувається за допомогою утворення водневих зв'язків між двома паралельними гідроксильними О—Н групами манітолу і центрами генерування водневих зв'язків у гетероциклах нуклеозидів.

Ключові слова: манітол, нуклеозиди, флуоресцентний зонд.

Останнім часом у практичну медицину активно впроваджуються лікувальні препарати на основі рибонуклеїнових кислот. Вони є високоефективними, нетоксичними і з широким спектром біологічної дії [1]. Зокрема, РНК-вмісні препарати підвищують імунну реактивність організму, виявляють противірусну та протизапальну активність, регулюють основні метаболічні шляхи при різних патологічних станах [2]. На основі РНК створено ефективний противірусний препарат широкого спектра дії — нуклекс [3], діючою речовиною якого є високоочищена субстанція дріжджової РНК у комплексі з манітолом. Нуклексу притаманна специфічна противірусна активність, в основі якої лежать механізми зміни конформації поверхневих антигенів та капсидних білків вірусів. Він пригнічує гемаглютинуючу та нейрамінідазну активність вірусів грипу та парагрипу, що зумовлює блокування входження вірусів у клітину і їх реплікацію. Нуклекс також ефективно діє щодо інших вірусів, які спричиняють ГРВІ, і, отже, швидко забезпечує профілактичну та лікувальну дію. Можна припустити, що такої специфічної противірусної активності нуклекс набуває внаслідок зміни просторової

© В.Б. Щодрий, О.Д. Качковський, Ю.Л. Сломінський, Є.О. Шайдюк, З.Ю. Ткачук, 2017

ISSN 1025-6415. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2017. № 7

85

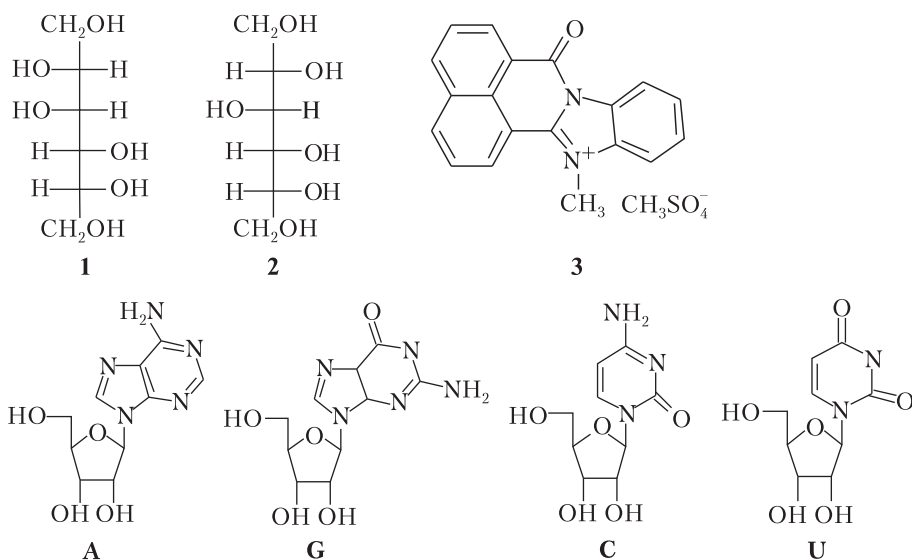


Рис. 1. Формули манітолу **1**, сорбітолу **2**, флуоресцентного зонда (SL3556) **3** та чотирьох РН: **A, G, U, C**

структури РНК під час взаємодії з манітолом, а також за рахунок комплексоутворення між РНК та манітолом [4]. Манітол — це поліморфна кристалічна тверда речовина, яка широко використовується в фармакології як наповнювач через її здатність структурувати водяну оболонку, підвищувати розчинність та стабільність лікарських засобів [5].

Грунтуючись на тому експериментальному факті, що манітол впливає на РНК [4], ми зробили припущення, що даний ефект пов'язаний з взаємодією молекули манітолу з азотистими основами РНК (АО) за допомогою утворення водневих зв'язків між воднями двох паралельних О—Н груп манітолу з однокоординованим атомом кисню та/або двокоординованим атомом азоту, які мають неподілену електронну пару (НЕП). Виникнення таких водневих зв'язків повинно значно впливати на електронну будову АО РНК, передовсім на їх планарну частину, здатну утворювати π -комплекс з будь-якою спряженою молекулою за допомогою механізму стекової взаємодії, подібно до стекової взаємодії між основами в молекулах ДНК. Зміни у стековій взаємодії можуть бути експериментально зафіксовані за допомогою флуоресцентного зонда при його взаємодії з АО РНК.

У даній роботі наведено результати систематичного спектрального і квантово-хімічного дослідження впливу манітолу на електронну структуру рибонуклеозидів (РН), а отже, і на їх здатність утворювати π -комплекс з флуоресцентною молекулою, яка поглинає та випромінює світло у видимій області спектра.

Об'єкти досліджень. Досліджували взаємодію молекули манітолу **1** з чотирма АО РН: **A, G, U, C**, хімічні формули яких наведено на рис. 1. Експериментально було показано, що манітол **1** може взаємодіяти з основами, тимчасом як його конформер сорбітол **2** такої взаємодії не виявляє [4].

З рис. 1 видно, що молекули **1** та **2** відрізняються між собою просторовим розташуванням двох гідроксильних груп О—Н біля сусідніх атомів вуглецю. Флуоресцентним зондом служив барвник з формулою метилсульфат 13-метил-7-оксо-8а,12а-дигідро-7Н-[3,1]бензи-

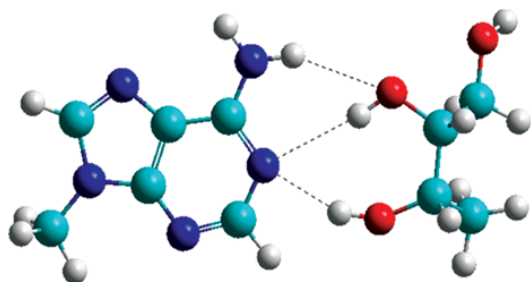


Рис. 2. Можливі водневі зв'язки між аденином та манітолом (не взаємодіючі групи в молекулі манітолу замінені на метильну групу $-\text{CH}_3$)

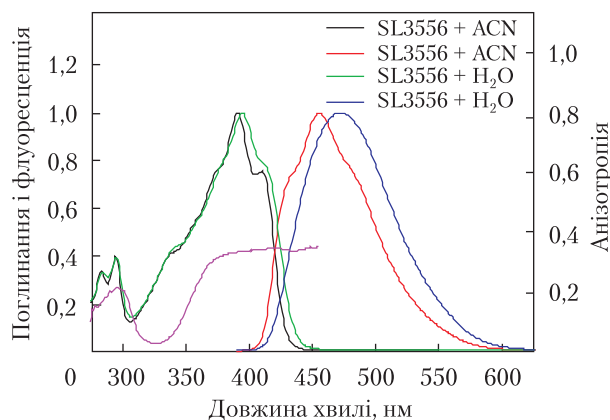


Рис. 3. Нормалізовані лінійні спектри поглинання і випромінювання барвника **3** в АЦН та воді (чорний – поглинання барвника **3** в АЦН, червоний – флуоресцентної барвника **3** в АЦН, зелений – поглинання барвника **3** у воді, синій – флуоресценція барвника **3** у воді, рожевий – анізотропія)

мідизо[2,1-а]бензо[D]ізохінолін-13 (**3**). У воді барвник **3** дисоціює на катіонну частину та протіон (CH_3SO_4^-). Катіонна частина має розгалужену спряжену систему, в якій позитивний заряд делокалізований у п'яти циклах. Як спряжена молекула барвник **3** має плоску будову, внаслідок чого може ефективно взаємодіяти з π -електронною системою кожної АО РН за допомогою стекінгового механізму.

Результати та обговорення. Головна ідея дослідження полягала в тому, що молекула манітолу як конформер з двома практично паралельними $\text{O}-\text{H}$ групами може утворювати одночасно два або три водневих зв'язки з двома атомами АО кожного РН, як це показано на рис. 2 (не взаємодіюча частина молекули манітолу замінена метильною ($-\text{CH}_3$) групою). Така взаємодія закономірно повинна змінити розподіл заряду в спряженій частині АО РН.

З іншого боку, кожна з молекул АО може взаємодіяти з молекулою барвника-сенсора **3** за стекінговим механізмом, причому відстань між молекулою основи та барвника становить $3,4 \text{ \AA}$, як і відстань між основами в РНК. Візуально таку взаємодію можна спостерігати за допомогою спектрів флуоресценції: за зміною положення смуги флуоресценції або за зміною її інтенсивності. Мт спостерігали за змінами інтенсивності флуоресценції. При цьому припускалося, що зміни в спектрі флуоресценції залежать безпосередньо від хімічної будови кожної АО в складі РН, точніше, від розподілу заряду на атомах, насамперед на тих атомах, які беруть участь в утворенні водневих зв'язків.

З іншого боку, величина спектральних ефектів повинна бути різною для комплексу барвника з індивідуальним РН і для комплексу барвника з РНМ, який пов'язаний водневими зв'язками з манітолом. За різницею спектральних ефектів цих сполук можна оцінити вплив власне манітолу.

Спектри поглинання, флуоресценції та анізотропії збудження вимірювали в ацетонітрилі з маркуванням “для ВЕРХ” і деіонізований воді при кімнатній температурі. Для контролю температури розчинів під час вимірів спектрів поглинання, флуоресценції та анізотропії збудження досліджувану комірку розміщували в Пельтьє термостабілізованому тримачі з водним охолодженням. Спектри поглинання отримували на спектрофотометрі

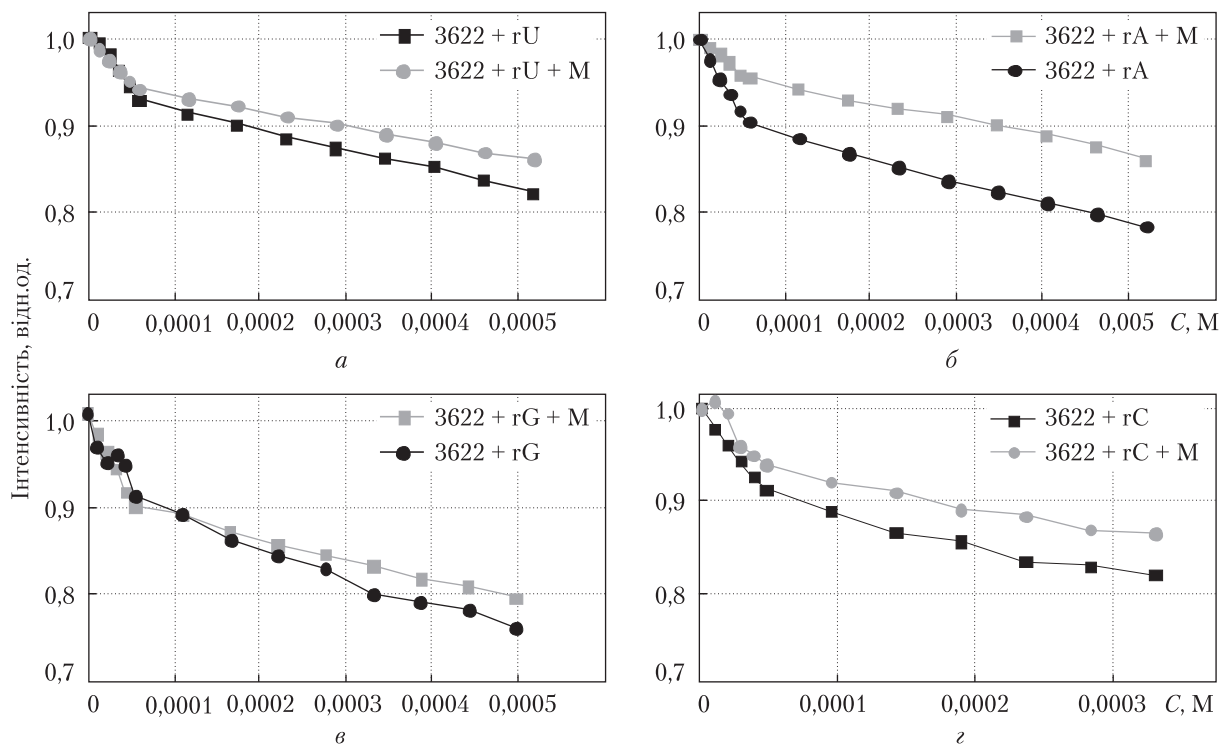


Рис. 4. Зміни інтенсивності флуоресценції: *a* – барвник + рибоуридин (rU) (rU + манітол); *б* – барвник + рибоаденозин (rA + манітол); *в* – барвник + рибогуанозин (rG+манітол); *г* – барвник + рибоцитозин (rC + манітол)

Specord 210 Plus в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм та концентрацією барвника $C \sim (3-5) \cdot 10^{-5}$ М. Спектри флуоресценції та анізотропії збудження вимірювали на спектрофлуорометрі Jasco FP-8200 в 10 мм спектрофлуорометричній кварцовій кюветі з концентрацією барвника $C \sim 10^{-5}$ М. Анізотропія збудження отримана в гліцерині з використанням “L-формату” конфігурації експерименту. Отримані спектри наведені на рис. 3.

Спектри поглинання і флуоресценції мало чутливі до природи розчинника. Велика відстань між максимумом поглинання/флуоресценції пов’язана з першим електронним переходом. Проте положення мінімуму в спектрі анізотропії, який відповідає другому електронному переходу, вказує на те, що спектральні піки в спектрі поглинання пов’язані з коливальними переходами.

Дослідження показали, що титрування розчину барвника розчинами РН та РНМ супроводжується зменшенням інтенсивності флуоресценції: це явище було взято за основу вивчення взаємодії між РН і манітолом.

Вимірювання флуоресценції проводили при сталій температурі – 35 °С. Титрування барвника РН відбувалося в таких об’ємах: 5 разів по 0,2 мкл та 6 разів по 1 мкл. Збудження проводили на довжині хвилі 300 нм. Зміну інтенсивності флуоресценції барвника фіксували при довжині хвилі 410 нм. Концентрація нуклеозидів становила $(3-4) \cdot 10^{-5}$ моль, концентрація манітолу – $1,6 \cdot 10^{-5}$ моль, концентрація барвника – $1 \cdot 10^{-5}$ моль. Графіки залежності інтенсивності флуоресценції барвника від концентрації доданих розчинів РН та РНМ наведено на рис. 4.

Під час досліджень відмічено зниження інтенсивності флуоресценції барвника під впливом РН та їх комплексів з манітолом. Як видно з рис. 4, найбільше падіння інтенсивності спостерігається при порівняно невеликих концентраціях РН; з подальшим додаванням нових порцій РН до розчину барвника спектральний ефект дещо зменшується. При достатньо великій концентрації ($5 \cdot 10^{-4}$ моль) стає помітною відмінність у чутливості інтенсивності флуоресценції. За величиною падіння інтенсивності РН можна розташувати в такому порядку: $I(\text{rG}) = 23 \%$, $I(\text{rA}) = 21 \%$, $I(\text{rC}) = 17,5 \%$, $I(\text{rU}) = 17 \%$. Різницю в падінні інтенсивності між РН і комплексом РНМ можна розташувати в такому порядку: $I(\text{rA}) = 15 \%$, $I(\text{rC}) = 9 \%$, $I(\text{rU}) = 7 \%$, $I(\text{rG}) = 5 \%$. Середня похибка вимірювання зі ступенем достовірності в 90 % становить 1–2 %. Середні довірчі інтервали для нуклеозидів і комплексу нуклеозид + манітол становлять $0,86 \pm 0,01$ та $0,91 \pm 0,01$ відповідно.

При титруванні зростаючими концентраціями РН і РНМ розчину барвника спостерігається відчутна відмінність між падінням інтенсивності флуоресценції з РН та з комплексом РНМ. Таким чином, спектральні дослідження показують вплив манітолу на інтенсивність флуоресценції барвника з РН. Показано, що при низьких концентраціях вплив манітолу на РН **rU** та **rG** практично не виявляється (див. рис. 4). Малий адитивний спектральний ефект характерний і для комплексу манітолу та **rC**, хоча при зростанні концентрації РН відмінність у падінні інтенсивності між розчином РН та розчином РНМ дещо зростає.

Як показує аналіз отриманих спектральних даних, найбільш відчутним є вплив манітолу на **rA**. Як видно з рис. 4, б, відмінність у падінні інтенсивності флуоресценції розчинів РН і РНМ виявляється чітко вже при порівняно невеликих концентраціях. При подальшому титруванні розчину барвника розчином РН **rA** спектральний ефект зростає.

Таким чином, відмінність у спектральних ефектах розчинів РН і РНМ з тестовим барвником однозначно свідчить про вплив манітолу на АО, особливо у випадку аденозину. Взаємодія відбувається, найімовірніше, за допомогою утворення водневих зв'язків між воднями двох паралельних гідроксильних О—Н груп та центрами генерування водневих зв'язків у азотистих основах нуклеозидів.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Sullenger B.A., Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature*. 2002. **418**. P. 252–258.
2. Burnett J.C., Rossi J.J. RNA-Based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry & Biology*. 2012. **19**. P. 60–71.
3. Multiantivirus compound, composition and method for treatment of virus disease: Pat.US 8722642 B2. Publ. 13.05.2014.
4. Вівчарик М.М., Ільченко О.О., Левченко С.М., Ткачук З.Ю. Комплексоутворення РНК з манітолом, його спектральні характеристики та біологічна активність. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2016. № 10. С. 78–83. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.10.078>
5. Ye P., Byron T. Characterization of D-Mannitol by Thermal Analysis, FTIR, and Raman Spectroscopy. *Am. Lab.* 2008. **40**. P. 24–27.

Надійшло до редакції 07.03.2017

REFERENCES

1. Sullenger, B. A. & Gilboa, E. (2002). Emerging clinical applications of RNA. *Nature*, 418, pp. 252-258.
2. Burnett, J. C. & Rossi, J. J. (2012). RNA-Based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry & Biology*, 19, pp. 60-71.
3. Multiantivirus compound, composition and method for treatment of virus disease, Pat.US 8722642 B2, Publ. 13.05.2014.
4. Vivcharyk, M. M., Ilchenko, O. O., Levchenko, S. M. & Tkachuk, Z. Yu. (2016). Complexation of RNA with mannitol its spectral characteristics and biological activity. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 10, pp. 78-83 (in Ukrainian). doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.10.078>
5. Ye, P. & Byron, T. (2008). Characterization of D-Mannitol by Thermal Analysis, FTIR, and Raman Spectroscopy. *Am. Lab.*, 40, pp. 24-27.

Received 07.03.2017

В.Б. Щодрий¹, А.Д. Качковский², Ю.Л. Сломинский³, Е.А. Шайдюк⁴, З.Ю. Ткачук¹

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

² Інститут біоорганічної хімії та нафтехімії НАН України, Київ

³ Інститут органічної хімії НАН України, Київ

⁴ Інститут фізики НАН України, Київ

Email: shodryj1992@gmail.com, ztkachuk@bigmir.net

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МАННИТОЛА С НУКЛЕОЗИДАМИ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА

Исследовано взаимодействие рибонуклеозидов (РН) с маннитолом с помощью флуоресцентного зонда. Установлено, что при титровании тестового красителя возрастающими концентрациями растворов РН и комплекса РН с маннитолом (РНМ) уменьшается интенсивность флуоресценции раствора красителя. При этом падение интенсивности флуоресценции комплекса РНМ значительно меньше, чем в случае с раствором РН. Также показано различие в спектральных характеристиках растворов РН и комплекса РНМ с тестовым красителем. Такие результаты могут свидетельствовать о связи маннитола с азотистыми основаниями нуклеозидов. Взаимодействие между маннитолом и нуклеозидами, скорее всего, происходит с образованием водородных связей между двумя параллельными гидроксильными О–Н группами маннитола и центрами генерации водородных связей в гетероциклах нуклеозидов.

Ключевые слова: маннитол, нуклеозиды, флуоресцентный зонд.

V.B. Shchodryi¹, O.D. Kachkovskiy², Yu.L. Slominskiy³, Ye.O. Shaidyuk⁴, Ze.Yu. Tkachuk¹

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

² Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

³ Institute of Organic Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

⁴ Institute of Physics of the NAS of Ukraine, Kiev

Email: shodryj1992@gmail.com, ztkachuk@bigmir.net

STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN MANNITOL AND NUCLEOSIDES USING FLUORESCENT PROBE

We have studied the interaction of ribonucleosides (RN) with mannitol using a fluorescent probe. It is established that, during of the test dye titration with increasing concentrations of solutions of RN and the complex of RN with mannitol (RNM), a decrease of the intensity of fluorescence of a dye solution is observed. The drop of the fluorescence intensity of the RNM complex is less in comparison to the solution of RN. A difference in spectral characteristics of RN and the complex of RNM with a test dye is shown. These results may indicate the interaction of mannitol with nitrogenous base. Interaction between mannitol and nucleoside occurs probably with the formation of hydrogen bonds between two parallel O–H groups of mannitol and generating centers of hydrogen bonds in the heterocycles of nucleosides.

Keywords: mannitol, nucleosides, fluorescent probe.