

З. Ю. Ткачук

## Вплив препаратів нуклеїнових кислот на агрегацію тромбоцитів людини *in vitro*

(Представлено академіком НАН України О. О. Мойбенком)

*In the model of aggregation of human thrombocytes induced by arachidonic acid, it has been shown that nucleic acid samples possess high antiaggregation activity. Particularly, it turned out that purified yeast RNA is highly effective and showed well-prominent characteristics in a wide range of concentrations. Sodium salt of analogous yeast RNA turned out twice as less effective and operated in a much narrower range of concentrations. This is an evidence of the antiinflammatory activity of purified yeast RNA.*

Лікарські засоби на основі нуклеїнових кислот все більше застосовуються для лікування різноманітних захворювань. Зараз в Україні успішно застосовується капсульна лікарська форма нового імуномодулятора “Нуклеїнат” на основі високоочищеної дріжджової РНК компанії ДП “Біосел”, яка пройшла державну реєстрацію [1]. Дозволена до клінічних випробовувань 3% ін’єкційна лікарська форма “Нуклеїнату”, яка виготовляється з аналогічної субстанції. На фармацевтичному ринку Росії запропоновані у вигляді ін’єкційної лікарської форми нові препарати “Деринат” “Феровір” “Нуклеоспермін”, виготовлені на основі ДНК, та препарат “Натрію нуклеїнат”, виготовлений на основі натрієвої солі дріжджової РНК. Розпочато реєстрацію цих препаратів в Україні.

В інструкціях для застосування і в літературі немає даних про вплив ін’єкційних лікарських форм нуклеїнових кислот на агрегатні властивості крові [2]. У той же час відомо, що один із похідних нуклеїнових кислот АТФ викликає агрегацію тромбоцитів при додаванні до плазми, багатої тромбоцитами.

Порушення агрегатного стану крові відіграють важливу роль у патогенезі багатьох захворювань, особливо це проявляється в патогенезі різних судинних захворювань людини [3–6]. Підвищена агрегація тромбоцитів спостерігається у здорових людей і з 30 до 50 років зростає від 20 до 53%. Вона виявляється у хворих на цироз печінки, гострі інфекційні захворювання, діабет, атеросклероз, рак, після інфаркту міокарда і при тромбоемболічних ускладненнях. Підвищена агрегація при загрозі тромбозу служить показником до антикоагуляційної терапії, яку проводять для нормалізації агрегації [6].

Оскільки препарати нуклеїнових кислот рекомендуються при вказаних захворюваннях, метою дослідження було вивчення впливу нуклеїнових кислот різного походження та їх натрієвої солі, з домішками білка та різного ступеня чистоти на агрегацію тромбоцитів, індукованою арахідоновою кислотою.

**Матеріали та методи.** Досліджували такі препарати нуклеїнових кислот: ДНК-Т (з тимуса великої рогатої худоби) та ДНК-ЕК (з еритроцитів курчат) фірми “Reanal” (Угорщина), препарати ДНК містили близько 3% РНК та 2,5% білка; препарат тРНК з *Escherichia coli* виробництва “Serva” (США) та сумарну дріжджову РНК (РНК-Д) у кінцевій концентрації  $1 \cdot 10^{-2}\%$ . За стандарт протизапального препарату використовували аспірин у концентрації 0,06 мг на пробірку із збагаченою тромбоцитами плазмою.

**Виділення РНК.** З *Saccharomyces cerevisiae* була отримана РНК-Д, а з *Candida utilis* виділили РНК-П, її натрієву сіль РНК-ПН та високоочищену РНК-Ф. Екстракцію дріжджової РНК проводили за допомогою 10–12% розчину хлористого натрію при 100–110 °С. РНК відділяли від дріжджових залишків, охолоджували до 0 °С та підкислювали соляною кислотою до рН 1–2. Після випадання в осад РНК промивали етиловим спиртом, висушували та розчиняли у воді. Гідроокисом натрію розчин доводили до рН 8,0–8,2. До розчину додавали панкреатин та витримували близько 1 год при 37–40 °С. Фермент інактивували кип'ятінням, після чого розчин фільтрували. РНК осаджували охолодженим етиловим спиртом, підкисленим соляною кислотою до рН 1–2 та висушували. Таким чином була отримана сумарна РНК-Ф, що містила домішки ДНК та білок (табл. 1). Далі осад РНК фільтрували, промивали етиловим спиртом та розчиняли у воді, додаючи гідроокис натрію до рН 6,2–6,5. РНК-ПН осаджували етиловим спиртом, осад фільтрували та сушили. РНК-П отримували з РНК-Ф шляхом додаткового очищення від білків за допомогою повторної інкубації з панкреатином при 37–40 °С. Потім фермент інактивували кип'ятінням протягом 10 хв. Розчин РНК-П фільтрували та осаджували підкисленим до рН 1–2 спиртом, після чого осад РНК-П фільтрували, промивали етиловим спиртом та сушили. Кінцевий продукт був доочищений від ДНК і білка та мав жовто-сірий колір. Результати хімічного аналізу препаратів нуклеїнових кислот представлені в табл. 1. Електрофорез у 15%-му поліакриламідному гелі з DS-Na та 7 М сечовиною проводили за методикою, спеціально розробленою для ідентифікації малих РНК [7].

Вплив препаратів нуклеїнових кислот на агрегацію тромбоцитів під впливом арахідонової кислоти вивчали за методом Ворн [8]. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи критерій Стьюдента.

Арахідонова кислота в значних кількостях міститься в кров'яних пластинках. Вміст вільної арахідонової кислоти в плазмі незначний, а в тромбоцитах вона практично відсутня, тому додавання її до збагаченої тромбоцитами плазми приводить не тільки до синтезу простагландинів, але й до агрегації тромбоцитів. Параметром агрегації було вибрано індекс агрегації клітин (ІА), який дорівнював:

$$IA = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 100\%,$$

де  $D_1$  — оптична густина збагаченої тромбоцитами плазми з арахідоновою кислотою як індуктором агрегації тромбоцитів без інкубації;  $D_2$  — оптична густина проінкубованої з препаратом нуклеїнової кислоти, збагаченої тромбоцитами плазми з арахідоновою кислотою як індуктором агрегації тромбоцитів.

**Результати та обговорення.** На першому етапі вивчали вплив препаратів нуклеїнових кислот різного походження і природи на індекс агрегації тромбоцитів людини під впливом арахідонової кислоти. У досліді разом з РНК кишкової палички та дріжджів вивчали ДНК,

Таблиця 1. Хімічний аналіз препаратів дріжджової РНК

Тип препарату	Вміст азоту, %	Вміст фосфору, %	Вміст білка, %	Вміст ДНК, %
РНК-Ф	14,16	8,20	< 2	1,2
РНК-П	15,49	9,05	—	1,0
РНК-ПН	14,65	8,54	—	1,0
РНК-Д	15,16	8,60	—	1,1

виділену з птахів та великої рогатої худоби. Для порівняння служив відомий препарат “Аспірин”. Результати дослідження наведені в табл. 2.

Результати дослідів показали, що препарати рибонуклеїнових кислот у концентрації  $1 \cdot 10^{-2}\%$  істотно пригнічують агрегацію тромбоцитів, індукованих арахідоною кислотою. Так, РНК, виділена з дріжджів *S. cerevisiae* (РНК-Д), майже в два рази сильніше (59,7%) пригнічує агрегацію індукованих тромбоцитів, ніж препарат “Аспірин” (38,6%); тРНК *E. coli* також істотно (на 52,23%) пригнічує агрегацію тромбоцитів. Препарат ДНК тимуса великої рогатої худоби (ДНК-Т) пригнічував агрегацію тромбоцитів на 54,45%, що майже на рівні дріжджової РНК, а препарат ДНК еритроцитів курчат (ДНК-ЕК) діяв на рівні аспірину (36,93%). Таким чином, препарати нуклеїнових кислот різного походження і природи виявили чіткий антиагрегаційний ефект на моделі агрегації тромбоцитів людини під впливом арахідонової кислоти. Оскільки в препаратах ДНК-Т міститься до 3% РНК, можна припустити, що виявлений ефект виникає за рахунок наявної в ній РНК.

Раніше японськими дослідниками було показано згубну дію ін'єкцій ДНК у кров, що призводить до поліартриту [9], тому ми виключили з вивчення препарати ДНК і вивчали вплив РНК на агрегацію індукованих тромбоцитів.

Як впливає з даних табл. 3, дріжджова РНК діє в широкому діапазоні концентрацій від 0,1% до  $1 \cdot 10^{-5}\%$ , пригнічуючи агрегацію тромбоцитів від 78,5 до 14,2% відповідно. Однак збільшення концентрації РНК до 0,5% приводить до різкого зменшення індексу агрегації, що може вказувати на зміни властивостей мембрани тромбоцитів. Отже, максимальною для інфузійних розчинів РНК є концентрація 0,1%, а оптимальна концентрація знаходиться в межах між 0,1 та 0,01%.

Ефект пригнічення агрегації тромбоцитів залежить від чистоти препарату РНК і її натрієвої солі. Дані, наведені у табл. 4, свідчать про те, що препарат РНК, очищений від білка на третину, покращує її антиагрегатні властивості та розширює межі оптимальної концентрації інфузійного розчину. У той же час недостатньо очищена РНК-Ф з домішками білка і меншим вмістом азоту та фосфору діяла значно слабше в діапазоні концентрацій від 0,1

Таблиця 2. Вплив нуклеїнових кислот у концентрації  $1 \cdot 10^{-2}\%$  та аспірину на індекс агрегації тромбоцитів, індукованих арахідоною кислотою

Препарат	ІА, %	P
Аспірин	38,66 ± 6,71	< 0,02
РНК-Д	59,73 ± 4,24	< 0,01
ДНК-Т	54,45 ± 3,76	< 0,2
ДНК-ЕК	36,93 ± 1,88	< 0,01
тРНК	52,23 ± 8,13	> 0,5

Таблиця 3. Вплив різних концентрацій дріжджової РНК (РНК-Д) на індекс агрегації тромбоцитів, індукованих арахідоною кислотою

Концентрація РНК-Д, %	Індекс агрегації, %
0,5	12,20 ± 3,91*
0,1	78,58 ± 7,51**
$1 \cdot 10^{-2}$	53,08 ± 3,23**
$1 \cdot 10^{-3}$	28,88 ± 1,63*
$1 \cdot 10^{-4}$	43,35 ± 10,30**
$1 \cdot 10^{-5}$	14,23 ± 4,98*

\*P > 0,001. \*\*P < 0,01.

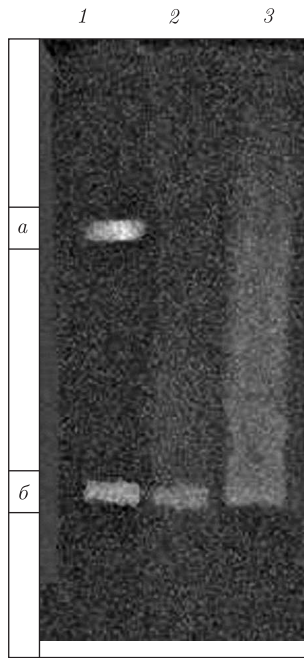


Рис. 1. Електрофорез для малих РНК у 15%-му ПААГ, який містив DS-Na та 7 М сечовину, препаратів: тРНК *E. coli* (смужка 1, сектор а), 25-членний олігонуклеотид (смужка 1, сектор б), високоочищена дріжджова РНК (смужка 2), натрієва сіль дріжджової РНК (смужка 3)

до  $1 \cdot 10^{-3}\%$ . Наприклад, у найвищій концентрації препарат РНК-Ф пригнічував агрегацію тромбоцитів на 57,9%, а в найнижчій концентрації — на 18,3%. Високоочищена РНК-П пригнічувала агрегацію тромбоцитів на третину сильніше — на 84 та 29,7% відповідно.

Досить важливими виявилися результати вивчення натрієвої солі РНК, яка є субстанцією для відомого препарату “Натрію нуклеїнат”. Переведення препарату з рибонуклеїнової кислоти в її сіль досить радикально гасить її антиагрегатні властивості. Цей препарат РНК-ПН у найвищій концентрації діяв у два рази слабше (45,9%), а в найнижчій концентрації взагалі не виявляв антиагрегатних властивостей, хоч за чистотою він мало відрізнявся від РНК-П (див. табл. 1). Істотно, що межа оптимальної концентрації для інфузійного розчину цього препарату також у десять разів вужча.

Подальше електрофоретичне вивчення препаратів РНК за допомогою особливо розробленого методу для малих РНК в 15% поліакриламідному гелі (ПААГ), який містив DS-Na та 7 М сечовину, показало значну відмінність у структурі даних РНК (рис. 1). Коли були використані як маркери молекулярної маси тРНК *E. coli* та олігонуклеотид завдовжки 25 членів, то в умовах електрофорезу для малих РНК високоочищена дріжджова РНК руха-

Таблиця 4. Вплив різних концентрацій і ступеня очищення РНК та її натрієвої солі на індекс агрегації тромбоцитів, індукованих арахідоною кислотою, %

Концентрація препарату, %	РНК-П, високоочищена	РНК-ПН, натрієва сіль	РНК-Ф, недостатньо очищена
0,1	$84,09 \pm 3,77^*$	$45,96 \pm 8,96^*$	$57,90 \pm 9,58^{*2}$
$1 \cdot 10^{-2}$	$71,91 \pm 8,45^*$	$55,44 \pm 8,04^{*4}$	$60,90 \pm 10,39^{*5}$
$1 \cdot 10^{-3}$	$29,76 \pm 5,36^*$	$3,72 \pm 2,40^{*3}$	$18,26 \pm 5,46^{*4}$

\* $P < 0,001$ . \* $^2P < 0,02$ . \* $^3P < 0,1$ . \* $^4P < 0,2$ . \* $^5P < 0,5$ .

лася гомогенною смужкою в зоні 25 нуклеотидів, тоді як натрієва сіль дріжджової РНК рухалася гетерогенною смугою починаючи від маркера тРНК з молекулярною масою 19000 аж до смужки 25-членного олігонуклеотиду з молекулярною масою 7000.

Отже, на моделі агрегації тромбоцитів, індукованих арахідоновою кислотою, показано, що препарати нуклеїнових кислот і особливо високоочищені РНК дріжджів, на відміну від її натрієвої солі, мають добре виражені антиагрегатні властивості з широкою межею оптимальної концентрації. Високоочищена дріжджова РНК своєю гомогенністю та низькою молекулярною масою, що дозволяє зберегти її до малих РНК, також вигідно відрізняється від гетерогенної натрієвої солі дріжджової РНК.

Описані вище позитивні властивості високоочищеної дріжджової РНК у порівнянні з її натрієвою сіллю були реалізовані при створенні різних лікарських форм імуномодуляторів під комерційною назвою “Нуклеїнат” і в тому числі ін’єкційної форми даного препарату.

1. *Нуклеїнат*. Реєстраційне посвідчення на лікарський засіб. № UA/2885/01/02 від 17.03.2005. – № 112.
2. Пащук Л. К., Апрышко Г. Н., Трещалина Е. М. Препараты ДНК как потенциальные терапевтические средства // Химико-фармацевт. журн. – 1995. – **29**, № 6. – С. 61–64.
3. Zhou Q., Hellermann G. R., Solomonson L. P. Nitric oxide release from resting human platelets // *Thromb. Res.* – 1995. – **77**, No 1. – P. 87–86.
4. Calver A., Collier J., Moncada S., Vallance P. Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginin in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal // *J. Hypertens.* – 1990. – **10**, № 9. – P. 1025–1031.
5. Calver A., Collier J., Valance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabet // *J. Clin. Invest.* – 1992. – **90**, No 6. – P. 2548–2554.
6. Drexler H., Zeiher A. M., Meinzer K., Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patient by L-arginine // *Lancet.* – 1991. – **21–28**, No 338. – P. 8782–8783; 1546–1550.
7. Mette M. F., Autsatz W., van der Winden J. et al. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded // *EMBO J.* – 2000. – **19**. – P. 5194–5201.
8. Born L. V. R. The aggregation of blood platelets by diphosphate and its reversal // *Nature.* – 1962. – **94**. – P. 327.
9. Kohki Kawane, Mayumi Ohtani, Keiko Miwa et al. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages // *Nature.* – 2006. – **443**. – P. 998–1002.

*Інститут молекулярної біології  
і генетики НАН України, Київ  
ДП “БіоСел”, Київ*

*Надійшло до редакції 15.02.2008*