

# СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ БЕЗМАТРИЧНОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИЕЙ ДЕФЕКТНОГО ГЕНА P408W КРИСТАЛЛИЧЕСКИМИ НАНОКОЛОНИЯМИ МОНТМОРИЛОНИТА

**Буряченко С. В.**

Лаборатория клеточной биохимии, НИИ биологии, Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, Харьков, Украина

**Введение.** Представлены основные результаты исследования способа лечения дефектного гена P408W и фенилкетонурии безматричной полимеризацией кристаллическими нанокolonиями монтморилонита. Изучено влияние кристаллов монтморилонита на восстановление дефектного гена P408W на экспериментальных животных крыс – детенышей линии Вистар 1 - , 3 - , 5 – месячного возраста. Показано, что молекулярные нанокolonии монтморилонита ведут себя как SSB – белки, они способны концентрировать из окружающей водной среды и стабилизировать активированные рибонуклеотиды, катализировать полимеризацию рибонуклеотидов, обеспечивать относительную хиральную однородность синтезированных полирибо-нуклеотидов (РНК), иммобилизовать РНК — как матрицы, так и их копии. Кристаллы монтморилонита – это двухмерная модель генов и являются основой для построения молекул ДНК и РНК. Восстановление дефектных генов происходит за счет пор на кристаллах, в которых концентрируется субстрат для синтеза РНК и ДНК, синтез РНК и ДНК длиной 40 и более нуклеотидов, их перенос кристаллами. Рассматривается способ введения кристаллов в капсулах с пептидазной оболочкой непосредственно в тонкий кишечник организма больного животного и на реакции ПЦР показано взаимодействие кристаллов и восстановление генов.

**Цель и задачи.** Исследовать способ лечения фенилкетонурии в эксперименте животных с врожденным дефектом гена P408W и его восстановления до физиологического уровня. Главными предпосылками исследования были предыдущие исследования по изучению биохимических свойств каолинита и монтморилонита. Именно лечение глинами в народной медицине (И. Йотов, 1985) 1 - , 2 – и 3 – стадии рака и многих других заболеваний, А. Дж. Кернеса – Смита, А. Вейсса, М. Эйген, Дж. Бернала (1971, 1982), Н. П. Юшкин (1994, 1999, 2000) послужило основой для нашего исследования. Мы поставили задачу определить за какой срок восстановится дефектный ген P408W у животного с врожденной фенилкетонурией, доказать что кристаллы монтморилонита имеют свойства двухмерных генов, обладают антимуtagenными свойствами. Лечение проводили перорально введением кристаллов нанокolonий монтморилонита с помощью пептидазных капсул.

**Материалы и методы.** Для проведения эксперимента были взяты лабораторные крысы линии Вистар с мутацией гена P408W и развитием фенилкетонурии. Животным вводили растворенные в воде кристаллы нанокolonий монтморилонита с помощью пептидазных капсул. Введение продолжали ежедневно в течении 3 месяцев. Результаты оценивали по анализу на ФКУ по анализу крови колориметрическим методом. Из тканей выделяли нуклеиновые кислоты. Синтезировали пару праймеров – олигонуклеотиды (по 20 п. н.). Потом ставили полимеразную цепную реакцию, с заменой фермента ДНК – полимеразы на кристаллические нанокolonии монтморилонита предварительно подрощенные. Секвенирование ДНК. Зная последовательности нуклеотидов фланкирующих клонируемую последовательность мы синтезировали пару праймеров комплементарных фланкирующим последовательностям размножаемого фрагмента ДНК. После денатурации изучаемого фрагмента ДНК, т. е. разделения на две нити при высокой температуре (94<sup>0</sup>С) температуру мы начали снижать до 55<sup>0</sup> С, в реакционную смесь затем

добавили праймеры, которые комплементарно связываются с соответствующими участками этих нитей и добовляли кристаллы нанокolonий монтморилонита, а также набор из 4 свободных нуклеотидов.

**Основные результаты.** Использованные нами кристаллические нанокolonии монтморилонитовых глин, при ПЦР, исправляют дефектный мутированный ген PАН R408W на каждой цепи достраивая комплементарную цепь (достраивание цепей ДНК происходило при промежуточной температуре, при 72<sup>0</sup> С). Затем следовала денатурация вновь образованных ДНК цепей с помощью температурной обработки, к которой кристаллы нанокolonий монтморилонита не чувствительны. К вновь образованным нитям фрагмента ДНК снова присоединяются свободные праймеры, и достраивание комплементарных цепей с помощью кристаллов нанокolonий монтморилонита происходит уже на 4 нитях исследуемой ДНК. Затем снова следует денатурация вновь образованной ДНК, и цикл достраивания повторяется теперь уже на 8 нитях. Мы использовали 25 циклов. Молекулярные нанокolonии монтморилонита ведут себя как SSB – белки, они способны концентрировать из окружающей водной среды и стабилизировать активированные рибонуклеотиды, катализировать полимеризацию рибонуклеотидов, обеспечивать относительную хиральную однородность синтезированных полирибонуклеотидов (РНК), иммобилизовать РНК — как матрицы, так и их копии, не давать им уходить в окружающий раствор, более прочно связывать одנותяжные РНК, чем двутяжные, что стабилизирует способное к репликации состояние, компартиментализовать РНК в отсутствие липидных мембран (формировать колонии РНК), удерживать рядом разные виды РНК, которые могли бы создавать смешанную колонию, и обеспечивать их совместное наследование, формировать липосомы вокруг колоний РНК. В присутствии 10-нуклеотидного праймера на кристаллах происходит спонтанное образование РНК длиной 40 нуклеотидов и больше. 85 % синтеза представлены РНК, в которых нуклеотиды связаны между собой 3' – 5' связями. Именно эти связи присутствуют в нормальных природных физиологических РНК. Кристаллы монтморилонита придают процессу полимеризации нуклеотидов определенную хиральную селективность. При удлинении синтезируемого полинуклеотида его гомохиральность усиливается. В кристаллах монтморилонита образуются протомолекулы РНК, защищают рибозимы от ультрафиолетового излучения. Кристаллы нанокolonий монтморилонита гидрофильны, содержат необходимого размера поры, обладают способностью концентрировать на себе субстраты для синтеза РНК, ДНК и генов, способны нести на себе нуклеотиды РНК и ДНК, в 100 раз ускоряет формирование липосом. Кристаллы нанокolonий монтморилонита имеют 2 – 3 слоя и представляют собой модель двумерного гена.

**Заключение/Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том что:

1. Мутированный дефектный ген PАН R408W восстанавливается в течении от 2 до 4 месяцев в зависимости от возраста животных и приобретает нормальные функции;
2. Введение больным животных капсул с кристаллами нанокolonий монтморилонита с пептидазной капсулой оказалось эффективным способом доставки препарата в тонкий кишечник;
3. Кристаллы нанокolonий монтморилонита обладают в клетках свойством SSB – белков, гидрофильны, способны концентрировать на себе субстраты ДНК, РНК, генов;
4. Полимеризация ДНК осуществляется с помощью кристаллов нанокolonий монтморилонита также как и с ферментами ДНК-полимеразами и нуклеотиды связаны между собой 3' – 5' связями;
5. Кристаллы нанокolonий являются физическим субстратом для синтеза и переноса ДНК и РНК.