

На правах рукописи

САВИЩЕНКО

Елена Анатольевна

**ГИДРОКОРТИЗОНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРОВ
ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ В ЖИВОТНЫЕ КЛЕТКИ**

03.01.04 - Биохимия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2010 г.

Работа выполнена в Отделе молекулярной генетики Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН, Санкт-Петербург и ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет)».

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Михаил Михайлович Шавловский

Научный консультант: доктор химических наук, профессор
Анатолий Иосифович Гинак

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Владимир Николаевич Кокряков

доктор биологических наук, профессор
Надежда Васильевна Кириллова

Ведущее научное учреждение: Учреждение Российской академии
медицинских наук
Научно-исследовательский институт
гриппа Северо-Западного отделения
РАМН

Защита состоится «___» _____ 2010 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.022.03 в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте экспериментальной медицины СЗО РАМН по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский проспект, дом 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургского научно-исследовательского института экспериментальной медицины СЗО РАМН.

Автореферат разослан «___» _____ 2010 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор**

Пучкова Л.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Идея коррекции различных дефектов путем введения в клетки организма недостающей или исправляющей генетической информации была выдвинута в начале 1970 годов, но получила свое развитие значительно позже (*Wolff and Lederberg, 1994; Горбунова и Баранов, 1997; Anderson W.F., 1998*). Основанный на этой идее способ лечения получил название «генная терапия». Однако, несмотря на впечатляющие успехи генной инженерии, достижения клеточного трансгеноза и успешное развитие представлений о молекулярных механизмах патогенеза многих заболеваний, методы доставки чужеродной генетической информации в клетки целого организма все еще крайне несовершенны. Наиболее эффективными по уровню трансфекции до сих пор остаются вирусные методы, суть которых заключается в создании abortированных несущих целевые гены вирусов, которые, не вызывая инфекции, обеспечивают внедрение этих генов в ядра клеток организма *in vivo*. К сожалению, целый ряд сопутствующих осложнений (*Hacein-Bey-Abina et al., 2003. Baum et al., 2006. McElvaney et al., 1995. Raperet al., 2003. Muruve, 2004*) все в большей степени подтверждают мнение о необходимости изыскания более совершенных и безвредных способов для генной терапии. Одной из главных альтернатив вирусным способам доставки генетического материала является использование плазмид, содержащих в своей структуре экспрессируемые целевые гены. Плазмиды имеют целый ряд преимуществ перед вирусами и, кроме того, могут представлять собою очищенные препараты ДНК. Основные трудности использования плазмид заключаются в необходимости их комплексирования с целым рядом дополнительных соединений, которые обеспечивают устойчивость, целевую доставку, способность проникать через клеточные мембраны и через ядерные барьеры. Несмотря на многочисленные попытки создания оптимальных конструкций, применение плазмидного материала все еще недостаточно эффективно, число трансфицированных клеток обычно не превышает 10%, что недостаточно для устранения большинства генетических дефектов и крайне низко для терапии злокачественных новообразований. В настоящее время испытаны разные плазмидные комплексы, но в целом проблема использования плазмидной ДНК *in vivo* остается нерешенной. Поэтому изыскание новых путей доставки в клетки генетического материала представляется весьма актуальным.

Цель работы заключается в получении гидрокортизоновых производных на основе катионных полимеров, которые могли бы быть использованы в качестве векторов для генной терапии *in vivo*.

Задачи исследования.

1. Разработать методики синтеза конъюгатов гидрокортизона (ГК) и катионных полимеров.
2. Получить в очищенном состоянии ГК производные полилизина (ПЛ), полиэтиленimina (ПЭИ) и белка протамина (ПТ).
3. Определить степень модификации полимеров лигандом.
4. Изучить способность конъюгатов взаимодействовать с плазмидными ДНК (пл ДНК).
5. Получить комплексы конъюгатов с ДНК (наночастицы), оптимально подходящие по размерам для трансфекции эукариотических клеток.

6. Определить способность наиболее перспективных наночастиц осуществлять транспорт пл ДНК в клетки экспериментальных животных.

Научная новизна полученных результатов. Впервые синтезированы производные ПЛ, ПЭИ и ПТ, содержащие в качестве лиганда ГК, который способен путем рецепторного эндоцитоза проникать в эукариотические клетки и далее транспортироваться через мембранные барьеры в ядра. Охарактеризованы физико-химические свойства полученных конъюгатов. Показано их эффективное связывание с пл ДНК. Разработаны методики формирования комплексов векторный конъюгат – ДНК. Найдено, что оптимальные по размерам комплексы (наночастицы) могут быть получены при взаимодействии ДНК, конъюгатов и белка лактоферрина (ЛФ). Выявлена трансфецирующая активность наночастиц при введении в организм экспериментальных животных.

Практическое значение результатов исследования заключается в организации дополнительных исследований, направленных на разработку протоколов использования векторных конструкций (наночастиц) для генной коррекции патологических состояний. Полученные результаты могут быть использованы для образовательных целей.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. На основе катионных полимеров, как синтетических, так и природных, карбодиимидным методом могут быть получены конъюгаты с функциональным лигандом – ГК.
2. Степень модификации полученных производных катионных полимеров легко оценивается спектрофотометрически.
3. ГК-производные полимеров эффективно связываются с пл ДНК. Взаимодействие модифицированных полимеров с ДНК в определенных пределах зависит от строения плазмиды (нуклеотидного состава, размеров и конформации).
4. Комплексообразование ГК-производных полилизина, полиэтиленimina и протамина с ДНК сопровождается формированием частиц, размеры которых превышают необходимые для трансфекции.
5. Введение дополнительного компонента – белка ЛФ способствует образованию наночастиц (пл ДНК – ГК-производное – ЛФ), размеры которых (около 30 нм) соответствуют требованиям для эффективной трансфекции.
6. В опытах на лабораторных животных показана трансфецирующая активность комплексов пл ДНК – ГК-ПТ – ЛФ на уровне целого организма при парентеральном введении.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы докладывались в виде устных и стендовых сообщений на следующих конференциях: III научно-техническая конференция аспирантов СПбГТИ (ТУ), Санкт-Петербург, 2000 г.; Пятая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье», Санкт-Петербург, Санкт-Петербургский государственный университет, 2002 г.; - Научно-практическая конференция молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования, 2002 г.; - Научно-практическая конференция молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и

экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования, 2008 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано пять печатных работ, из них одна в рецензируемом журнале по списку ВАК РФ.

Личный вклад автора в проведение исследования. Соискателем были проведены: анализ литературы по теме исследования, планирование экспериментов, получение основной части результатов, написание статьи и подготовка докладов на конференциях. Синтез ГК-производных катионных полимеров, используемых в работе, анализ взаимодействия ГК-производных катионных полимеров с пл ДНК, определение относительного размера наночастиц по связыванию бромистого этидия, а также хроматографический анализ конъюгатов и трансфекция полученными векторами *in vivo* лабораторных животных, клеточных линий были выполнены соискателем. Гидродинамические размеры наночастиц определены по светорассеянию на лазерном корреляционном спектрометре ЛКС-03 научным сотрудником Института гриппа РАМН П.А. Некрасовым.

Внедрение результатов работы. Научные результаты и практические рекомендации могут быть внедрены в научный и учебный процессы Отдела молекулярной генетики Научно-исследовательского института экспериментальной медицины СЗО РАМН (Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул.Ак.Павлова, 12), кафедры «Молекулярная биотехнология» ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет)» (Россия, 190013, Санкт-Петербург, Московский пр., 26); кафедры «Медицинская биология и генетика» ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский Университет имени академика И.П. Павлова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (Россия, 197089, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8).

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», «Выводы» и «Список цитируемой литературы», включающий 197 наименований, из них 7 источников на русском языке и 190 на иностранном языке. Диссертация изложена на 127 страницах. Результаты представлены в 4 таблицах и иллюстрированы 18 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе были использованы: гемисукцинат ГК (11 β , 17 α , 21-тригидрокси-4-прегнен-3,20-дион-21-гемисукцинат) «Sigma» (мол.м. 462,5), полиэтиленимин (мол.м. 12000), полилизин (мол.м. 30000), протамин-сульфат (мол.м. 4000), N,N-дициклогексилкарбодиимид (мол.м. 206,33), все неорганические соли, реагенты и материалы для электрофорезов и хроматографии фирм «Sigma» и «Serva»; белые беспородные мыши (из питомника Рапполово, С-Пб) в возрасте до 3-х месяцев и весом до 25 грамм; E.coli штамм DH5 α генотипа supE44 Δ lac U169 (ф80 lacZ Δ M 15) hsd R17 rec A1 end A1 gyr A96 thi-1 rel A1, который был использован для клонирования рекомбинантных плазмид. В качестве модельного генетического материала для трансфекции клеточных культур и для доставки целевых генов в соматические клетки животных использовали следующие плазмиды (Clontech): pCMVLacZ, содержащую под эукариотическим промотором ген бактериальной бета-галактозидазы, pEGFP-N3, содержащую под эукариотическим промотором ген зеленого флуоресцентного белка и

pDsRed1-1, содержащую под эукариотическим промотором ген красного флуоресцентного белка. Выделение и анализ плазмидных ДНК осуществляли по общепринятым методикам.

Экспериментальная часть.

Получение конъюгатов гидрокортизон-полилизин, гидрокортизон-полиэтиленимин, и гидрокортизон-протамин.

Исходными веществами для получения конъюгата являлись гемисукцинат ГК, ПЛ, ПЭИ, ПТ и дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД). Модификацию полимеров осуществляли, основываясь на методике синтеза стероидных производных бычьего сывороточного альбумина (*Erlanger et al., 1957*) под влиянием ДЦКД. В качестве растворителей использовали метанол, этанол, хлороформ и дистиллированную воду. Реакции осуществляли в смесях этих растворителей. Для перевода солей в свободные состояния использовали триэтиламин. В ряде случаев для ускорения реакции вводили катализатор - парадиметиламинопиридин. После завершения реакции продукты очищали от дициклогексилмочевины центрифугированием и от не прореагировавшего гемисукцината ГК – экстракцией хлороформом. Модифицированные полимеры переводили в водный раствор. Для определения выхода конечных продуктов реакции применяли хроматографию в тонком слое с последующим обнаружением остатков ГК по гашению флуоресценции носителя и окрашиванием на органические соединения парами иода. Хроматографию осуществляли в системе ацетон/бензол (1:1). Расчет молярного соотношения ГК и полимера определяли на основании анализа поглощения при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения ГК и модифицируемых полимеров. Из величин удельного поглощения носителя и ГК при помощи уравнений оценивали число остатков ГК, приходящееся на усредненную молекулу носителя.

Электрофоретический анализ комплексов плазмидной ДНК с конъюгатами. Анализ взаимодействия плазмидной ДНК конъюгатами осуществляли при помощи электрофореза (ЭФ) в 0,8%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий (*Маниатис Т. и др., 1984*).

Трансфекция комплексами клеток в культурах. Эксперименты по трансфекции осуществлялись на следующих клеточных линиях: мышинные скелетные миобласты (C2C12), эмбриональные фибробласты мыши (NIH 3T3) и клетки крысиной гепатомы (Нер G2) (коллекция клеточных культур Института цитологии РАН). Культивирование проводили по стандартной методике на среде RPMI, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотики пенициллин и стрептомицин в концентрации 100 ед/мл. В качестве модельной использовали плазмиду с геном бета-галактозидазы. Окраску осуществляли как описано ниже и оценивали уровень трансфекции по числу клеток с сине-зеленой окраской.

Определение размеров наночастиц. Оценка размеров комплексов в различных растворителях проводили по (*Izumrudov et al., 2002*). Для определения зависимости размера и стабильности комплекса от состава растворителя проводили формирование комплексов с ДНК, предварительно окрашенной бромистым этидием. В нашем случае для приблизительной оценки размера комплексов использовали флуоресцентную микроскопию. Истинные размеры наночастиц определяли также по светорассеянию на лазерном корреляционном спектрометре ЛКС-03.

Формирование тройных комплексов ДНК-носитель-лактоферрин. Анализ влияния ЛФ на компактизацию комплексов осуществляли следующим образом. Первоначально получали смесь носителя (конъюгат ГК-ПТ) и ЛФ в определенном соотношении и концентрациях, а затем медленно добавляли смесь к раствору ДНК с концентрацией 0,2 мкг/мкл. Соотношение носитель/ЛФ выбирали, исходя из результатов предварительного ретардационного теста. Определив количество носителя, необходимое для полного связывания 1 мкг пл ДНК, принимали его за единицу связывающей активности. Аналогично определяли связывающую активность ЛФ.

Далее использовали величину a , которая определяется единицами связывающих активностей ГК-носителя и ЛФ (единицы связывающей активности варьируют от 0 до 1). Величина a также варьирует от 0 до 1 и выбирается произвольно. Например, при $a = 0,9$ в состав смеси входит 0,9 единиц связывающей активности ГК-носителя и 0,1 единиц связывающей активности ЛФ.

В опытах по ретардации ДНК в присутствии ГК-носителя и ЛФ величину a изменяли от 0 до 1 и при каждом значении a добавляли соответствующее суммарное количество ГК-носителя и ЛФ в мкг на мкг ДНК. Соотношение смеси ГК-носителя и ЛФ в мкг на мкг ДНК выражали как k – коэффициент соотношения смеси носитель + ЛФ к ДНК. Оценивали влияние k на электрофоретическую подвижность комплекса при заданном значении a .

Таким образом, можно было по величинам a и k определить истинное количество ГК-носителя и ЛФ в комплексе, вызывающее определенную ретардацию ДНК. Определив значения a и k для оптимальной ретардации комплекса (минимальное перемещение в агарозном геле), использовали такой комплекс для трансфекций.

Трансфекция лабораторных животных наночастицами, на основе модифицированных полимерных носителей. Опыты ставились на белых беспородных мышах в возрасте 3 месяцев и весом около 25 г. Для каждого эксперимента использовались 5 животных в опытной группе и 2 контрольных животных. Каждому животному вводилось количество материала, соответствующее чаще всего 30 мкг плазмидной ДНК в чистом виде или в виде комплексов с конъюгатами. Животным вводилась доза препарата в физиологическом растворе внутривенно или в хвостовую вену. Объем вводимого материала составлял от 0,4 до 1,0 мл. Через 3 суток животных усыпляли наркотизированием и забирали ткани на гистохимический анализ.

В зависимости от использованной плазмиды (различие по маркерному гену) детекция продукта маркерного гена оценивалась при микроскопировании прямо визуальное (по флуоресценции зеленого или красного флуоресцентного белка) или после соответствующей окраски (обнаружение галактозидазы хромогенным субстратом). В ряде случаев продукт выявляли при помощи специфических антител после ЭФ белков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В качестве новой пары лиганд-рецептор нами была выбрана система интернализации стероидных гормонов. Из литературных источников (*Mayer et al., 1975; Gadson et al., 1984, Gorski and Gannon, 1976, Rao et al., 1977*) известно, что кортикостероиды, в частности ГК, проникают через клеточные мембраны, как путем неспецифической диффузии, так и при помощи активного рецепторного транспорта. ГК, кроме того, казался привлекательным, так как этот гормон перемещается в цитоплазме в виде комплекса со специальными цитоплазматическими транспортными белками и в итоге проникает через ядерную мембрану, оказывая влияние непосредственно на генетический аппарат клетки. Мы предполагали, что комплексы (наночастицы), содержащие целевые ДНК, ДНК-компактизирующие соединения и ГК, будут являться эффективными векторами доставки чужеродной ДНК с последующей экспрессией вводимых генов.

В связи с тем, что ГК непосредственно с препаратами ДНК не взаимодействует, требовалась модификация этим гормоном поликатионных носителей, прочно связывающих ДНК за счет электростатических взаимодействий. Как известно, такими носителями могут выступать ПЛ, ПЭИ и ПТ. Для модификации этих носителей использовали гемисукцинат ГК, содержащий карбоксильную группу, которая может взаимодействовать с аминокетонами после активации ДЦКД.

Перечисленные полимерные носители являются гидрофильными соединениями, легко растворяющимися в воде, в то время как гемисукцинат ГК и ДЦКД гидрофобны. Поэтому в каждом случае подбирались смесь растворителей для получения однофазной системы. Водные растворы спиртов оказались в этом плане наиболее удобными. Модификацию катионных полимеров осуществляли, основываясь на методике синтеза стероидных производных бычьего сывороточного альбумина (*Erlanger et al., 1957*).

1. Синтез конъюгата гидрокортизон-полилизин.

Для синтеза использовали препарат ПЛ с мол.м. 30 кД (220 остатков лизина). Определенное количество ПЛ растворяли в метаноле (10 мг в 1мл). Гемисукцинат ГК и ДЦКД растворяли в дихлорметане (10мг в 1мл). Для синтеза производного на 1 моль ПЛ добавляли 100 молей ГК и 50 молей ДЦКД. Для перевода аминокрупп ПЛ (бромистая соль) в свободное состояние в реакционную смесь вводили триэтиламин из соотношения 220 моль триэтиламина на 1 моль ПЛ. Для ускорения реакции использовали катализатор парадиметиламинопиридин из расчета 1 моль на 50 молей ДЦКД. Конечный продукт очищали и переводили в водную фазу.

2. Синтез конъюгата гидрокортизон-полиэтиленимин.

Для получения производного к 1 моль ПЭИ в метаноле добавляли 5 - 10 моль гемисукцината ГК в метаноле, парадиметиламинопиридин 1/50 в молярном соотношении от количества ДЦКД (катализатор реакции) и раствор ДЦКД в хлороформе из расчета 1 моль ДЦКД на 2 моль гемисукцината ГК. Смесь инкубировали в течение 5 часов, и затем осадок дициклогексилмочевины удаляли центрифугированием. Раствор упаривали, низкомолекулярные не прореагировавшие соединения удаляли экстракцией хлороформом. Полученный продукт диализовали против физиологического раствора.

3. Синтез гидрокортизонового производного протамина.

Для перевода ПТ и ГК в одну фазу опытным путем была подобрана реакционная смесь - этанол-вода в соотношении 2:5 по объемам. В качестве примера приведена схема синтеза производного ПТ. Среда объемом 1 мл содержала 1,5 мг сульфата ПТ, 0,17 мг гемисукцината ГК и 0,1 мг ДЦКД. Реакция проводилась в течение 5 часов при температуре 37°C. Выпадающую в осадок дициклогексилмочевину удаляли центрифугированием. Раствор лиофилизировали после удаления избытка этанола, и осадок экстрагировали хлороформом. Полученное производное диализовали против физиологического раствора.

4. Хроматографический анализ полученных конъюгатов.

При тонкослойной хроматографии полученных конъюгатов до очистки путем экстракции выявлялись 2 зоны, одна из которых соответствовала свободному гемисукцинату ГК и мигрировала на некоторое расстояние от старта, а другая не перемещалась в применяемой системе растворителей. Обе зоны при ультрафиолетовом облучении выявлялись в виде темных пятен на флуоресцирующем фоне. Не перемещаемая со стартовой точки зона окрашивалась парами йода и соответствовала по этим показателям используемому катионному полимеру. После экстракции зона свободного гемисукцината ГК не определялась. На рисунках 1 и 2 в качестве примера приведены хроматограммы производного ПТ. Видно, что в реакционной смеси помимо поглощающего ультрафиолет конъюгата присутствует остаточное количество свободного гемисукцината ГК, от которого освобождались методом экстракции. После окрашивания хроматограммы парами йода,

ПТ и конъюгат ПТ выявляются на старте в виде коричневых пятен на желтом фоне (см. рис 2).

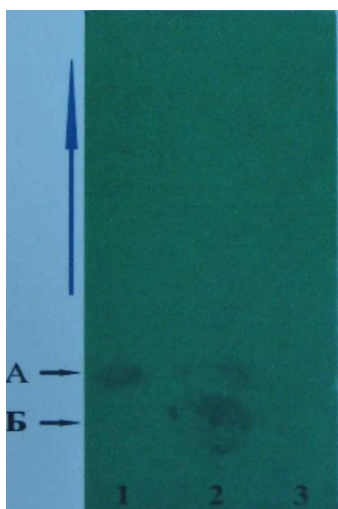


Рисунок 1. Хроматография исходных соединений и производного протамина в тонком слое силикагеля. Визуализация под ультрафиолетовым светом. На рисунке синей стрелкой, направленной вверх, указано движение подвижной фазы; стрелками А и В - темные пятна, соответствующие свободному гемисукцинату ГК и модифицированному ПТ соответственно; 1 - 30 мкл раствора гемисукцината ГК (концентрация 40 мкг / мл), 2 - 30 мкл реакционной смеси, 3 - 30 мкл раствора ПТ (концентрация 0,4 мг/мл).

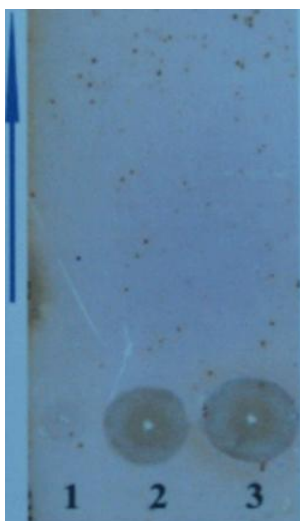


Рисунок 2. Хроматограмма исходных соединений и конъюгата после окрашивания парами йода. Синей стрелкой, направленной вверх, указано движение подвижной фазы; точки нанесения проб как на рис.1: 1 - 30 мкл раствора гемисукцината ГК (концентрация 40 мкг / мл), 2 - 30 мкл реакционной смеси, 3 - 30 мкл раствора ПТ (концентрация 0,4 мг / мл).

Для удаления непрореагировавшего гемисукцината ГК реакционную смесь двукратно экстрагировали хлороформом в соотношении объем реакционной смеси/объем хлороформа 1:1. Разделение фаз осуществляли путем центрифугирования при 15000g в течение 10 минут при температуре 18°C. По данным повторного хроматографического анализа (хроматограммы не представлены) после экстракции свободного гемисукцината ГК в препаратах конъюгата не оставалось.

5. Стехиометрия связывания гидрокортизона с носителем.

Соотношение связанного ГК с полимерами определяли, исходя из оптического поглощения отдельных составляющих и конечного продукта при двух значениях длин волн. Удельные коэффициенты поглощения $D_{242}^{ГК}$, $D_{225}^{ГК}$, $D_{242}^{ПЭИ}$, $D_{225}^{ПЭИ}$, $D_{242}^{ПТ}$ и $D_{225}^{ПТ}$ при концентрации 1 мг/мл в кювете с толщиной слоя 1 см соответственно при λ 242 и 225 нм составляли:

$$D_{242}^{ГК} = 30,24; \quad D_{225}^{ГК} = 14,04; \quad D_{242}^{ПЭИ} = 0,282; \quad D_{225}^{ПЭИ} = 1,333.$$

Поглощение полученного препарата конъюгата (КТ) ПЭИ составила $D_{242}^{КТ}$ и $D_{225}^{КТ}$:

$$D_{242}^{КТ} = 0,427; \quad D_{225}^{КТ} = 0,36$$

Для того чтобы вычислить относительное содержание ГК и ПЭИ или других полимеров в полученных препаратах приведенные значения оптического поглощения вводили в систему уравнений:

$$\begin{aligned} D_{242}^{КТ} &= D_{242}^{ГК} * C^{ГК} + D_{242}^{ПТ,ПЭИ} * C_1^{ПТ,ПЭИ} \\ D_{225}^{КТ} &= D_{225}^{ГК} * C^{ГК} + D_{225}^{ПТ,ПЭИ} * C_1^{ПТ,ПЭИ} \\ D_{256}^{КТ} &= D_{256}^{ГК} * C^{ГК} + D_{256}^{ПТ} * C_1^{ПТ} \end{aligned}$$

где $C^{ГК}$ – концентрация ГК в мг/мл; $C_1^{ПЛ,ПЭИ,ПТ}$ – концентрация ПЛ, ПЭИ, ПТ в мг/мл; $D_{\lambda}^{ГК,ПЛ,ПЭИ,ПТ,КТ}$ – удельный коэффициент поглощения ГК, ПЛ, ПЭИ, ПТ, КТ при концентрации 1 мг/мл в кювете с толщиной слоя 1 см при λ , нм; λ – длина волны, нм.

Числовое решение уравнений показало, что концентрация ПЭИ в полученном растворе конъюгата составила 0,137 мг/мл, а концентрация ГК – 0,0115 мг/мл. Таким образом, молярная концентрация ГК соответствовала $2,4 \times 10^{-8}$ М и концентрация ПЭИ $1,1 \times 10^{-8}$ М. В полученном препарате на молекулу ПЭИ приходится 2 молекулы ГК.

Для определения соотношения ГК/полимер в ПЛ-конъюгатах уравнение модифицировали следующим образом:

Удельные поглощения (1 мг/мл, толщина кюветы 1 см) составляли :

$$D_{242}^{ГК} = 30,24; \quad D_{225}^{ГК} = 14,04; \quad D_{242}^{ПЛ} = 0,098; \quad D_{225}^{ПЛ} = 1,271$$

Поглощение полученных конъюгатов при указанных длинах волн составляло $D_{242}^{КТ}$ ($D_{225}^{КТ}$):

$$D_{242}^{КТ} = 1,08; \quad D_{225}^{КТ} = 0,1$$

Указанные значения были введены в систему уравнений:

$$\begin{aligned} D_{242}^{КТ} &= D_{242}^{ГК} * C^{ГК} + D_{242}^{ПЛ} * C^{ПЛ} \\ D_{225}^{КТ} &= D_{225}^{ГК} * C^{ГК} + D_{225}^{ПЛ} * C^{ПЛ} \end{aligned}$$

где $C^{ГК}$ – концентрация ГК (мг/мл); $C^{ПЛ}$ – концентрация ПЛ (мг/мл).

Решение уравнений при данных значениях поглощения синтезированного конъюгата после перевода в молярные концентрации показало, что на 1 моль ПЛ приходится 10 молей ГК. Данный препарат в дальнейшем был использован для анализа взаимодействия с ДНК. Для определения стехиометрии стероида и белка в конъюгате использовали уравнение (как и в случае производных ПЛ и ПЭИ), основанное на удельном поглощении ПТ при 256 нм ($D_{256}^{ПТ}$) и 242 нм ($D_{242}^{ПТ}$) и ГК при 256 нм ($D_{256}^{ГК}$). Очищенные препараты конъюгата спектрофотометрировали при этих длинах волн ($D_{242}^{КТ}$, $D_{256}^{КТ}$).

Предварительно были измерены коэффициент экстинкции ПТ ($D_{242}^{ПТ}$) на длине волны, соответствующей максимуму поглощения ГК (242 нм), и коэффициент экстинкции ГК ($D_{256}^{ГК}$) на длине волны, соответствующей максимуму поглощения ПТ (256 нм). ПТ и ГК растворяли в 27% этаноле. Зная коэффициенты экстинкции ПТ и ГК в их максимумах поглощения и, измерив поглощение раствора конъюгата на этих двух длинах волн, получали систему уравнений, которая в общем случае имеет вид (как и в случае других производных):

$$\begin{aligned} D_{242}^{КТ} &= D_{242}^{ГК} * C^{ГК} + D_{242}^{ПТ} * C_1^{ПТ} \\ D_{256}^{КТ} &= D_{256}^{ГК} * C^{ГК} + D_{256}^{ПТ} * C_1^{ПТ} \end{aligned}$$

где $C^{ГК}$ – концентрация ГК (мг/мл); $C^{ПТ}$ – концентрация ПТ (мг/мл); $D_{242}^{КТ}$ – поглощение исследуемого раствора при длине волны 242 нм; $D_{256}^{КТ}$ – поглощение исследуемого раствора при длине волны 256 нм.

Удельные коэффициенты поглощения ПТ и ГК при концентрации 1 мг/мл в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 256 и 242 нм соответственно составляли ($D_{256}^{ПТ}$, $D_{256}^{ГК}$, $D_{242}^{ПТ}$):

$$D_{256}^{ПТ} = 0,117; \quad D_{256}^{ГК} = 22,5; \quad D_{242}^{ПТ} = 0,17$$

Исходя из числового решения уравнений и определения концентраций ГК и ПТ, в полученном очищенном конъюгате было найдено, что на 1 моль ПТ приходится 0,89 - 0,92 моль ГК. Таким образом, полученные величины хорошо согласуются с теоретическими предпосылками, согласно которым только концевая иминогруппа ПТ модифицируется стероидом. По этим результатам выход конечного продукта – модифицированного ПТ составлял около 90%.

6. Формирование комплекса плазмидная ДНК-носитель и оценка его свойств.

Все использованные в работе полимеры представляют собою полиэлектролиты. С одной стороны, это ДНК, несущая повторяющиеся остатки фосфорной кислоты, с другой стороны, это ПЛ, ПЭИ и ПТ, содержащие большое число положительно заряженных амино-, имино- и гунидиновых группировок. Взаимодействие противоположно заряженных полиэлектролитов при соответствующих значениях рН сопровождается образованием большого числа ионных связей, которые в силу кооперативности прочно удерживают полиэлектролиты в составе комплекса. Такие комплексы принято называть интерполиэлектролитными.

Простейший способ получения интерполиэлектролитов – прямое смешение растворов, один из которых содержит полианионный, а другой — поликатионный компонент. Степень превращения, т.е. степень завершенности реакции образования комплекса определяется как соотношение равновесного числа солевых связей между полиионами к их максимально возможному расчетному числу. Стоит отметить, что степень превращения зависит от ионной силы и рН раствора, в котором протекает реакция. При различных отношениях ионогенных групп исходных компонентов могут быть получены как нерастворимые, так и растворимые интерполиэлектролитные комплексы. Нерастворимые ассоциаты образуют сравнительно мало сольватированные осадки.

Взаимодействие полученных конъюгатов с ДНК определяли при помощи ЭФ в агарозном геле. Определенное фиксированное количество ДНК смешивали с переменным количеством конъюгатов и после короткой инкубации оценивали изменение электрофоретической подвижности ДНК. На рисунке 3 представлены результаты анализа комплексов на основе ПТ. Из данных титрования получали оптимальные соотношения полиэлектролитов для формирования комплексов. Принципиально результаты электрофоретического анализа комплексов на основе всех испытанных полимеров не отличались, поэтому представлены только результаты ЭФ комплексов ДНК с производными ПТ. Сравнительный ретардационный анализ показал, что существенное значение для нахождения оптимального соотношения ДНК/конъюгат имеет природа плазмиды. Различные плазмидные ДНК различаются по стехиометрии связывания с одним и тем же конъюгатом, что, скорее всего, объясняется отличиями нуклеотидного состава, конформации и степени нативности.

7. Трансфекция эукариотических клеток в культурах.

Первоначально нами были получены производные ПЛ и ПЭИ. Комплексы этих производных с плазмидными ДНК оценивались на способность к трансфекции эукариотических клеток в культурах. Были использованы 3 вида клеток. К сожалению, комплексы, содержащие производные ПЛ данные клеточные линии не трансфецировали. Производные ПЭИ обладали слабым трансфецирующим

действием (см. рис. 4) только в отношении клеточных линий C2C12 и Нер G2. При этом удавалось обнаружить единичные клетки в поле зрения, окрашиваемые на

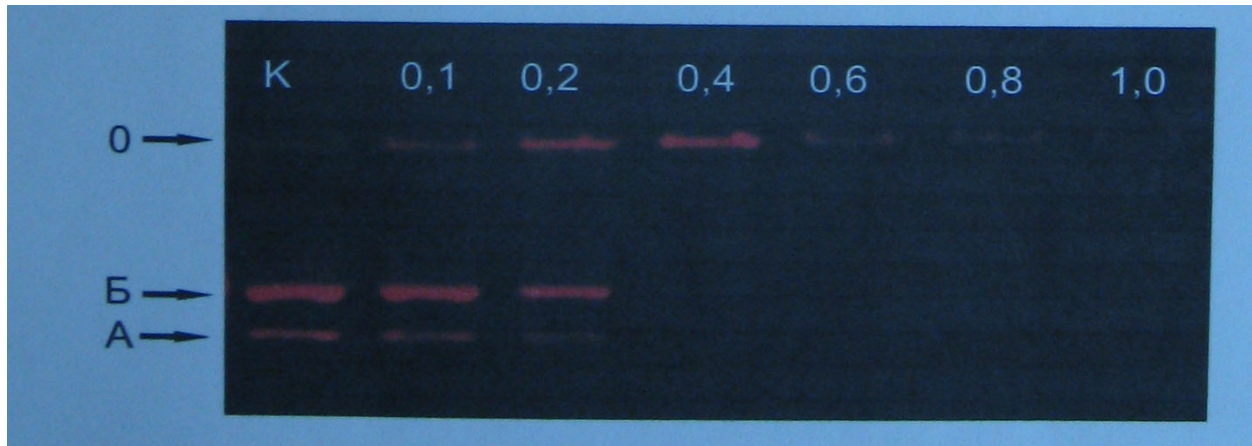


Рисунок 3. Электрофорез в агарозном геле комплексов плазмидной ДНК (pEGFP-N3 – плазида, содержащая под эукариотическим промотором ген зеленого флуоресцентного белка) с конъюгатом ПТ-ГК.

Окраска бромистым этидием. Сверху указано количество конъюгата в пересчете на 1 мкг ДНК; К (контроль) - чистая плазида; 0 - лунки, в которые вносился материал; А – суперскрученная форма плазмиды, Б - кольцевая форма плазмиды.

активность бета-галактозидазы. Иммунологическими методами также не удавалось обнаружить синтезированных белков, гены которых были в составе плазмид, после культивирования клеток в присутствии соответствующих плазмидных комплексов. Полученные комплексы были также использованы для трансфекции в условиях *in vivo*. В опытах на мышах нам не удалось в тканях обнаружить синтезируемые белки, кодируемые генами в составе использованных плазмид. Таким образом, предварительные результаты показали, что полученные нами производные полимеров по каким-то причинам обладают лишь весьма слабым трансфецирующим действием. Для выяснения причины неудачи было решено в первую очередь определить размеры получаемых комплексов, так как хорошо известно, что этот параметр может оказывать существенное влияние на проникновение комплексов в клетки.

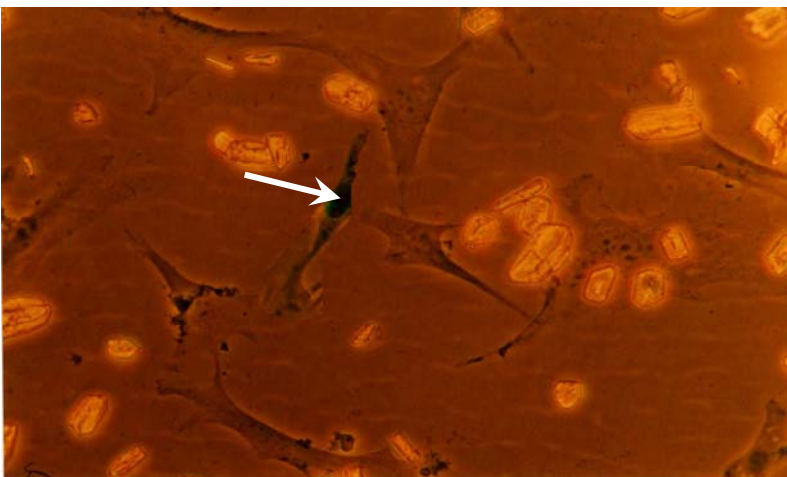


Рисунок 4. Трансфекция мышинных миобластов C2C12 конъюгатом ПЭИ-ГК в комплексе с плазмидой pCMVLac Z. Стрелкой в центре рисунка 4 указана клетка, окрашенная на галактозидазную активность. Большинство клеток не окрашено.

8. Определение размеров комплексов.

Из литературных источников известно, что оптимальные размеры наночастиц для трансфекции должны составлять около 30 нм. Поэтому в задачи настоящего исследования входила оценка размеров получаемых комплексов. Одним из качественных подходов для этих целей служит флуоресцентная микроскопия получаемых комплексов. В связи с тем, что величина комплексов может оказывать существенное влияние на проникновение материала через клеточные барьеры, а значит, и на результаты трансфекции, необходимо было оценить размеры получаемых в разных условиях комплексов.

Грубую оценку размера получаемых комплексов осуществляли при помощи окрашивания ДНК бромистым этидием. Было выяснено, что в 0,15 М NaCl комплексы образуют крупные агрегаты различной величины; размер самых крупных агрегатов сопоставим с размером метафазных хромосом человека, т.е. измеряется сотнями нм. Крупные размеры комплексов характерны для всех изученных конъюгатов в независимости от степени их модификации ГК. На рисунке 5 приведены результаты определения размеров комплексов флуоресцентным методом. Более точную оценку размеров получаемых комплексов осуществляли при помощи светорассеяния.

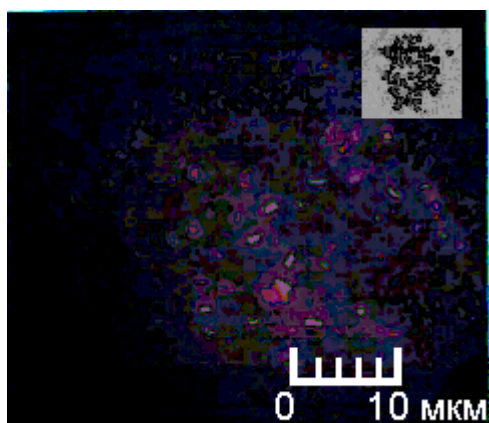


Рисунок 5. Агрегаты комплексов, полученных в 0,15 М NaCl при соотношении ДНК/носитель (ПТ-ГК) 1/0,6 (ув. 300). Окраска бромистым этидием. В правом верхнем углу рисунка 5 расположена фотография метафазных хромосом человека.

9. Влияние лактоферрина на размеры комплексов модифицированного протамина с ДНК.

Как видно из предыдущих разделов, несмотря на достаточно прочное комплексообразование ГК-производных с плазмидными ДНК, размеры комплексов превышают необходимые для трансфекции. Предварительный анализ трансфецирующей эффективности комплексов пл ДНК с полученными ГК-производными катионных полимеров показал, что на клеточном уровне только производные ПЭИ обладают слабой активностью, и то в отношении только одной клеточной линии. На целом животном не удалось получить трансфекции органов при использовании разных полимеров и различных плазмид. Целевых белков в органах не было достоверно обнаружено ни по специфической флуоресценции, ни при помощи иммунохимического анализа. Варьирование условий формирования комплексов не позволяло добиться оптимальных моноДНК-наночастиц. Эти эксперименты, скорее всего, были неудачными в связи с крупными размерами получаемых комплексов, что следует из результатов определения этих размеров флуоресцентным методом. Поэтому было решено исследовать влияние дополнительных компонентов на размеры наночастиц. В качестве такого

соединения был выбран ЛФ, который, как ранее было показано (Синогеева и др., 2000), является удобным комплексообразователем для ДНК. При этом мы исходили из предположения, что замена части катионного полимера на ЛФ будет способствовать снижению степени ассоциации, характерной для комплексов с участием сильных поликатионов.

При связывании ДНК с ЛФ наблюдается истинная ретардация: по мере увеличения количества ЛФ, приходящегося на 1 мкг ДНК, продвижение комплексов замедляется вследствие снижения поверхностного заряда комплексов и, возможно, увеличения их размера. Одновременно происходит размывание зон вследствие возникновения некоторой дисперсии комплексов по размерам и заряду. Кроме того, можно наблюдать эффект насыщения: начиная с определенной точки дальнейшее увеличение количества ЛФ в комплексе (даже до очень больших значений) не приводит к изменению электрофоретической подвижности ДНК; комплексы ДНК-ЛФ выходят из лунок в гель, что свидетельствует о сохранении комплексами слабоотрицательного поверхностного заряда и размеров, не превышающих размера пор геля.

Формирование тройных комплексов проводили при следующих соотношениях a : 0,9 0,8 0,7 0,6 0,5 0,4 0,3 0,2. Найденные коэффициенты k для указанных a лежат в пределах 0,1 - 1,6. При проведении электрофореза было обнаружено, что уже при $a = 0,9$ (т.е. при замещении 0,1 единицы связывающей активности полимерного носителя (ПЛ, ПЭИ, ПТ на ЛФ) наблюдается истинная ретардация (рис. 6), что свидетельствует о смене кооперативного механизма образования комплексов на статистический. При этом образующиеся трехкомпонентные комплексы скорее всего несут мономолекулярный в отношении ДНК характер, так как проникают в поры агарозного геля и перемещаются в нем. Флуоресцентный микроскопический анализ не позволяет увидеть образующиеся комплексы.

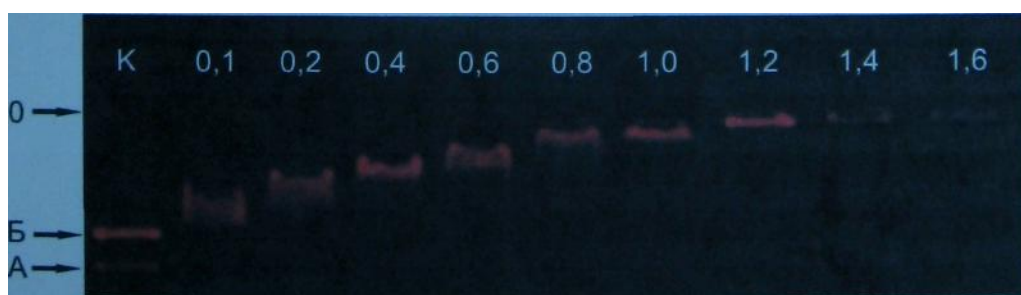


Рисунок 6. Электрофорез тройных комплексов ДНК-конъюгат (ПТ-ГК) -ЛФ, полученных в 0,15 М NaCl при $a = 0,9$ в агарозном геле. Вверху указаны коэффициенты k ; К (контроль) - чистая плаزمид; 0 - лунки, в которые вносился материал; А - суперскрученная форма плазмиды; Б - кольцевая форма плазмиды

Эффекта удержания комплекса в лунке, как и в случае связывания ДНК с чистым ЛФ, не наблюдали; при $k = 1,2$ имеет место максимальная ретардация ДНК. Потеря надмолекулярной ассоциации ДНК при образовании комплексов, очевидно, связана с конкурентными отношениями ГК носителя и ЛФ во взаимодействиях с ДНК. Образование же комплексов малого размера происходит, предположительно, из-за того, что молекулы ЛФ служат своеобразными сольбилизирующими факторами вследствие своих больших размеров и строгой локализации участка,

взаимодействующего с ДНК. В случае взаимодействия ДНК с ПТ (а, следовательно, и конъюгатом ГК-ПТ) заряды гуанидиновых групп и остатков фосфорной кислоты взаимно экранируют друг друга, что приводит к сильному снижению поверхностного заряда, потере гидратной оболочки и агрегации комплексов. А после связывания ДНК с ЛФ большая часть молекулы белка оказывается обращенной в раствор и благодаря экспонированным на ее поверхности полярным группам взаимодействует с молекулами воды, что обеспечивает сохранение растворимости. Таким образом, замещение части ПТ в комплексе на ЛФ приводит к повышению растворимости комплексов и предотвращению их агрегации.

10. Определение размеров комплексов при помощи светорассеяния на лазерном корреляционном спектрометре.

Данный метод позволяет оценить истинный размер частиц и определить относительный вклад частиц разного размера в светорассеяние. Предварительные опыты при помощи световой микроскопии показали, что комплексы ПЛ, ПЭИ, ПТ и их ГК-производных с пл ДНК представляют собою крупные агрегаты. В то же время ГК-производные полимеров в присутствии ЛФ формируют комплексы, которые не обнаруживаются при обычной микроскопии. Поэтому для анализа с помощью лазерного светорассеяния были использованы трехкомпонентные комплексы, которые включали помимо ГК производных полимеров и ДНК, также и ЛФ. В качестве наиболее перспективного был выбран модифицированный ПТ. Эксперимент осуществляли на препаратах с оптимальным соотношением компонентов. Более точно размеры наночастиц определяли по светорассеянию на лазерном корреляционном спектрометре ЛКС-03 (ООО «Интокс», Россия). Результаты приведены на рисунке 7.

Как следует из приведенных результатов, тройные комплексы представлены наночастицами с размерами около 30 нм и более крупными частицами с размерами, превышающими 100 нм. Вклад наночастиц с размерами около 30 нм достаточно высок. Кроме того, по количеству материала, составляющего эти наночастицы, они преобладают, так как вклад более крупных частиц в светорассеяние более значителен. Таким образом, трехкомпонентные комплексы, содержащие модифицированный ПТ, ЛФ и пл ДНК, по размеру наночастиц являются наиболее перспективными для переноса генетического материала.

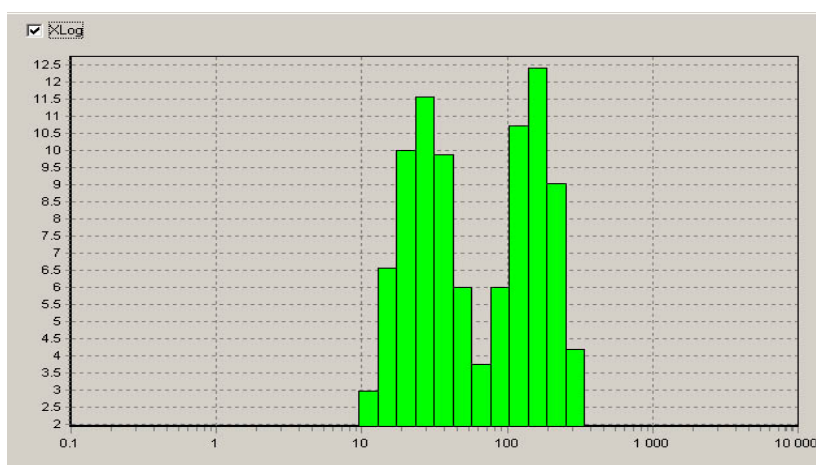


Рисунок 7. Диаграмма зависимости интенсивности рассеяния от размера частиц ПТ-ГК – ЛФ – пл ДНК. По оси абсцисс – логарифм диаметра частиц в нм, по оси ординат - % светорассеяния; $a = 0,9$; $k = 1,2$

11. Трансфекция полученными векторами эукариотических клеток.

Анализ ДНК-содержащих наночастиц, получаемых из конъюгатов ГК-производных ПЛ, ПЭИ и ПТ показал, что наиболее приемлемыми для трансфекции

являются наночастицы на основе ПТ с добавлением ЛФ. Размер этих наночастиц по всем критериям соответствует оптимальным и для внедрения в цитоплазму и для проникновения через ядерную мембрану. Поэтому эти наночастицы были испытаны для трансфекции *in vivo*. С целью контроля первоначально были испытаны комплексы без добавления ЛФ.

Схема опыта описана в разделе «материалы и методы». Животным вводили плазмидный материал в виде очищенной ДНК или в виде наночастиц с соответствующим конъюгатом. Предварительные опыты показали, что наночастицы на основе ПЛ, ПЭИ и ПТ обладают весьма низкой трансфецирующей активностью на уровне целого организма. Флуоресцентные белки – продукты экспрессии маркерных генов при микроскопии в тканях не обнаруживались. Только специальные методы иммунохимического анализа позволяли обнаружить незначительные количества иммуногенного материала в некоторых тканях животных, которым вводились наночастицы на основе указанных конъюгатов. В тканях контрольных животных, которым вводились некомплексированные плазмидные ДНК, обнаружить продукты экспрессии маркерных генов не удавалось.

Поэтому нами представлены результаты анализа тканей животных, которым вводили производные ПТ с добавлением ЛФ. Эти наночастицы формировали в 0.15 М NaCl. Выбор среды для формирования комплексов обусловлен необходимостью введения животным изотонического раствора, так как объем вводимых проб был значителен (в среднем 0,6 мл). Выбранное для формирования комплексов значение $a = 0,9$; $k = 1,2$. В качестве типичного примера комплекс (наночастицы) содержал 30 мкг ДНК + 19,5 мкг конъюгата ГК-ПТ + 10,8 мкг ЛФ. Объем раствора ДНК составлял 20 мкл. Конечный объем – 0,6 мл изотонического раствора. В качестве маркерной была использована плазида, содержащая ген бета-галактозидазы. Выявление продукта экспрессии маркерного гена осуществляли при помощи субстрата X-Gal. Исследованию подвергались ткани сердца, печени и почек.

В ткани сердца маркерного белка обнаружено не было. При окрашивании срезов печени была обнаружена бета-галактозидазная активность (рис. 8). Окрашенные в синий цвет клетки расположены диффузно; плотность окрашенных клеток выше на участках, прилегающих к сосудам. Срезы печени интактных и контрольных (введение комплексов без ЛФ) животных не окрашивались.

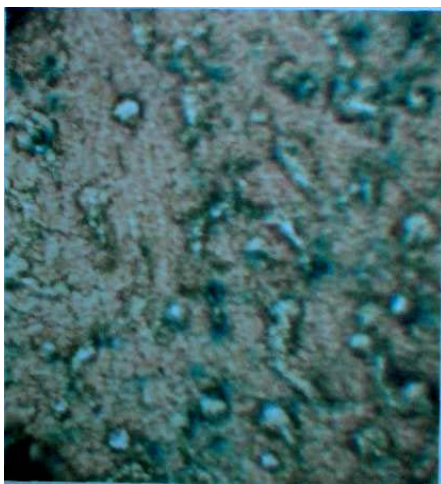


Рисунок 8. Окраска среза печени на бета-галактозидазную активность. Микроскопия среза печени мыши после трансфекции и окраски с X-Gal (Ув.80*). Синие пятна - участки проявления активности бета-галактозидазы.

Окрашенные клетки подсчитывали, анализируя по 10 случайно выбранных полей зрения на каждом срезе; число срезов на каждый орган равнялось 6. Среднее число окрашенных клеток в поле зрения составило 23.

Аналогичные результаты были получены при окрашивании срезов почек экспериментальных животных. Активность бета-галактозидазы выявлялась по периферии органа (рис.9). Окрашенные клетки образуют тяжи, предположительно соответствующие почечным канальцам. Срезы почек интактных животных не окрашивались.

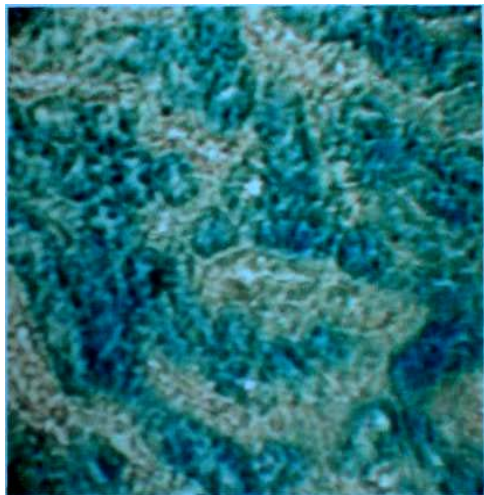


Рисунок 9. Окраска ткани почки на бета-галактозидазную активность. Микроскопия среза почки мыши после трансфекции и окраски с X-Gal. (Ув.80*). Синие пятна - участки проявления активности бета-галактозидазы.

В данном случае подсчет числа клеток, содержащих бета-галактозидазную активность, затруднен. Однако уровень трансфекции можно оценивать как высокий.

Таким образом, синтезированные ГК-производные использованных полимеров в комплексе с ЛФ и с целевыми ДНК могут быть применены для экспериментов по трансфекции на целом организме.

Обсуждение

В соответствие с поставленной целью в представленном исследовании сделана попытка создать новый класс векторных соединений для рецептор-опосредованного транспорта чужеродной пл ДНК в эукариотические клетки *in vivo*. В качестве векторного лиганда нами был выбран до сих пор не применяемый стероидный гормон – ГК. Как указывалось ранее ГК проникает в клетки-мишени как путем пассивной диффузии, так и путем рецепторного транспорта (*Mayer et al., 1975; Gadson et al., 1984*). Кроме того, ГК способен проникать через ядерный барьер и взаимодействовать с геномной ДНК. Все эти свойства гормона казались нам привлекательными в плане его использования для внедрения молекул ДНК в эукариотические клетки.

Нам удалось синтезировать производные поликатионных носителей (ПЛ, ПЭИ и ПТ). Было показано, что эти производные содержат ковалентно связанные остатки гемисукцината ГК. Число остатков на молекулу носителя можно варьировать, изменяя соотношения исходных соединений. Естественно, что большинство производных с разным соотношением лиганд – носитель проанализировать мы были не в состоянии и поэтому ограничились только теми, которые на наш взгляд отвечали поставленным требованиям. Было установлено, что производные всех трех катионных полимеров эффективно взаимодействуют с пл ДНК. При этом по характеру взаимодействия исходные полимеры и их производные не различались. Интересная особенность модифицированных полимеров, по-видимому, не связанная с модификацией, заключается в различии их взаимодействия (по данным электрофоретической ретардации) с разными плазмидами при равных соотношениях полимер/ДНК. Эти результаты требуют дополнительных исследований для подбора необходимых соотношений

носитель/ДНК в каждом конкретном случае использования плазмид с целевыми генами. Сходные результаты были получены нами ранее (Синогеева и др., 2000). Было показано, что связывание ДНК с ЛФ зависит от определенных олигонуклеотидных звеньев, консенсусных для этого белка.

К сожалению, наночастицы на основе модифицированных ГК полимеров (ПЛ, ПЭИ и ПТ) в экспериментах на клеточных культурах и при парентеральном введении лабораторным животным обладали весьма низкими трансформирующими активностями. Экспрессия модельных генов во всех случаях могла быть выявлена только чувствительными иммунохимическими методами. Такие результаты, скорее всего, были связаны с крупными размерами получаемых комплексов. Действительно, флуоресцентный микроскопический анализ получаемых комплексов ГК полимеров с пл ДНК, а также данные по ретардации комплексов в агарозном геле показали, что формируемые наночастицы имеют слишком большие размеры. Поэтому были предприняты попытки уменьшить гидродинамические размеры комплексов путем введения в систему дополнительного компонента. Ранее в качестве ДНК-связывающего соединения был использован белок ЛФ, который способствует образованию комплексов, проникающих в поры агарозного геля. По данным ретардационного теста трехкомпонентные комплексы ДНК-конъюгаты ГК-ЛФ также мигрируют в агарозном геле, при этом их подвижность отличается от подвижности исходной ДНК и двойных комплексов ДНК-конъюгат и ДНК-ЛФ. Микроскопический анализ также указывает на формирование частиц меньшего размера по сравнению с частицами на основе ДНК и катионных полимеров. По данным светорассеяния размер эти частиц составляет 30 нм. Таким образом, наночастицы, содержащие ДНК, ПТ, модифицированный ГК, и ЛФ в определенных соотношениях (см. п. 11) характеризуются размерами, которые позволяют им проникать в клетки при помощи механизма рецепторного эндоцитоза и далее внедряться в ядерные структуры.

Получение наночастиц, подходящих по гидродинамическим размерам для прохождения через мембранные барьеры по рецепторному механизму, позволило приступить к изучению доставки целевых генов в составе плазмид при помощи комплексов, состоящих из плазмидной ДНК с маркерным геном, ГК производного ПТ и ЛФ. Как указывалось выше результаты трансфекции клеток в культуре и на уровне целого организма не всегда совпадают. Кроме того, разные клеточные культуры по разному трансфецируются различными комплексами ДНК. Поэтому мы не проверяли комплексы, содержащие ЛФ на уровне культур, а непосредственно испытали их *in vivo*. Как показано в п.11 парентеральное введение таких комплексов (наночастиц) лабораторным животным – мышам сопровождалось экспрессией маркерного гена – гена бета-галактозидазы в тканях печени и почек. Таким образом, было продемонстрировано, что трехкомпонентные комплексы (ДНК, ПТ-ГК, ЛФ), в отличие от двойных (ДНК и ПТ-ГК или ДНК и ЛФ), обладают существенно большей эффективностью трансфекции. В связи с этим такие наночастицы могут быть рекомендованы для дальнейших исследований по генной терапии конкретных видов патологии.

ВЫВОДЫ

1. Карбодиимидным способом синтезированы производные полилизина, полиэтиленimina и протамина, содержащие в качестве лиганда остатки гемисукцината гидрокортизона.
2. Установлено, что гидрокортизоновые производные растворимы в водной среде и по способности комплексоваться с плазмидной ДНК не отличаются от исходных катионных полимеров.
3. Оптимальные соотношения гидрокортизоновых производных и ДНК в составе комплексов зависят от строения плазмиды (нуклеотидный состав, размеры, конформация).
4. Комплексы на основании гидрокортизоновых производных и ДНК, представляют собой крупные агрегаты, которые характеризуются существенно большими размерами, чем необходимо для эффективной трансфекции.
5. Наночастицы, сформированные из плазмидной ДНК, гидрокортизоновых производных протамина и добавочного компонента - лактоферрина, характеризуются размерами (20 - 40 нм), наиболее приемлемыми для трансфекции.
6. Парентеральное введение мышам комплексов (наночастиц) на основе плазмидной ДНК с маркерным геном, гидрокортизонового производного протамина и лактоферрина сопровождается трансфекцией по крайней мере клеток печени и почек с экспрессией маркерного гена (бета-галактозидазы).

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. *Савищенко Е.А., Илсавский С.С., Гинак А.И., Алейникова Т.Д., Шавловский М.М.* Наночастицы на основе производных гидрокортизона в качестве векторов доставки генетического материала в эукариотические клетки *in vivo*.//Биотехнология (Москва), 2009, 1, 31-38.
2. *Савищенко Е.А.(Замиралова), Шавловский М.М., Гинак А.И.* Получение ковалентных белковых комплексов на основе фикола. Сборник тезисов докладов III научно-технической конференции аспирантов СПбГТИ (ТУ), Санкт-Петербург, Изд-во СПбГТИ (ТУ). – 2000. С.108.
3. *Савищенко Е.А.(Замиралова), Шавловский М.М., Гинак А.И.* Молекулярные конъюгаты. Сборник тезисов докладов III научно-технической конференции аспирантов СПбГТИ (ТУ), Санкт-Петербург, Изд-во СПбГТИ (ТУ). – 2000. С.109.
4. *Савищенко Е.А.(Замиралова), Жаринова Н.И.* Лиганды мембранных рецепторов в качестве инструмента для трансфекции соматических клеток. Тезисы пятой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье», Санкт-Петербург, НИИ химии СПбГУ. – 2002. – С.88-89.
5. *Савищенко Е.А.(Замиралова), Жаринова Н.И.* Оптимизация способов доставки генетического материала в клетки млекопитающих. Сборник тезисов научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, СПбМАПО. – 2002. С.199.
6. *Савищенко Е.А., Илсавский С.С.* Гидрокортизоновые производные катионных полимеров в качестве векторов для генной терапии. Сборник тезисов к научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, СПбМАПО. – 2008. - С.31-33.

Подписано в печать «12» февраля 2010 г. Формат 60x84/16

Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,25. Тираж 100 экз. Заказ № 32

Типография «Восстания – 1»

191036, Санкт-Петербург, Восстания, 1.