



УДК 579.222: 546.23

ВПЛИВ КОМПЛЕКСІВ АНТИСЕНС-ОЛІГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДІВ З ПОЛІМЕРНИМИ НОСІЯМИ НА ВМІСТ КЛІТИННОГО ПРІОНА У ПРІОН-РЕПЛІКУВАЛЬНИХ ОРГАНАХ ЩУРІВ

Н. Ю. Сусол

*Інститут біології тварин НААН України, вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна
e-mail: ua.natalia@gmail.com*

Досліджено здатність трьох новосинтезованих зразків (MP-2, MP-3, MP-27) полімерних носіїв на основі диметиламіноетилметакрилату утворювати кон'югати з антисенс-олігодезоксинуклеотидами (асОДН). Встановлено, що найефективніше утворення комплексів відбувається під час змішування 0,5% розчину полімерів з асОДН у концентрації 2 мкг/мл. Тест на цитотоксичність полімерних носіїв проводили на сперміях бугаїв. Виявлено нижчу цитотоксичність MP-27 порівняно з MP-2 та MP-3, оскільки за використання їх 0,5% розчинів виживання сперміїв становить 96 і 120 год, відповідно. Результати вестерн-блот аналізу показали, що введення щурам комплексів асОДН з поліДМАЕМ призводить до зниження вмісту клітинного пріона (PrP^C) у пріон-реплікувальних органах. Найбільш помітне зниження вмісту фізіологічного пріона відбувалося за дії комплексу асОДН з полімером MP27. Аналіз вмісту PrP^C після ін'єкцій комплексів асОДН із носіями MP-27 свідчить про зниження вмісту клітинного пріона, порівняно з контрольною групою, через 2 та 7 діб після ін'єкцій – у селезінці на 9 і 32 %, у тонкому кишечнику – на 38 і 55 %, у тканинах мозку – на 28 і 34 %, відповідно. Отже, введення щурам комплексів асОДН з поліДМАЕМ призводить до зниження вмісту фізіологічного пріона в окремих органах і тканинах.

Ключові слова: щури, клітинний пріон, мозок, кишечник, селезінка, олігодезоксинуклеотиди.

ВСТУП

На сьогодні немає ефективних методів і засобів лікування та профілактики пріонних інфекцій [12]. Зважаючи на те, що патогенез пріонних інфекцій пов'язаний зі синтезом і агрегацією PrP^C (клітинного пріона), припускають, що усунення цього білка з організму запобігатиме розвитку протеїнопатій. Оскільки антисенс-олігодезоксинуклеотиди (асОДН) блокують трансляцію комплементарних мРНК, то за їхньою допомогою можна інгібувати біосинтез білків. Свій вплив на експресію генів асОДН реалізують у два способи: стерично блокують процес зв'язування рибосом із мРНК і запускають механізм гідролізу мРНК за допомогою РНКазі Н. У результаті

реалізації кожного з механізмів або їхньої синергічної дії утворення білкового продукту експресії гена не відбувається [5].

Однак успішність застосування антисенс-технології значною мірою залежить від наявності функціональних носіїв, що особливо актуально в сучасній біології, медицині й ветеринарії [2]. Носії на основі катіонних полімерів є зручним інструментом для доставки генетичного матеріалу у клітини, оскільки завдяки електростатичним взаємодіям вони ефективно зв'язують негативно заряджені молекули ДНК. Крім того, такі полімери екранують ДНК від дії гідролізуючих ферментів, відтак продовжують час перебування генетичних конструкцій в організмі та полегшують їхнє проникнення всередину клітини. У наших дослідженнях як носії використовували новосинтезовані полімери на основі диметиламіноетилметакрилату (DMAEM), які помітно підвищують ефективність трансфекції клітин ссавців плазмідною ДНК, однак молекулярні механізми цього процесу до кінця не з'ясовані [8].

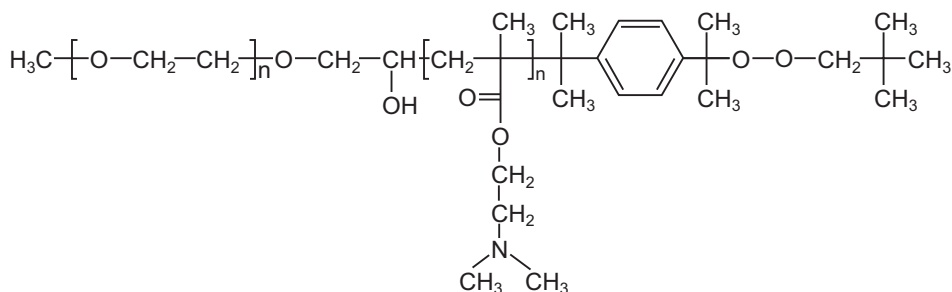
Метою роботи було дослідити три зразки олігоелектролітичних полімерних носіїв на основі DMAEM і утворення їхніх кон'югатів з асОДН, вивчити цитотоксичні властивості новосинтезованих полімерів, а також дослідити ефективність системи транспортування цих комплексів і їхній вплив на синтез фізіологічного пріона.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для пригнічення експресії гена PrP^C у дослідженнях використовували олігонуклеотидні послідовності 5'-ATGCTTGAGGTTGGTT-3', що здатні зв'язуватися з центральною ділянкою відкритої рамки зчитування мРНК клітинного пріона. Антисенс-олігонуклеотиди (асОДН) були синтезовані компанією AlphaDNA (Канада). Як полімерний носій асОДН використовували полімери на основі диметиламіноетилметакрилату (DMAEM), а саме PEG-DMAEM-MP-27 (MP-27), PEG-DMAEM-MP-2 (MP-2), PEG-DMAEM-MP-3 (MP-3). Полімери розроблені в Національному університеті "Львівська політехніка" на кафедрі органічної хімії.

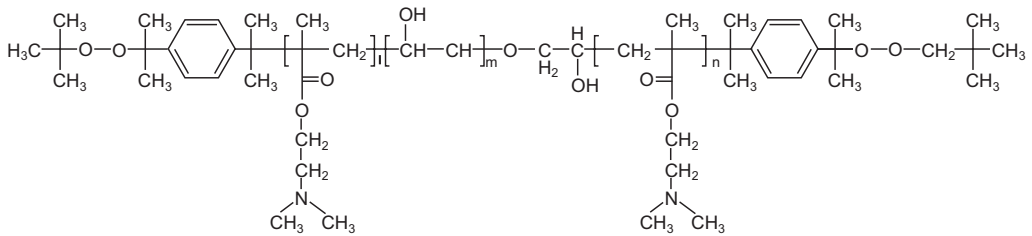
1. PEG-DMAEM-MP-27 (MP-27) – смолоподібна речовина світло-жовтого кольору. Його лінійний блок – кополімер поліетиленгліколю (ПЕГ) і полідиметиламіноетил-метакрилат (поліDMAEM) з кінцевим пероксидвмісним фрагментом. Полімер розчинний у воді, має широкий інтервал значень рН (у т. ч. за фізіологічних значень рН середовища), ДМСО. Вміст Нітрогену в полімері становить 8 %, розрахована молярна маса близько 6 000 г/моль. Синтез полімеру проводили в середовищі ДМФА (диметилформамід) за наявності пероксидвмісного регулятора росту полімерних ланцюгів (монопероксин, MP), як ініціатор використовували окисно-відновну систему, що містить іони церію (Ce):Ce⁴⁺ – PEG-OH. Полімер додатково очищували від іонів Се.

Загальна структура полімера MP-27:



2. PEG-DMAEM-MP-2 (MP-2) – порошкоподібний полімер коричневого кольору. У його складі ПЕГ розміщений посередині між двома блоками поліDMAEM. Синтез полімеру проводили в середовищі ДМФА за наявності пероксидвмісного регулятора росту полімерних ланцюгів (монопероксин, MP), як ініціатор використовували окисно-відновну систему Ce^{4+} – diPEG-OH. Полімер додатково очищали від іонів Се.

Загальна структура полімера MP-2:



3. PEG-DMAEM-MP-3 (MP-3). Загальна структура аналогічна PEG-DMAEM-MP-2, однак полімер не очищали від іонів Се.

Приготування комплексів асОДН і поліDMAEM: 6,6 мг поліDMAEM розчиняли в 0,01М HCl, pH розчину доводили до 7,4; 0,5 мл приготованого розчину поліDMAEM змішували із 0,5 мл розчину асОДН з концентрацією 2 мкг/мл. Суміш інкубували 30 хв за кімнатної температури.

Здатність полімерів (поліDMAEM) зв'язувати олігонуклеотиди перевіряли за допомогою електрофорезу у 3% гелі агарози. До розчину асОДН з концентрацією олігонуклеотидів 0,02 мг/мл додавали 1; 0,5 і 0,05% розчину полімерів. Електрофорез проводили у трис-борнатному буфері з додаванням ЕДТА (89 мМ Трис, 89 мМ борної кислоти, 2 мМ ЕДТА) за сталої напруги 2V/см. Гель зафарбовували етидію бромідом у концентрації 2 мкг/мл і фотографували в ультрафіолетовому світлі.

Дослідження цитотоксичності поліDMAEM проводили з використанням сперміїв бугаїв. Біомаркером цитотоксичності полімерів був показник виживання (год) статевих клітин – . До 200 мкл суспензії сперміїв додавали по 10 мкл полімерів у концентраціях 1; 0,5 та 0,05%. Виживання сперміїв оцінювали під мікроскопом (×200) до припинення прямолінійного поступального руху.

Було сформовано чотири дослідні групи щурів *Rattus norvegicus* var. Alba, лінії Wistar: контрольну і три дослідні, по 3 тварини у кожній. Тваринам дослідних груп у хвостову вену вводили по 2 мг/кг маси тіла, розчини комплексів асОДН з полімерами MP-2, MP-3 та MP-27. Через 1, 2 та 7 діб від початку експерименту тварин із кожної групи декапітували під легким хлороформним наркозом [1]. Для встановлення впливу комплексів асОДН із поліDMAEM на вміст PpP^C проводили вестерн-блот аналіз.

Імуноблот-детекцію протеїну PpP^C проводили за такою схемою. Тканину лізували у десятикратному об'ємі лізуючого буферу pH 7,4 (150 мМ NaCl, 1 % Тритон-X 100, 0,5 % Na дезоксихолат, 0,1 % Na додецилсульфат, 50 мМ Трис, 0,001 % коктейль інгібіторів протеїназ – Sigma-Aldrich, Німеччина). Далі зразки центрифугували за 5 200 g протягом 5 хв при 4 °C. У готових лізатах вимірювали вміст загального білка методом Лоурі [7]. Для вирівнювання концентрацій загального білка зразки розводили буфером (25 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, pH 7.4). Далі про-

водили електрофоретичне розділення білків лізатів клітин у системі Леммлі [6] у 12% поліакриламідному гелі. Перенесення білків з поліакриламідного гелю на полівінілдифторидну мембрану здійснювали в камері для трансферу Transblot (Bio Rad, USA) [6, 11]. По закінченні переносу протеїнів мембрану інкубували 1 год при кімнатній температурі у 5% знежиреному молоці (5% сухе знежирене молоко, 50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween-20). Для детекції фізіологічного пріона використовували мишачі антитіла 6H4 до пріонного білка (Prionics, Швейцарія) у розведенні 1:5000. Із первинними антитілами мембрану інкубували 12 год при +4 °С. На наступному етапі проводили інкубацію мембрани з козячими антитілами до імуноглобулінів миші, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma-Aldrich, Німеччина) в розведенні 1:10 000. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням хемілюмінесцентного субстрату для лужної фосфатази CDP-Star (Sigma-Aldrich, Німеччина). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, США) та набору для проявки плівок (Kodak).

Рентгенівську плівку з результатами хемілюмінесцентної детекції сканували. Інтенсивність сигналу визначали за допомогою програмного забезпечення GelPro 3.1. Вміст клітинного пріона виражали в умовних одиницях, які характеризують інтегральну оптичну густину сигналу пріона відповідно до контролю.

Утримання тварин і експерименти проводили відповідно до положень “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей” (Страсбург, 1985), Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Дослідження також було схвалене Комісією з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН України (Протокол № 60 від 22.02.2017 р.).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Кон'югація асОДН із новосинтезованими полімерами опосередковується ланками диметиламіноетилметакрилату і первинними аміногрупами аміноетилметакрилату. У процесі змішування розчинів олігонуклеотиди конденсуються із катіоноактивними полімерами. Досліджуючи здатність новосинтезованих полімерних носіїв утворювати комплекси із асОДН встановлено, що найбільш ефективно утворення комплексів відбувається за 0,5% концентрації полімерів з розчином асОДН концентрацією 2 мг/мл. Під час вивчення взаємодії асОДН з олігоелектролітами виявлено, що утворення комплексів характеризувалося зниженням електрофоретичної рухливості олігонуклеотидів. При цьому зв'язані з поліДМАЕМ олігонуклеотиди характеризувалися нижчою електрофоретичною активністю порівняно з вільними олігонуклеотидами.

Було виявлено, що полідиметиламіноетилметакрилат є цитотоксичним, хоча сам диметиламіноетилметакрилат – малотоксичний. Вивченням цитотоксичності поліДМАЕМ встановлено, що за використання 0,5% розчинів полімерів МР-2 і МР-3 виживання спермій становить 96 год, полімеру МР-27 – 120 год. Отже, МР-27 має нижчу токсичність, порівняно з МР-2 та МР-3 [8].

У результаті внутрішньовенного введення досліджуваних речовин щурам жодна з дослідних тварин не загинула. Споживання корму та води протягом експерименту не змінювалося. Змін характеру поведінки тварин, інтенсивності рефлексів і вегетативних ефектів не виявлено. Суттєвих гістоструктурних змін у пріон-реплікувальних органах не виявлено [10].

На основі результатів вестерн-блот аналізу встановлено, що у кишечнику після застосування комплексів із носієм МР-2 знижувався вміст PrP^C на 46 % через 2 доби та на 47 % через 7 днів після введення ($p < 0,05$). Однак після ін'єкцій асОДН з МР-3 зниження загального клітинного пріона не було таким стрімким (13 і 26 %). Натомість суттєвим було зниження вмісту PrP^C у кишечнику за введення комплексів асОДН із полімерами МР-27. Через 2 доби після введення вміст PrP^C знизився на 38 %, а через 7 днів – на 55 % порівняно з контрольною групою (рис. 1).

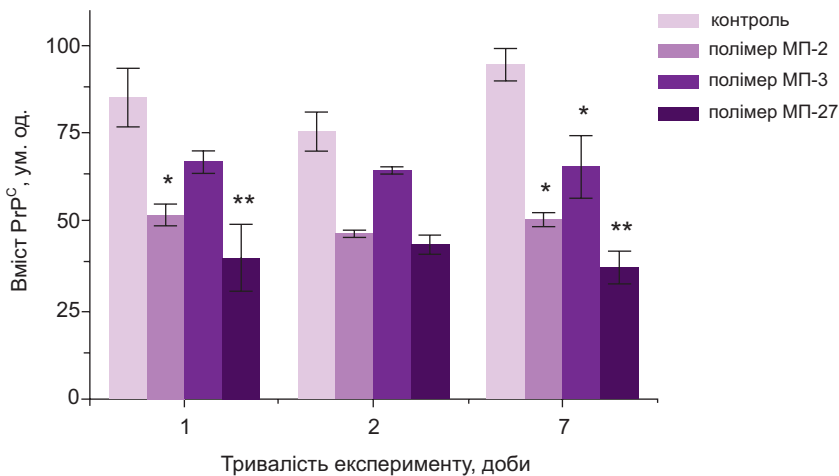


Рис 1. Вміст PrP^C у тканинах тонкого кишечника щурів за дії комплексів асОДН з полімерними носіями на основі ДМАЕМ, ($M \pm m$, $n = 3$)

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (дані дослідних груп порівнювали з даними контрольної групи лабораторних щурів)

Fig. 1. The content of cellular prion (PrP^C) in tissues of intestine after injection of complexes of DMAEM with asODN, ($M \pm m$, $n = 3$)

Comment: * – $P < 0.05$; ** – $p < 0.01$ (data of experimental groups was compared with the control group of laboratory rats)

Вміст клітинного пріона в селезінці знижувався на 32 % через дві доби після застосування комплексів асОДН з носієм МР-2. Проте через 7 днів ефективність дії цих комплексів на вміст PrP^C впала і коливалась у межах показників контрольної групи (рис. 2). У разі введення асОДН з полімерним носієм МР-3 відзначалося, що загальний вміст PrP^C у селезінці знизився на 40 % через 2 доби та на 48 % через 7 днів. Аналізуючи діаграму вмісту PrP^C після ін'єкцій комплексів асОДН з носіями МР-27, також відмітили зниження вмісту клітинного пріона (на 9 % через 2 доби та на 32 % через 7 днів). Ґрунтуючись на результатах, описаних у роботах [4, 9], де автори описали здатність певних високомолекулярних поліамінів утворювати комплекси з патологічним пріоном, можна припустити існування певної афінності між молекулами фізіологічного пріона та полімерами на основі ДМАЕМ, що додатково може впливати на отримані результати досліджень.

Беручи до уваги отримані результати, можна зробити припущення, що ефект від застосування асОДН та їхніх носіїв *in vivo* визначається цілою низкою чинників, з'ясування ролі яких потребує подальших досліджень.

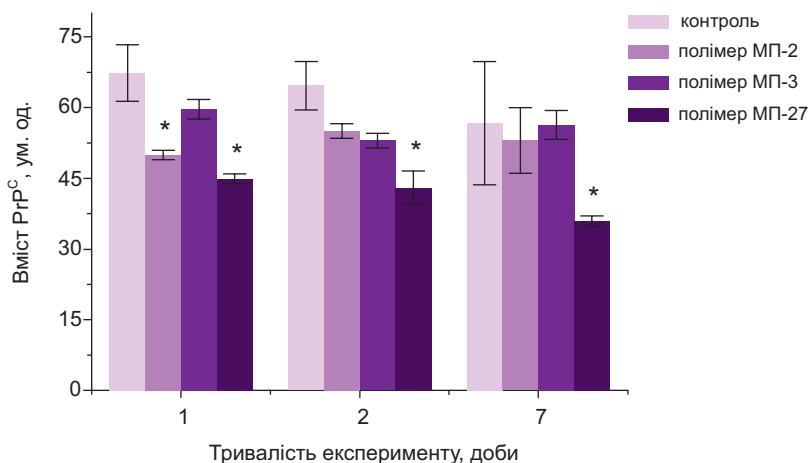


Рис. 2. Вміст PrP^C у тканинах селезінки щурів за дії комплексів асОДН з полімерними носіями на основі ДМАЕМ ($M \pm m$, $n = 3$)

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (дані дослідних груп порівнювали з даними контрольної групи лабораторних щурів)

Fig. 2. The content of cellular prion (PrP^C) in tissues of spleen after injection of complexes of DMAEM with asODN, ($M \pm m$, $n = 3$)

Comment: * – $P < 0.05$; ** – $p < 0.01$ (data of experimental groups was compared with the control group of laboratory rats)

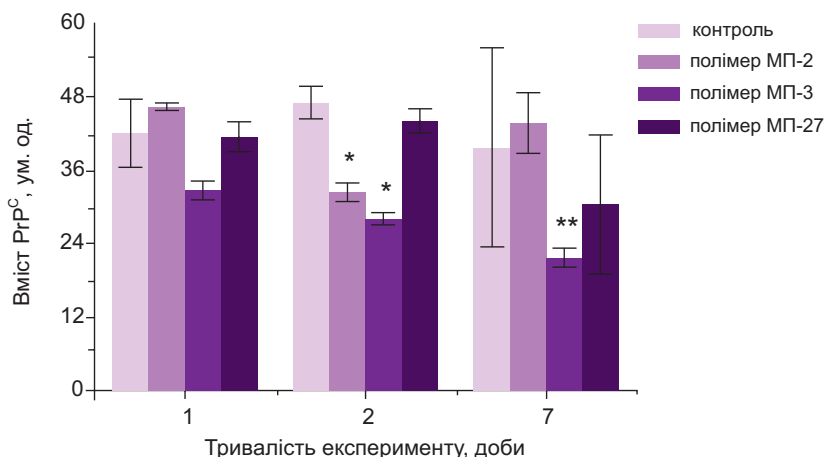


Рис. 3. Вміст PrP^C у тканинах головного мозку щурів за дії комплексів асОДН з полімерними носіями на основі ДМАЕМ ($M \pm m$, $n = 3$)

Примітка: * – $p < 0,05$ (дані дослідних груп порівнювали з даними контрольної групи лабораторних щурів)

Fig. 3. The content of cellular prion (PrP^C) in tissues of brain after injection of complexes of DMAEM with asODN, ($M \pm m$, $n = 3$)

Comment: * – $P < 0.05$; ** – $p < 0.01$ (data of experimental groups was compared with the control group of laboratory rats)

Аналіз результатів після введення комплексів асОДН із носіями МР-2 та МР-3 виявив, що ці полімери не викликали зниження загального вмісту PrP^C у тканинах

мозку щурів. Можливою причиною цього є наявність гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) у ЦНС, адже багато водорозчинних сполук не здатні долати ГЕБ, що є важливою проблемою у створенні ефективних ліків проти хвороб ЦНС. Відмінні результати тримано після застосування асОДН у комплексі з полімерами МР-27, зокрема, зафіксовано зниження вмісту PrP^C на 28 % через 2 доби та 34 % через 7 діб після ін'єкцій (рис. 3).

Отже, за результатами нашого дослідження можна припустити, що на властивості фізіологічного пріона впливає його взаємодія з деякими негативно зарядженими сполуками. Завдяки ендоцитозу наявні молекули пріона вилучаються з поверхні клітини, а специфічні послідовності асОДН, що проникли разом із протеїном у клітину, запускатимуть у дію механізм пригнічення біосинтезу нових молекул пріона [3,11].

ВИСНОВКИ

Новосинтезовані поліДМАЕМ (МР-2, МР-3 та МР-27) здатні зв'язувати і транспортувати олігонуклеотиди. Серед трьох новосинтезованих полімерів найнижчою цитотоксичністю характеризується полімер МР27. Введення щурам комплексів асОДН з поліДМАЕМ призводить до зниження вмісту пріона. Найефективніше такий вплив на вміст клітинного пріона проявляв комплекс асОДН з полімером МР27.

1. **European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.** Strasburg: Council of Europe, 1986. 52 p.
2. *Friberg K.N., Hung G., Wancewicz Ed. et al. Intracerebral Infusion of Antisense Oligonucleotides Into Prion-infected Mice.* Published online 7 February 2012.
3. *Fischer M., Appelhans D., Schwarz S.* Influence of surface functionality of poly(propylene imine) dendrimers on protease resistance and propagation of the scrapie prion protein. **Bio-macromolecules**, 2010, 11(5): 1314–1325.
4. *Hudziak R.M., Barofsky E., Barofsky D.F.* Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation. **Antisense Nucleic Acid Drug. Dev.**, 1996; 6(4): 267–272.
5. *Ivanytska L.A., Stadnyk V.V., Martin U.V.* An effective method of reducing expression of prions *in vitro* and *in vivo* antysens-olihodezoksynukleotyds, conjugated with a new oligoelectrolytes based DMAEM. **Studia Biologica**, 2011; 5(3): 77–88. (In Ukrainian).
6. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, 1970; 4(227): 680–685.
7. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 1951; 193(1): 265–275.
8. *Mikush (Susol) N.U., Vlizlo V.V., Zayichenko S.O.* Research facilities antysens-oligonucleotides with newly-synthesized oligoelectrolyte carriers based DMAEM. **Visnyk of Lviv University. Biological Series**, 2016; 1: 50–56. (In Ukrainian).
9. *Susol N.U., Martin U.V., Kuzmina N.V., Vlizlo V.V.* Histostructure of white rats organs after used newly polymeric-oligoelectrolytics carriers with аsODN. **Animal Biology**, 2016; 18(3): 91–95. (In Ukrainian).
10. *Supattapone S., Wille H., Uyechi M.R.* Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. **J. Virol**, 2001; 75(7): 3453–3461.
11. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1979; 76(9): 4350–4354.
12. *Vlizlo V.V., Ivanytska L.A., Mikush (Susol) N.U.* Development of drugs for the treatment and prevention of prion infection. BACAC, 2014, 24–28 March, Tbilisi, Georgia, p. 23.

INFLUENCE OF COMPLEXES OF ANTISENSE-OLIGONUCLEOTIDES WITH POLYMERIC CARRIERS ON CONTENT OF CELLULAR PRION IN RAT ORGANS

N. U. Susol

*Institute of Animal Biology, UAAS of Ukraine, 38, Stus St., Lviv 79034, Ukraine
e-mail: ua.natalia@gmail.com*

Conjugates of antisense ODN (asODN) with three newly synthesized samples (MP-2, MP-2, MP-27) of polymer carriers based on DMAEM have been studied. It was found that these best conjugates could be created by mixing 0.5 % solution of polymers with asODN. It was found that a survival time of sperm cells was 96 h under action of 0.5 % solution of polymers MP-2 and MP-3. The survival time of sperm cells was increased to 120 h at treatment of cells with 0.5% solution of MP-27 polymer. That had lower cytotoxicity comparing to MP-2 and MP-3 polymers. The effectiveness of transporting system of these conjugates and its influence on cellular prion protein were studied. The results of Western-blot analysis showed that the injection of asODN conjugates with DMAEM into rats caused a decrease in PrP^c in spleen, intestines and brain. AsODN conjugates injected with MP-27 carriers demonstrated that the content of cellular prion in spleen was decreased by 9 % after 2 days and by 32 % after 7 days. The contents of cellular prion in the intestine decreased by 38 % after 2 days and by 55 % after 7 days. The content of cellular prion in brain tissues decreased by 28 % after 2 days and by 34 % after 7 days, respectively. Thus, complexes of asODN with DMAEM decrease the content of cellular prion in rat organs and tissues.

Keywords: cellular prion, brain, intestines, spleen, oligonucleotides, DMAEM conjugates.

Одержано: 24.02.2017