

ВИЗНАЧЕННЯ КОМПЛЕКСІВ ОЛІГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДІВ З ПОЛІМЕРНИМИ НОСІЯМИ

В. В. Влізло¹О. С. Заїченко²Л. А. Іваницька^{1, 2}М. Р. Козак¹Д. Д. Остапів¹¹Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна²Національний університет «Львівська політехніка», Україна

E-mail: vasyi.vlizlo@inen.biol.com.ua

Отримано 30.04.2013

Розроблено новий метод детекції кон'югатів катіонних олігоелектролітів з олігодезоксинуклеотидами, в основі якого лежить вільна дифузія цих речовин у 0,8% -му гелі агарози. Він дає змогу спростити і здешевити вибір найкращого носія серед різноманітних полімерних сполук. Запропонований метод уможлиблює візуальне виявлення факту комплексоутворення між речовинами, що взаємодіють, результатом якого є утворення кільця преципітації. Універсальність цього методичного підходу підтверджено взаємодією з олігодезоксинуклеотидами іншого катіонного полімеру природного походження — хітозану. Порівняльний аналіз результатів використання нашого підходу з даними турбідиметрії олігодезоксинуклеотидполімерних комплексів та їх електрофорезом показав ряд переваг, серед яких — можливість одночасного скринінгу великої кількості полімерних носіїв та відсутність потреби у застосуванні додаткових дорогих приладів і матеріалів. Для висновку про комплексоутворення достатньо наномольних кількостей олігодезоксинуклеотидів.

Ключові слова: синтетичні олігоелектроліти, дифузія в гелі, турбідиметрія, електрофорез олігодезоксинуклеотидів.

Застосування специфічної посттранскрипційної деградації мРНК за дії олігонуклеотидів для керованого інгібування експресії генів *in vitro* та *in vivo* є новим багатообіцяльним підходом у молекулярній біології [1–3]. Таку технологію можна застосовувати для корекції протеїнопатій, лікування ракових захворювань та інших хвороб, спричинених мутаціями у генах [4]. Для доставлення терапевтичних генів, міРНК, антисенс-олігодезоксинуклеотидів (асОДН) до клітин-мішеней створюють вірусні та синтетичні вектори [5]. Використання вірусних систем транспортування є обмеженим через їхню імуногенність, участь у розвитку запального процесу, необмежену реплікацію і високу вартість виготовлення [6]. Синтетичні вектори є низькоімуногенними, біобезпечними, легко піддаються хімічній модифікації, мають значно нижчу вартість виготовлення [5]. Олігоелектроліти різної будови, які здатні утворювати кон'югати з нуклеїновими кислотами, успішно використовують для цільового доставлення плазмідної ДНК та оліго-

нуклеотидів [7], а також асОДН до мРНК пріона для інгібування експресії гена цього протеїну *in vitro* та *in vivo* [8, 9].

Існують різні методи, що дають змогу показати здатність нових синтетичних сполук зв'язувати нуклеїнові кислоти. Це — перший крок на шляху створення ефективних, перспективних, безпечних синтетичних векторів для доставлення терапевтичних генів та олігонуклеотидів. Для встановлення факту комплексоутворення між зарядженими макромолекулами застосовують метод вимірювання величини ζ -потенціалу [10]. Імобілізація ДНК/РНК на катіонному полімері супроводжується зміною величини і знаку ζ -потенціалу. Також для дослідження кон'югатів і визначення стехіометрії утвореного комплексу між полімером і нуклеїновими кислотами чи їх фрагментами традиційно застосовують метод турбідиметрії [11, 12]. Принцип методу ґрунтується на вимірюванні інтенсивності світла певної довжини хвилі, яке проходить через кювету з колоїдним розчином. Проте для дослідження комплексоутворен-

ня за допомогою цих методів необхідним є високовартісне спеціальне устаткування.

Метою роботи було розроблення простого і дешевого методичного підходу для вибору носія нуклеїнових кислот або олігодезоксинуклеотидів за наявності великої кількості полімерних сполук, що їх доцільно застосовувати як носії.

Матеріали і методи

Для дослідження обрано суміш олігодезоксинуклеотидів (ОДН): 5'-TCTGCTGCT-STGACAACGC-3', 5'-AGTAGCCAAGGTTCCG-CCAT-3', 5'-ATGCTTGAGGTTGGTT-3' (AlphaDNA, Канада). Використано низькомолекулярний хітозан (Sigma, Німеччина) і три полімерні сполуки (потенційні носії антисенсолігодезоксинуклеотидів), синтезовані в Національному університеті «Львівська політехніка». Полімерний зразок 1 складається із ланок диметиламіноетилметакрилату (ДМАЕМ) і має вигляд безбарвних прозорих кристалів, водорозчинний. Він стабільний у розчині за фізіологічних значень рН і характеризується вузьким молекулярно-масовим розподілом, його молекулярна маса становить ~5 000 Да. Другою досліджуваною сполукою був двокомпонентний гетерополімер (зразок 2), який складається із кватернізованого ДМАЕМ та бутилакрилату. У третій серії синтезів було отримано складний кополімер (зразок 3), який складався із ДМАЕМ, N-вінілпіролідону, бутилакрилату та аміноетилметакрилату. У цій молекулі основність ДМАЕМ підкріплювалась первинною аміногрупою, яку містить аміноетилметакрилат.

Дослідження кон'югації ОДН із новими низькомолекулярними сполуками. Комплекси ОДН із досліджуваними полімерами виявляли в гелі агарози. Використано 0,8%-ну агарозу (Sigma, Німеччина), розплавлену в забуференому фізіологічному розчині (рН 7,4). Користуючись трафаретом, у гелі вирізали лунки діаметром 2 мм, об'ємом 10 мкл (одну в центрі і чотири радіально на відстані 1 см). У центральні лунки вносили сполуки полімерної природи у концентрації 1%, а в радіальні — ОДН (концентрацією 10 нмол). Інкубували протягом 24–48 год у вологій камері при 2–8 °С. Взаємодія олігоелектролітів і ОДН відображалась у вигляді характерних кілець преципітації, які видно неозброєним оком.

Електрофорез олігонуклеотидів у гелі 1%-ї агарози. Здатність досліджуваних полімерів зв'язувати олігонуклеотиди перевіря-

ли за допомогою електрофорезу в 1%-му гелі агарози. До розчину ОДН з концентрацією 20 нмоль/мкл додавали різні кількості синтезованих полімерних сполук. Концентрація їх у утворених сумішах становила 2–5 мг/мл. 5 мкл отриманого розчину змішували із 10X буфером для нанесення зразків (50% гліцерол, 100 мМ ЕДТА, 0,005% бромфеноловий синій) і вносили в лунки гелю. Електрофорез проводили у трис-боратному буфері з додаванням ЕДТА (89 мМ трис, 89 мМ борної кислоти, 2 мМ ЕДТА) за сталої напруги 2В/см. Гель зафарбовували етидію бромідом у концентрації 2 мкг/мл і фотографували в ультрафіолетовому світлі.

Турбідиметричний метод [11]. Взаємодію полімерних зразків з ОДН досліджували з використанням турбідиметра (TurbiQuant, Німеччина). Розчини зразків 1, 2 і 3 готували в концентрації 1 нг/мл, поступово додаючи розчин ОДН концентрацією 10 нмоль/мкл, рН розчину 7,0. Загальний об'єм кювети становив 25 мл. Утворення комплексу характеризується різким зростанням показника каламутності, який виражали у відносних одиницях.

Результати та обговорення

Генну терапію вважають перспективним підходом у лікуванні вроджених і набутих захворювань. Суттєвим бар'єром у розвитку цього біотехнологічного напрямку є недостатня кількість ефективних векторів для доставлення генів і ОДН. Полікатионні синтетичні полімери можна використовувати як носії генетичного матеріалу для трансфекції клітин ссавців. Слід зазначити, що катионні властивості засобів трансфекції реалізуються переважно через наявність первинних аміногруп або кватернізованого азоту. Такий локалізований позитивний заряд молекул часто є причиною їхньої високої токсичності та імуногенності [13]. Тому ми спробували мінімізувати можливі побічні ефекти, використовуючи низькомолекулярні полімери ДМАЕМ із третинними аміногрупами. Однак здатність їх зв'язувати і утримувати негативно заряджені нуклеїнові кислоти за фізіологічних значень рН потребує перевірки.

Застосувавши принцип подвійної імунодифузії в гелі за [14], ми виявили, що новосинтезовані полімерні катионні сполуки можуть утворювати комплекси з ОДН за нейтрального значення рН. У центральні лунки, вирізані в гелі 0,8%-ї агарози, вносили синтезовані сполуки, а розчини ОДН

додавали в радіальні лунки. Після цього речовини вільно дифундують у гелі. За їх електростатичної взаємодії заряди молекул нівелюються і утворюються надмолекулярні структури, які преципітують. Це виявляється у вигляді характерних кілець преципітації, які видно неозброєним оком.

На рис. 1. видно появу кілець преципітації після взаємодії синтезованих досліджуваних речовин з розчином ОДН протягом 24 год. Дані свідчать про зв'язування нуклеїнових кислот синтезованими полімерами. Як контроль використовували сполуку (полі-N-вінілпіролідон із кінцевими карбоксильними групами), яка явно не взаємодіє з нуклеїновими кислотами. Контрольний зразок вносили у лунку № 4, навколо якої преципітації не спостерігали.

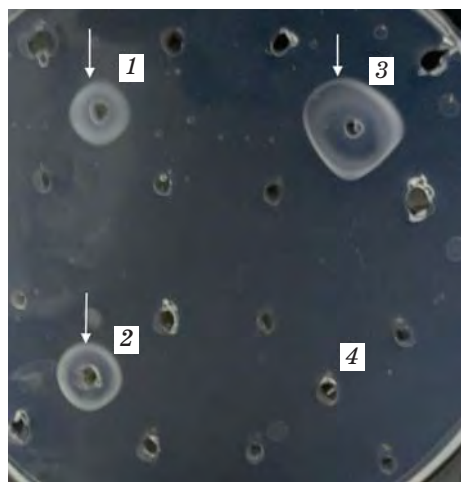


Рис. 1. Взаємодія ОДН з полімерними зразками в гелі 0,8% -ї агарози:

1 — зразок 1, 10 мг/мл; 2 — зразок 2, 10 мг/мл; 3 — зразок 3, 10 мг/мл; 4 — N-вінілпіролідон, 10 мг/мл. Стрілками показано кільця преципітації

Як допоміжний компонент для доставлення генного матеріалу застосовують хітозан — природний нетоксичний, біосумісний, біодеградабельний і низькоімуногенний полімер [15]. Незважаючи на малу ефективність трансфекції і низьку специфічність, його часто застосовують при експериментальних маніпуляціях [16]. Для підтвердження універсальності запропонованої методики досліджено взаємодію хітозану з ОДН (рис. 2).

Утворення кілець преципітації спостерігали за різних концентрацій ОДН. За вищої концентрації ОДН зона преципітації розміщена ближче до центральної лунки.

Отже, запропонована методика є універсальною. Перевагою її є те, що одночасно можна провести скринінг багатьох сполук

на здатність зв'язувати ОДН. Цей метод не потребує дорогих приладів та матеріалів і його можна використовувати за 10 нмоль ОДН.

Комплексоутворення між досліджуваними полімерами та ОДН відбувається завдяки електростатичній взаємодії, що можна підтвердити за допомогою електрофорезу ОДН (рис. 3). Унаслідок появи комплексів електрофоретична рухливість ОДН різко знижується (лунки 1–9) порівняно з вільними ОДН (лунка 10).

Метод турбідиметрії також дає змогу виявити і встановити кількісні характеристики утворення інтерполіелектролітичних комплексів, але він потребує застосування досліджуваних сполук у значно вищій концентрації, що є суттєвим недоліком через високу вартість ОДН.

Із рис. 4 випливає, що зразок 1 взаємодіє з ОДН у розчині за співвідношення 1 нг/мл полімеру до $13,2 \pm 1,06$ нмоль/мл олігонуклеотидів, при цьому утворюються стабільні гідрофобні структури, і значення каламутності розчину дуже високе. Характер піка свідчить про вузькість молекулярно-масового розподілу. Подальше додавання ОДН зсуває гідрофільно-гідрофобну рівновагу системи, і частинки унаслідок гідратації молекул ОДН стають більш гідрофільними і краще розчинними.

Щодо зразка 2, то тут виявлено схожий тип взаємодії полімеру та ОДН. Відмінності полягали в утворенні першого невеликого піка при формуванні комплексу полімеру з ОДН. Останній швидко дисоціює у розчині внаслідок електролітичної дисоціації сильного полікатиону, яким є зразок 2, та сильного поліаніону — ОДН. Подальше додавання ОДН очевидно спричинює конформаційні зміни у полімері, а утворені надмолекулярні комплекси набувають стабільної структури, про що свідчить поява наступного піка. Зразок 2 зв'язує значно більшу кількість ОДН ($22 \pm 0,23$ нмоль/мл ДНК на 1 нг/мл полімеру) порівняно зі зразком 1 (рис. 4).

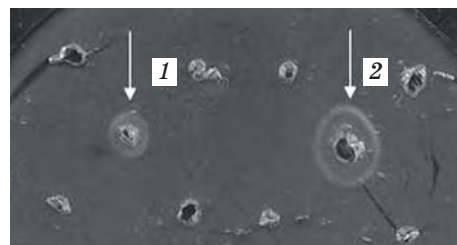


Рис. 2. Утворення комплексу ОДН з низькомолекулярним хітозаном (10 мг/мл) у гелі 0,8% -ї агарози:

1 — ОДН, 10 нмоль/мкл; 2 — ОДН 1 нмоль/мкл. Стрілками показано кільця преципітації

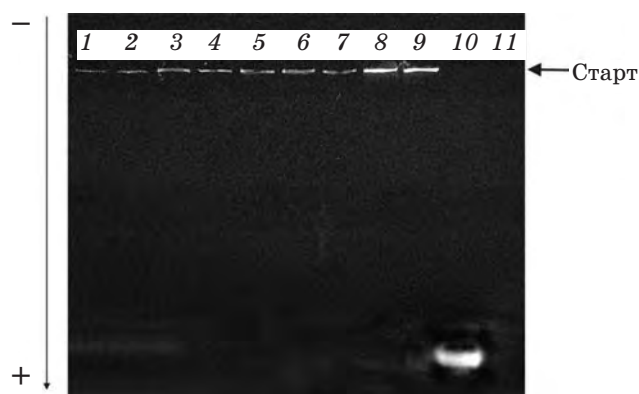


Рис. 3. Електрофорез олігонуклеотидів та їх комплексів із досліджуваним полімером 1 у гелі 1% -ї агарози:

№ лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Концентрація олігонуклеотидів, нмоль/мкл	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	0
Концентрація зразка 1, мг/мл	10,0	5,0	4,0	3,53	3,45	3,38	3,3	3,25	2,5	0	10

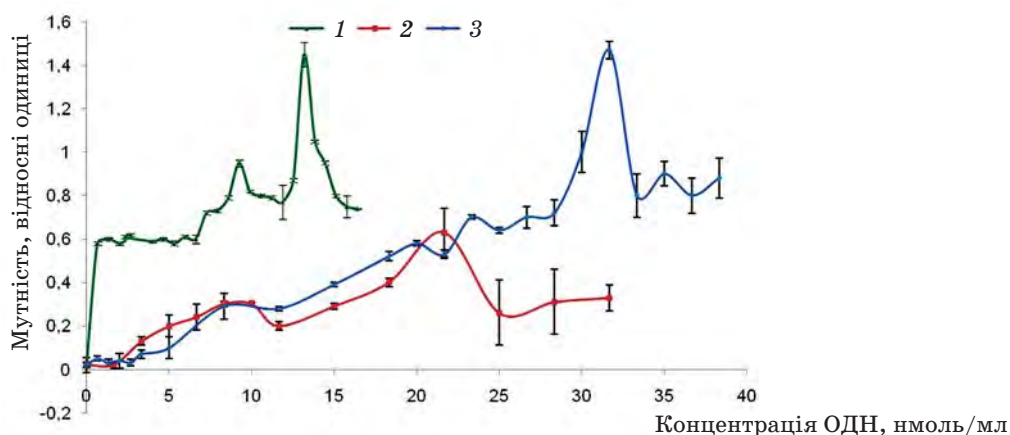


Рис. 4. Комплексоутворення між ОДН та зразками 1, 2, 3 (турбідиметрія)

Зразок 3 здатен зв'язати найбільшу кількість ОДН ($31 \pm 0,46$ нмоль/мл на 1 нг/мл полімеру). Форма піка свідчить про стабільні надмолекулярні структури та їхню однорідність (рис. 4).

Ці дані корелюють із картиною преципітації ОДН з досліджуваними полімерами (рис. 1). Як видно з рис. 1, площа, обмежена кільцем преципітації навколо лунок зі зразками 1, 2 і 3, зростає в такому порядку: $1 < 2 < 3$. За методом турбідиметрії виявлено, що кількість ОДН, яку може зв'язати полімер з утворенням стехіометричного комплексу, збільшується в такому самому порядку.

Метод вільної дифузії в гелі також дає кількісну характеристику взаємодії нових полімерних сполук з ОДН за площею зони преципітації утворених комплексів.

Отже, різні методи дозволяють виявити та охарактеризувати ефективність зв'язу-

вання нуклеїнових кислот новосинтезованими полімерами. Порівнюючи використані класичні методи із запропонованими нами, виявили, що хоча загальна тривалість цього методу перевищує існуючі, проте він має ряд переваг (таблиця).

Мінімальний час, який затрачає дослідник на підготовку зразків і поставлення досліду, тут становить 30 хв й існує можливість провести одночасний скринінг значної кількості потенційних носіїв нуклеїнових кислот. Запропонований метод не потребує спеціального і високоякісного обладнання, є безпечним для дослідника. Для біотестування нових носіїв нуклеїнових кислот чи олігодезоксинуклеотидів достатньо використати наномольні кількості останніх, тимчасом як для турбідиметрії чи електрофоретичного дослідження необхідні мікромольні кількості нуклеїнових кислот.

**Порівняльна характеристика методів детекції комплексоутворення
між полімером і олігодезоксинуклеотидами**

Параметри порівняння	Методи дослідження кон'югації синтетичних сполук і нуклеїнових кислот		
	Турбидиметрія	ДНК-електрофорез	Наш метод (за принципом вільної дифузії)
Спеціальне обладнання	+	+	—
	(турбидиметр)	(камера і блок живлення, транслюмінатор)	
Тривалість до отримання результату	2 год	2–3 год	24 год
Час, безпосередньо витрачений дослідником	2 год	2–3 год	0,5 год
Кількість олігодезоксинуклеотидів	До 10 000 нмоль	До 2 000 нмоль	До 10 нмоль
Кількість зразків, які можна одночасно дослідити	1	Близько 10–20 (залежить від параметрів камери для електрофорезу)	Більше 20 (залежить від об'єму обраної ємності для гелю)
Безпека дослідника	Безпечний	Небезпечний за використання етидію броміду та транслюмінатора	Безпечний

Таким чином, запропоновано новий метод оцінювання ефективності утворення комплексів між олігодезоксинуклеотидами та катіонними олігоелектролітами, що базується на вільній дифузії речовин у гелі агарози. Метод не передбачає використання

спеціального устаткування, високотоксичного етидію броміду, як під час електрофоретичного дослідження, недорогий і простий у застосуванні і потребує в 1 000 разів меншої кількості олігодезоксинуклеотидів порівняно з турбидиметрією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Tuschl T., Zamore P. D., Lehmann R. et al. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro* // *Genes Devel.* — 1999. — V. 13. — P. 3191–3197.
2. Vilgelm A. E., Chumakov S. P., Prassolov V. S. RNA interference: Biology and prospects of application in biomedicine and biotechnology // *Mol. Biol.* — 2006. — V. 40, N 3. — P. 339–354.
3. De França N. R., Júnior D. M., Lima A. B. et al. RNA interference: A new alternative for rheumatic diseases therapy // *Bras. J. Rheumatol.* — 2010. — V. 50, N 6. — P. 695–709.
4. Özbas-Turan S., Akbuga J., Sezer A. D. Topical application of antisense oligonucleotide-loaded chitosan nanoparticles to rats // *Oligonucleotides.* — 2010. — V. 20, N 3. — P. 147–153.
5. Halama A., Kulicki M., Librowski T., Lochycki S. Polymer-based non-viral gene delivery as a concept for the treatment of cancer // *Pharmacol. Rep.* — 2009. — V. 61. — P. 993–999.
6. Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector // *Science.* — 1999. — V. 286. — P. 2244–2245.
7. Finiuk N., Bilyk O., Mitina N. et al. Efficient DNA delivery to yeast cell by novel oligoelectrolyte nanopolymer carriers / IV Polish-Ukrainian Weigl Conference «From microbiology to synthetic biology»: Institute of Immunology and Experimental Therapy, Wrocław, May 18–20. — 2011, V. 4, Issue 1. — P. 106.
8. Іваницька Л. А., Стадник В. В., Майор Х. Я., Влізло В. В. Вміст фізіологічного пріона в клітинах лінії L1210 за дії фосфортіоатних антисенс-олігодезоксинуклеотидів // *Біол. тварин.* — 2011. — Т. 13, № 1–2. — С. 433–439.
9. Іваницька Л. А., Стадник В. В., Мартин Ю. В. та ін. Ефективний метод зниження рівня експресії пріона *in vitro* та *in vivo* антисенс-олігодезоксинуклеотидами, кон'югованими із новим олігоелектролітом на основі диметиламіноетилметакрилату // *Біол. студії.* — 2011. — Т. 5, № 3. — С. 77–88.
10. Zhang X., Ercelen S., Duportail G. et al. Hydrophobically modified low molecular weight chitosans are efficient and nontoxic gene delivery vectors // *J. Gene Med.* — 2008. — V. 10. — P. 527–539.
11. Ляликов Ю. С. Физико-химические методы анализа. Изд. 5-е, перераб. и доп. — М.: Химия. — 1974. — 536 с.

12. Пиккеринг У. Ф. Современная аналитическая химия: пер. с англ. — М., 1977. — 560 с.
13. Sakurai H., Kawabata K., Sakurai F. *et al.* Innate immune response induced by gene delivery vectors // Intern. J. Pharm. — 2008. — V. 354. — P. 9–15.
14. Антитела. Методы. Кн. 1: пер. с англ. / Под ред. Д. Кэйти. — М.: Мир, 1991. — С. 201–207.
15. Bhuvaneshwari S., Sruthi D., Sivasubramanian V. *et al.* Development and characterization of chitosan film // IJERA. — 2011. — V. 1, N 2. — P. 292–299.
16. Saranya N., Moorthi A., Saravanan S. *et al.* Chitosan and its derivatives for gene delivery // Int. J. Biol. Macromol. — 2011. — V. 48, N 2. — P. 234–238.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ С ПОЛИМЕРНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ

В. В. Влизло¹
О. С. Заиченко²
Л. А. Иваницкая^{1, 2}
М. Р. Козак¹
Д. Д. Остапів¹

¹Институт биологии животных НААН, Львов,
Украина

²Национальный университет
«Львовская политехника», Украина

E-mail: vasyi.vlizlo@inen.biol.com.ua

Разработан новый метод детекции конъюгатов катионных олигоэлектrolитов с олигодезоксинуклеотидами, в основе которого лежит свободная диффузия этих веществ в 0,8% -м геле агарозы. Он позволяет упростить и удешевить выбор лучшего носителя среди различных полимерных соединений. Предложенный метод дает возможность визуально выявлять факт комплексообразования между взаимодействующими веществами, результатом которого является образование кольца преципитации. Универсальность предложенного методического подхода подтверждена взаимодействием с олигодезоксинуклеотидами другого катионного полимера естественного происхождения — хитозана. Сравнительный анализ результатов использования нашего подхода с данными турбидиметрии олигодезоксинуклеотидполимерных комплексов и их электрофорезом показал ряд преимуществ, среди которых — возможность одновременного скрининга большого количества полимерных носителей и отсутствие необходимости в применении дополнительных дорогостоящих приборов и материалов. Для вывода о наличии комплексообразования достаточно наномольных количеств олигодезоксинуклеотидов.

Ключевые слова: синтетические олигоэлектrolиты, диффузия в геле, турбидиметрия, электрофорез олигодезоксинуклеотидов.

DETECTION OF COMPLEXES OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES WITH POLYMERIC CARRIERS

V. V. Vlizlo¹
O. S. Zaichenko²
L. A. Ivanytska^{1, 2}
M. R. Kozak¹
D. D. Ostapiv¹

¹Institute of Animal Biology of National
Academy of Agrarian Sciences, Lviv, Ukraine

²National University «Lviv Polytechnic»,
Ukraine

E-mail: vasyi.vlizlo@inen.biol.com.ua

The new method for detection of cationic oligoelectrolites conjugates with oligodeoxynucleotides, based on free diffusion of these substances in 0.8% agarose gels is developed. It enables to simplify and reduce the cost of visual identification of the best carrier among various polymer compounds and to uncover the fact of complex formation between the interacting agents resulting in formation of a ring precipitation. The universality of the proposed methodological approach is confirmed by interaction of oligodeoxynucleotides with other cationic polymer of natural origin, namely chitosan. Comparative analysis of our approach application to turbidimetry data concerning oligodeoxynucleotides complexes and their electrophoresis showed some advantages, among them are the ability to screen simultaneously a large number of polymeric carriers and no need for using of more expensive equipment and materials. To conclude the complexing occurrence it is enough nanomol amounts of oligodeoxynucleotide.

Key words: synthetic oligoelectrolites, diffusion in gel, turbidimetry, electrophoresis of oligodeoxynucleotides.