

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

УДК 577.3; 577.32

**ДМИТРУК
Ольга Геннадьевна**

**ФОРМИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА
ДЕНДРИПЛЕКСОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
С КЛЕТКАМИ КРОВИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.02 - биофизика

Минск, 2016

Работа выполнена в лаборатории протеомики ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Научный руководитель: **Щербин Дмитрий Григорьевич**, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией протеомики ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Официальные оппоненты: **Стожаров Александр Николаевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой радиационной медицины и экологии УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Федорович Сергей Викторович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биофизики и инженерии клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Оппонирующая организация: Белорусский государственный университет

Защита состоится «24» июня 2016 г. в 14.00 на заседании Совета по защите диссертаций (Д 01.37.01) в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27. Телефон ученого секретаря 332-16-04; факс 284-23-59; E-mail: pshybytko@ibp.org.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Автореферат разослан «23» мая 2016 года

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 01.37.01,
кандидат биологических наук



Пшибытко Н.Л.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для борьбы с трудно излечиваемыми или вовсе не поддающимися традиционному лечению заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, ВИЧ-инфекция, многие моногенетические, неврологические, сердечно-сосудистые, воспалительные и др., предложено использовать генетическую терапию [Wang et al., 2014]. Открытый в 1990-е годы естественный механизм генетической регуляции процессов синтеза белков в клетке – РНК-интерференция – находит свое широкое применение для подавления экспрессии генов и синтеза соответствующих белков на пост-транскрипционном уровне. РНК-интерференция (РНКи) основана на способности коротких одно- и двухцепочечных РНК стимулировать специфическую дегградацию участков клеточной мРНК [Elbashir et al., 2001].

Одним из основных барьеров на пути к применению генетической терапии является проблема доставки нуклеиновых кислот – "эффекторов" в условиях *in vivo*. Осуществляться она может с помощью вирусных и невирусных систем доставки. Вирусные векторы наиболее эффективны, однако, их отрицательное свойство — высокая иммуногенность и канцерогенность *in vivo* [Evans et al., 2008; Hasein-Bey-Abina et al., 2008]. По сравнению с вирусными системами синтетические (невирусные) характеризуются меньшей результативностью, но большей гибкостью и биобезопасностью. Среди синтетических полимеров можно отметить катионные дендримеры, выделяющиеся своими уникальными архитектурой и физико-химическими свойствами. Широта выбора мономерных блоков и периферических групп для синтеза дендримеров дает возможность разрабатывать биосовместимые конструкции для эффективной доставки генетического материала в клетки.

Однако к моменту начала данного исследования оставались неизученными закономерности и механизмы взаимодействия катионных фосфорного и стабильных карбосилановых дендримеров с короткоцепочечными нуклеиновыми кислотами (малые интерферирующие РНК – миРНК, олигонуклеотиды – ОН), особенности формирования и стабильности вышеуказанных комплексов, а также их взаимодействие с клетками крови. Все вышеперечисленное делает исследования чрезвычайно актуальным.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Диссертационная работа выполнена в рамках задания 1.06 «Исследование взаимодействия новых эффективных носителей генетического материала дендримеров с клетками крови человека как основа их применения в генетической терапии» (ГР 20112484) и задания 1.05 «Исследование молекулярных механизмов регуляции внутриклеточных процессов при

злокачественной трансформации клеток с целью разработки высокоэффективных подходов к коррекции онкогенеза» (ГР 20112485) ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий», 2011-2013 гг., задания 1.31 «Анализ цитотоксичности дендримеров и эффективности трансфекции с их помощью противоопухолевого генетического материала в раковые клетки с целью генетической терапии злокачественных новообразований» (ГР 20140138) ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий», 2014-2015 гг., гранта № Б13МС-004 Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований «Анализ формирования дендриплексов и оценка их влияния на клетки крови человека» (ГР 20131441), а также международного гранта IRSES № PIRSES-GA-2012-316730 NANOGENE “EU-Belarus-Russia Network in Nanomaterials-Driven Anti-Cancer Gene Therapy” (ГР 20130321), 2013-2016 гг., финансируемого в рамках 7-ой рамочной программы Европейского союза.

Работа соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2011–2015 годы, утвержденных Указом Президента Республики Беларусь от 22 июля 2010 г. № 378: п.33 «Медицинские биотехнологии». Диссертационная работа соответствует также направлениям из перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы, утвержденным Постановлением Совета Министров от 12 марта 2015 г. № 190, разделы "биологические системы и технологии", "медицина и фармацевтика".

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось выяснение механизмов формирования комплексов между катионными дендримерами и противовирусными короткоцепочечными нуклеиновыми кислотами, а также исследование их взаимодействия с клетками крови человека (эритроцитами, лимфоцитами и тромбоцитами).

Поставленная цель включала решение следующих задач:

- 1) провести исследование связывания нуклеиновых кислот дендримерами;
- 2) определить физико-химические и морфологические свойства комплексов в зависимости от количественного соотношения дендримеров и полинуклеотидов в составе дендриплексов;
- 3) оценить стабильность сформированных дендриплексов с течением времени и в присутствии сывороточного альбумина;
- 4) изучить воздействие дендримеров и дендриплексов на эритроциты крови человека;
- 5) определить цитотоксическое действие дендримеров и дендриплексов на моноклеонарные клетки периферической крови человека;
- 6) исследовать процесс агрегации изолированных тромбоцитов при действии дендримеров и оценить влияние образования комплексов с полинуклеотидами на параметры агрегации.

Научная новизна. Впервые проведен комплекс исследований стабильных карбосилановых и фосфорного дендримеров в качестве носителей противовирусных одноцепочечных олигонуклеотидов и миРНК, направленных против вируса иммунодефицита человека. Установлено, что катионные фосфорный дендример и Si-C карбосилановые дендримеры эффективно связываются с антивирусными нуклеиновыми кислотами посредством электростатического взаимодействия; поверхностный потенциал и гидродинамический диаметр дендриплексов находятся в пределах, обеспечивающих их входение в клетки. Установлена независимость размеров и формы дендриплексов от формирующих их дендримеров – как от их химической природы, так и от их генерации. Показано, что стабильность дендриплексов в растворе с течением времени и в присутствии сывороточного альбумина определяется типом дендримера и вторичной структурой полинуклеотида. Модельные исследования с клетками крови выявили наличие цитотоксического действия на эритроциты, мононуклеарные клетки, а также способность дендримеров инициировать агрегацию тромбоцитов. Впервые установлено, что комплексообразование между антивирусными олигонуклеотидами и дендримерами существенно снижает степень цитотоксичности дендриплексов по отношению к клеткам крови по сравнению с действием свободных дендримеров.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Катионные фосфорный дендример и Si-C карбосилановые дендримеры эффективно связываются с антивирусными нуклеиновыми кислотами посредством электростатического взаимодействия, образуя наноразмерные шарообразные структуры, поверхностный потенциал которых определен молярным соотношением дендримера и нуклеиновой кислоты в составе комплекса.

2. Степень стабильности дендриплексов с течением времени и в присутствии сывороточного альбумина зависит от типа дендримера и вторичной структуры полинуклеотида.

3. Комплексообразование между антивирусными нуклеиновыми кислотами и дендримерами существенно снижает степень цитотоксичности свободных дендримеров по отношению к эритроцитам, лимфоцитам и тромбоцитам крови человека.

Личный вклад соискателя. Экспериментальный материал получен соискателем самостоятельно. Выбор методов исследований, условий экспериментов, интерпретация результатов и анализ полученных данных проведены при участии научного руководителя, который является соавтором публикаций.

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований, включенные в диссертацию, доложены на 10 международных конференциях: международных научных конференциях «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Беларусь, Минск, 2010, 2012, 2014), второй и третьей международных конференциях «Нанобиофизика: фундаментальные и прикладные аспекты» (Украина, Киев, 2011; Харьков, 2013), международной конференции «Терапевтические нуклеиновые кислоты» (Польша, Лодзь, 2011), восьмой международной конференции «Нано-био Европа» (Италия, Варес, 2012), третьей международной конференции «Биологическое применение дендримеров 2012» (Испания, Толедо, 2012), международной конференции «Новые тренды в токсикологии – наночастицы и наноматериалы» (Польша, Лодзь, 2012), международной конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Беларусь, Минск, 2013).

Опубликование результатов диссертации. Общее количество опубликованных работ по теме диссертации – 18 (9,6 авторских листов), в том числе 2 раздела в рецензируемых зарубежных коллективных монографиях (2,2 авторских листов); 1 статья в научном рецензируемом журнале, издаваемом в Республике Беларусь и 3 статьи в зарубежных рецензируемых журналах (импакт-факторы – 7,70, 4,40 и 2,14), соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и ученых званий в республике Беларусь» ВАК РБ (5,5 авторских листов); 7 статей в материалах международных конференций (1,4 авторских листов); 5 тезисов докладов на международных научных конференциях (0,5 авторских листов).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы (глава 1), описания объектов, методов исследования и оборудования (глава 2), изложения полученных результатов (главы 3 и 4), заключения, библиографического списка использованных источников и публикаций соискателя, а также 2 приложений, содержащих акты внедрения в учебный и научный процессы.

Работа изложена на 149 страницах машинописного текста, из них 20 страниц занимают иллюстрации (52 рисунка), 5 страниц – таблицы (9 таблиц), 5 страниц – приложения (2 приложения), 17 страниц – библиографический список из 251 источника: 233 – библиографические источники и 18 – публикации соискателя.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследований. Объектами исследования служили фосфоросодержащий дендример 4-ой генерации (Ф4) [Caminade et al., 2005] и стабильные карбосилановые Si-C дендримеры (СКД) 1-ой, 2-ой и 3-ей генерации [Pedziwiatr-Werbicka et al., 2012], а также эффекторы РНК-интерференции:

короткие одноцепочечные олигонуклеотиды AT и GEM91 и двухцепочечная малая интерферирующая РНК (миРНК) siP24. Последовательности полинуклеотидов были выбраны, как комплементарные к участкам мРНК ВИЧ, синтезированы фирмой Genomed (Польша).

Связывание дендримеров с короткоцепочечными нуклеиновыми кислотами (КНК) изучали методом поляризации флуоресценции флуоресцеин-меченных ОН и миРНК в 0,15 М Na-фосфатном буфере (рН 7,4), а также методом кругового дихроизма КНК в присутствии возрастающей концентрации дендримеров. На основании измерений флуоресценции и поляризации флуоресценции меченных КНК была определена стабильность комплексов с течением времени и в присутствии альбуминов. Оценку поверхностного потенциала (ξ -потенциала) проводили методом электрофоретического фазового анализа рассеянного света дендриplexами в 0,15 М Na-фосфатном буфере (рН 7,4). Размер комплексов в водном растворе (гидродинамический диаметр) был оценен методом динамического рассеяния света на приборе Zeta-Sizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Англия). При помощи атомно-силовой спектроскопии (АСМ) были оценены размеры, а также получены данные о морфологии изучаемых комплексов.

Объектами служили изолированные клетки из донорской крови человека (полученные в ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий») в консерванте «3 % дигидрат натрия»: эритроциты, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека и тромбоциты. Эритроциты выделяли и исследовали по методу, описанному в работе [Klajnert et al., 2006]: определяли степень гемолиза после получасового воздействия дендримеров и дендриplexов. Выделение МКПК проводили путем центрифугирования в градиенте плотности гистопака с последующим троекратным отмыванием в среде Хенкса. Жизнеспособность МКПК исследовали после 72-х часовой инкубации с соответствующими соединениями в полной питательной среде RPMI 1640 (10 % телячьей сыворотки, 1 % антибиотика) на основании флуоресценции редокс-красителя Ресазурина. Изоляцию тромбоцитов проводили по аналогичной с [Nathan et al., 1979] методике. С использованием агрегометра AP2110 (Solar, Минск, Беларусь) были получены кривые динамики агрегации тромбоцитов в среде Дюльбекко сразу после воздействия дендримеров и дендриplexов.

Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения и его стандартного отклонения. Для сравнения двух групп в случае нормального распределения значений использовали критерий Стьюдента. Множественные сравнения между группами проводили с помощью критериев "post-hoc" однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [Гланц, 1999].

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

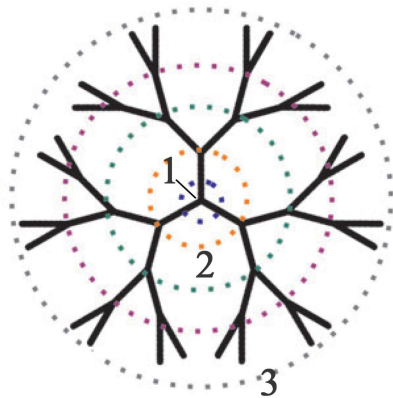


Рисунок 1. – Структура дендримера:
1) ядро, 2) внутренние полости, 3)
поверхностные группы [Lee et al., 2005]

Дендримеры представляют собой шарообразные полимеры с древоподобной структурой: ветви из мономерных субъединиц расходятся в разные стороны от центрального ядра (рисунок 1) [Tomalia, 1995, Fischer and Vogtle, 1999; Hawker and Frechet, 1990; Newkome et al., 1986;]. Дендримеры характеризуются монодисперсностью, наличием большого числа реакционно способных терминальных групп, вариабельностью выбора мономерных блоков и терминальных групп, что

позволяет создавать структуры с заранее определенными свойствами [Bosman et al., 1999].

В процессе доставки генов в цитозоль клетки (место расположения RISC-комплекса, обеспечивающего протекание процесса РНК-интерференции) необходимо преодолеть ряд барьеров. Во-первых, введение незащищенной нуклеиновой кислоты в кровяное русло сопровождается ее немедленной ферментативной деградацией [Niven et al., 1998, Kay et al., 2011]. Во-вторых, свободная КНК не может пройти сквозь отрицательно заряженную мембрану клетки ввиду высокой лабильности структуры свободной РНК в растворе и ее отрицательного заряда [Defuz et al., 2005]. Таким образом, вектор для переноса КНК должен удовлетворять условию полного связывания всех частей полинуклеотидов, нейтрализации ее отрицательного заряда, а также обеспечивать стабильность данного комплекса.

Анализ связывания дендримеров и ОН/миРНК

Возрастание степени поляризации флуоресцеин-меченных ОН и миРНК при добавлении дендримеров свидетельствует об образовании комплекса между дендримерами и КНК (рисунок 2А). Характер роста поляризации флуоресценции значительно зависит от типа дендримера и его генерации. Существенного различия в процессе формирования комплексов с различными ОН выявлено не было, что указывает на отсутствие зависимости их взаимодействия с поликатионами от последовательности нуклеотидов. А именно, АТ содержит 16 нуклеотидов, GEM91 – 25, однако, такое различие не приводило к

существенному различию в степени поляризации их флуоресценции при комплексообразовании с дендримерами.

На рисунке 2Б представлены максимумы полосы спектров кругового дихроизма (260 нм) КНК при возрастающей концентрации дендримеров. Снижение степени эллиптичности обусловлено структурными перестройками (изменением вторичной структуры) пар оснований по мере их связывания дендримерами.

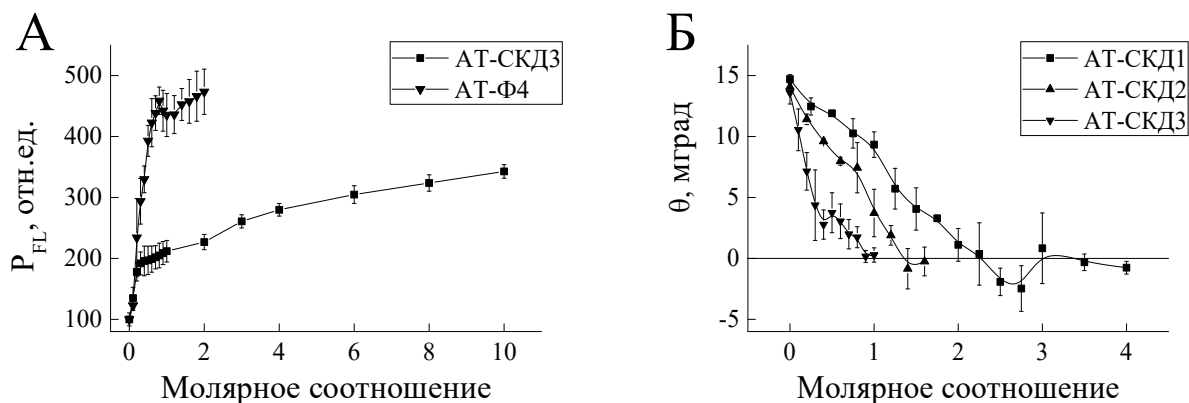


Рисунок 2. – Зависимости степени поляризации флуоресценции (А) и максимума полосы спектра кругового дихроизма (Б) дендриплексов от молярного соотношения дендример:КНК

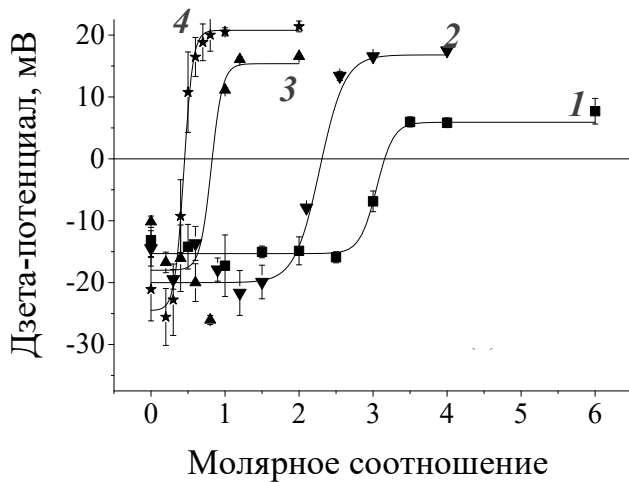
При физиологических условиях концевые первичные аминогруппы исследованных нами дендримеров являются протонированными и имеют положительный заряд [Shcharbin et.al., 2014], при этом фосфатные группы КНК при физиологических условиях имеют отрицательный заряд. Таким образом, связывание комплексов происходит с преобладающим участием электростатических сил. Выход кривых эллиптичности и степени поляризации флуоресценции комплексов на плато указывает на полное связывание полинуклеотидов дендримерами. Таким образом, показано, что взаимодействие дендримеров с анти-ВИЧ ОН и миРНК приводит к формированию их комплексов. Анализ приведенных данных позволяет оценить число молекул дендримера, приходящихся на одну молекулу КНК в составе дендриплексов, для полного связывания полинуклеотидов (таблица 1).

Таблица 1 – Удельное число молекул дендримера, необходимое для полного связывания КНК в комплексах

Наименование КНК	Наименование дендримера, образующего комплекс			
	СКД1	СКД2	СКД3	Ф4
АТ	3,1	1,5	0,9	0,7
GEM91	2,2	2,1	0,7	0,8
siP24	18,2	9,1	2,6	2,6

Характеристика физико-химических свойств дендриплексов

Известно, что несвязанные КНК практически не способны проникать внутрь клетки в связи с наличием как у них, так и на поверхности клеток отрицательных зарядов [Caron et. al., 2010]. Следовательно, средства доставки КНК в клетку должны обеспечивать их проникновение внутрь клетки. Поскольку изучаемые дендримеры не содержат на поверхности специфических маркеров связывания, процесс их проникновения в клетку определяется эндоцитозом [Conner et.al., 2003; Huang et. al., 2011]. Таким образом, в процессе работы необходимо было выяснить, обеспечивается ли суммарный внешний положительный заряд при формировании дендриплексов. С другой стороны, существенное увеличение размеров комплексов может препятствовать их проникновению внутрь клеток. Следовательно, дальнейшим шагом было сопоставление



АТ-СКД1 (кривая 1), АТ-СКД2 (кривая 2),
АТ-СКД3 (кривая 3), АТ-Ф4 (кривая 4)

Рисунок 3. – Зависимость дзета-потенциала АТ-дендриплексов от молярного соотношения «дендример:АТ»

Дзета-потенциал дендриплексов сигмообразно зависит от соотношения «дендример:КНК» в составе комплекса и варьируется от -33 мВ до $+32$ мВ (рисунок 3). Степень изменения потенциала дзета дендриплексов определяется количеством терминальных реакционных групп дендримеров, что также свидетельствует об участии электростатического взаимодействия при формировании комплексов. Избыточное количество дендримеров приводит к формированию положительно заряженных дендриплексов.

Известно, что размер частиц ксенобиотиков влияет на их биосовместимость и время циркуляции в организме [Goldberg et.al., 2007]. Размер дендриплексов был оценен на основании измерений их гидродинамического диаметра методом динамического рассеяния света в растворе. Гидродинамический диаметр представляет собой суммарный размер самой частицы и ее окружения в пределах скользящей границы, поэтому он всегда несколько больше реальных физических размеров исследуемых частиц [Malvern Instruments ltd, DLS manual instructions 2004].

На основании полученных данных были выявлены закономерности формирования комплексов. Установлено, что зависимость размера от молярного соотношения имеет колоколообразный характер с максимумами,

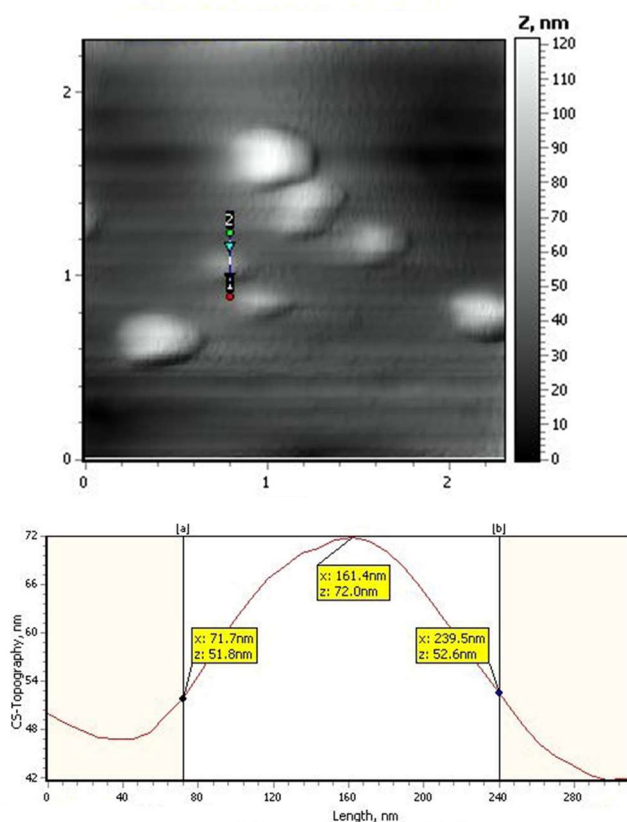


Рисунок 4. – АСМ-изображения дендриплексов GEM91-Ф4

соответствующими нейтральными значениями дзета-потенциала, причем максимальные размеры всех дендриплексов, включающих ОН не превышали 700 нм. Обнаружено, что размер дендриплексов не зависит от генерации дендримера, однако, фосфорный дендример обеспечивает более плотную упаковку комплекса, вероятнее всего, ввиду большей плотности катионных групп на поверхности. Показано отсутствие монодисперсности дендриплексов в растворе. На основании анализа АСМ-изображений дендриплексов (рисунок 4) показано, что все исследованные комплексы в обезвоженном состоянии вне зависимости от формирующих компонентов имеют форму эллипсоидов. Этот метод также

позволил оценить средний радиус при использовании математического приближения. Полученные результаты подтвердили вывод о независимости размера комплексов от генерации дендримеров. Важно отметить, что рассчитанные диаметры комплексов, полученные методом АСМ, находятся в диапазоне 150-400 нм.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что размер исследуемых дендриплексов находится в наноразмерном масштабе. В условиях отсутствия рецептор-опосредованной доставки положительный поверхностный заряд может обеспечивать облегченное проникновение в клетки посредством пассивного транспорта – эндоцитоза [Kichler, 2004].

Оценка стабильности дендриплексов

Известно, что в течение первых 10 мин после внутривенного введения мышам происходит ферментативная деградация 50 % несвязанной плазмидной ДНК [Kawabata et al., 1995]. Поэтому для успешной трансфекции клеток в

условиях *in vivo* синтетические векторы должны обеспечивать продолжительное время циркуляции функционально активного генетического материала в кровотоке, что подразумевает стабильность вышеуказанных комплексов как от времени их инкубации, так и в присутствии сывороточных белков [Yin et al., 2014].

В настоящей работе проведено исследование процесса высвобождения ОН и миРНК из дендриплексов, обеспечивающих полное связывание полинуклеотидов (таблица 1), от времени их инкубации в растворе на протяжении 50 ч. Показано, что комплексы ОН с исследуемыми дендримерами остаются стабильными в физиологическом растворе на протяжении не менее 48 ч. В отличие от них миРНК из комплексов с карбосилановыми дендримерами по истечении 48 ч высвобождается полностью, причем кривая зависимости степени высвобождения от времени инкубации имеет форму кривой экспоненциального затухания: по приблизительной оценке, половина комплексов в растворе разрушается спустя 11 ч вне зависимости от генерации связывающего дендримера.

Как было показано ранее, эффективность трансфекции КНК *in vitro* некоторыми дендримерами может существенно снижаться при добавлении в

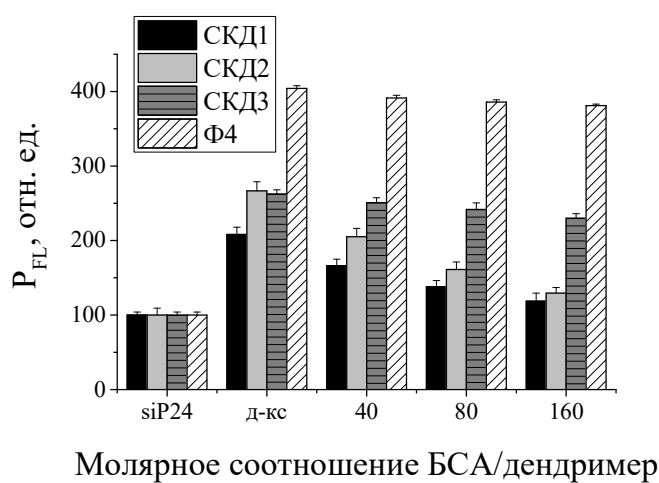


Рисунок 5. – Относительная степень поляризации флуоресценции siP24-FITC в свободном состоянии (siP24), в составе дендриплекса (д-кс), а также в составе дендриплекса в присутствии в растворе альбумина

среду сыворотки крови [Joester et al., 2003; Rosenecker et al., 2003]. Поскольку сывороточный альбумин человека составляет около 60 % от всей белковой фракции плазмы крови человека и является основным транспортным и детоксицирующим белком крови [Shen et al., 2004] и так как он практически гомологичен альбумину сыворотки быка, для исследования стабильности комплексов в присутствии сывороточных белков был выбран бычий сывороточный альбумин (БСА). Нами обнаружено, что свободные одноцепочечные ОН связываются альбумином, тогда

как двухцепочечная миРНК не взаимодействует с белком. На основании анализа полученных данных и литературных источников можно заключить, что наиболее вероятный характер взаимодействия альбумина и КНК заключается в образовании гидрофобных и водородных связей с белковой молекулой.

Взаимодействие катионных дендримеров с альбуминами за счет неспецифического электростатического связывания аминокислотных остатков дендримеров и анионных аминокислотных остатков на поверхности белковой глобулы ранее было показано в ряде работ [Samant et al., 2014; Zhang et al., 2014; Giri et al., 2011; Sekowski et al., 2011; Gabellieri et al., 2006; Shcharbin, 2003; Klajnert et al., 2002]. Стабильность изученных в данной работе комплексов оценена при помощи анализа сравнительных изменений степени поляризации флуоресценции дендриплексов на основе ОН и миРНК, меченых флуоресцеином, в отсутствие и в присутствии БСА в различных концентрациях. Показано, что дендриплексы, содержащие олигонуклеотиды АТ и GEM91, стабильны и не разрушаются под действием сывороточного альбумина.

На основе однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) установлено, что снижение значения поляризации флуоресценции дендриплексов на основе миРНК и карбосилановых дендримеров 1-ой и 2-ой генерации в присутствии БСА является статистически значимым при всех значениях исследованных концентраций. Данный факт свидетельствует о способности белка разрушать вышеуказанные комплексы. Таким образом, взаимодействие между дендримерами и миРНК в этих комплексах является слабым и недостаточным для защиты siP24 от влияния внешних факторов при физиологических условиях. Поскольку свободные siP24 не связываются с белком, происходит конкурентное замещение миРНК альбумином в результате связывания белка с дендримерами.

Полученные данные свидетельствуют о том, что дендримеры способны защищать олигонуклеотиды от связывания с сывороточным альбумином при физиологических условиях, однако карбосилановые дендримеры 1-ой и 2-ой генерации не предотвращают деградации дендриплексов в присутствии сывороточного альбумина.

Влияние дендримеров и дендриплексов на клетки крови

Как было показано выше, катионные дендримеры, благодаря своим концевым аминокислотам, хорошо связывают различные формы нуклеиновых кислот. Поскольку при терапии ВИЧ клетками-мишенями для дендримеров и дендриплексов являются Т-лимфоциты, то наиболее эффективным способом их введения *in vivo* является внутривенное введение. Однако, в этом случае помимо специфического взаимодействия дендримеров и дендриплексов с клетками-мишенями, будет наблюдаться их неспецифическое взаимодействие с другими компонентами и клетками кровотока. Невзирая на интенсивный рост фармакологического и биологического исследования применения дендримеров, именно их цитотоксичность, обусловленная поверхностными NH₂ группами,

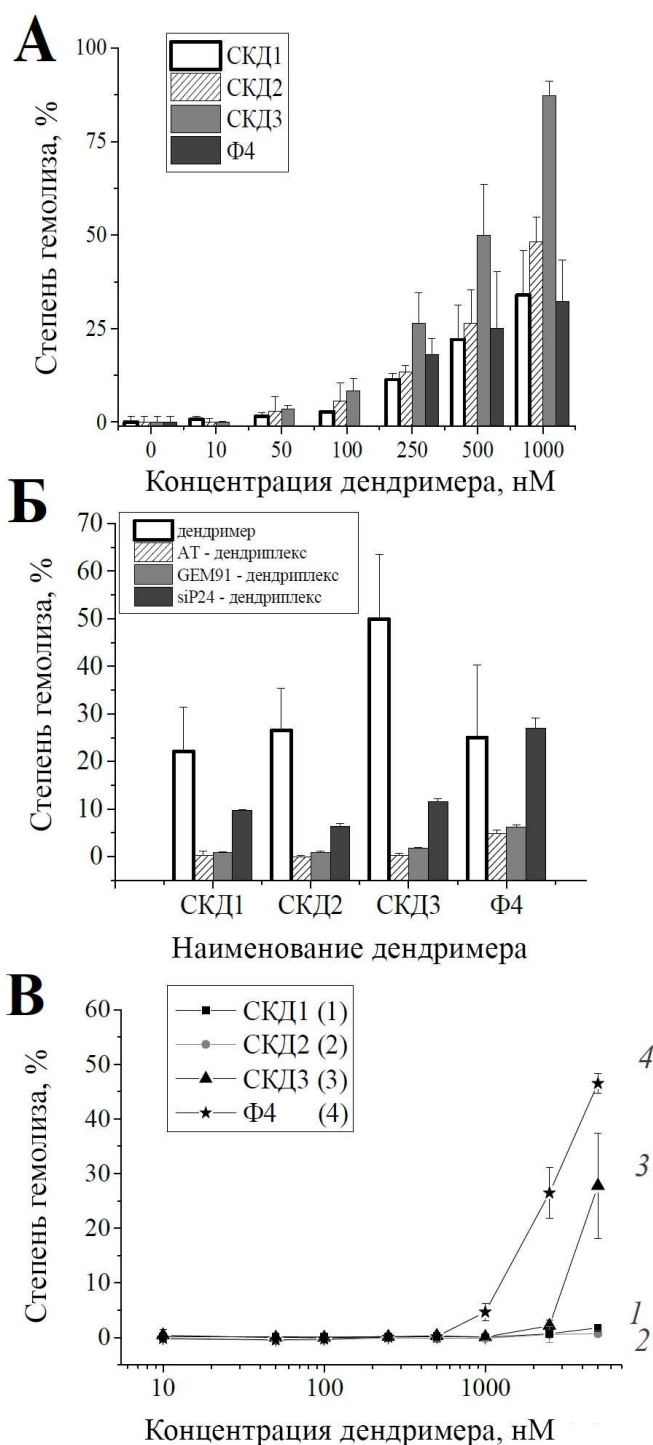


Рисунок 6. – Степень гемолиза изолированных эритроцитов после взаимодействия с дендримерами (А) и дендриплексами (Б), (В) – гемолиз под действием дендримеров в цельной крови

дендримеров (рисунок 6-Б). Это происходит за счет частичной нейтрализации катионных зарядов дендримеров.

Обнаружено, что в цельной крови гемолиз эритроцитов, индуцируемый дендримерами и дендриплексами, существенно ниже такового в суспензии

лимитирует возможность их использования *in vivo* [Zhao et al., 2004]. Согласно литературным источникам, цитотоксический эффект дендримеров *in vitro* различен для различных видов клеток [Shcharbin et al., 2010].

Таким образом, важным аспектом применимости дендримеров является анализ влияния как дендримеров, так и дендриплексов на клетки крови человека: эритроциты, мононуклеарные клетки периферической крови и тромбоциты.

Нами обнаружено, что дендримеры вызывают гемолиз изолированных эритроцитов. Степень гемолиза линейно возрастала от концентрации дендримеров в диапазоне концентраций 0-1 мкМ, а также увеличивалась с увеличением генерации дендримера (рисунок 6-А). Химическая структура дендримера также играет существенную роль: фосфорный дендример 4-ой генерации продемонстрировал аналогичную с карбосилановым дендримером 1-ой генерации гемотоксичность.

Нами показано, что формирование комплексов между дендримерами и КНК приводит к резкому снижению токсичности

отмытых эритроцитов (рисунок 6-В). Учитывая модельный характер эксперимента и введя корректировку гематокрита от 1 % до нормального значения 40-55 %, можно ожидать, что в цельной крови дендримеры могут приводить к гемолизу эритроцитов лишь в концентрациях, в десятки раз превышающих возможные фармакологические концентрации, дендриплексов ($40 \times 1,25 = 50$ мкМ).

Выживаемость МКПК при 72-х часовой инкубации также зависела от концентрации и генерации дендримеров. Установлено, что все дендримеры в концентрациях до 1 мкМ не влияют на параметры выживаемости МКПК (рисунок 7-А). Увеличение концентрации дендримеров в среде до 10 мкМ приводило к 100 % гибели клеток для всех изученных дендримеров. При концентрации дендримеров 10 мкМ формирование комплексов приводило к значительному снижению степени их цитотоксичности в случае карбосилановых дендримеров 1-ой, 2-ой и 3-ей генерации. В результате этого выживаемость клеток оказалась близка к значениям необработанных образцов (контроль) и составила более 85 %. Выживаемость МКПК при тех же условиях при добавлении свободных дендримеров не превышала 2 %.

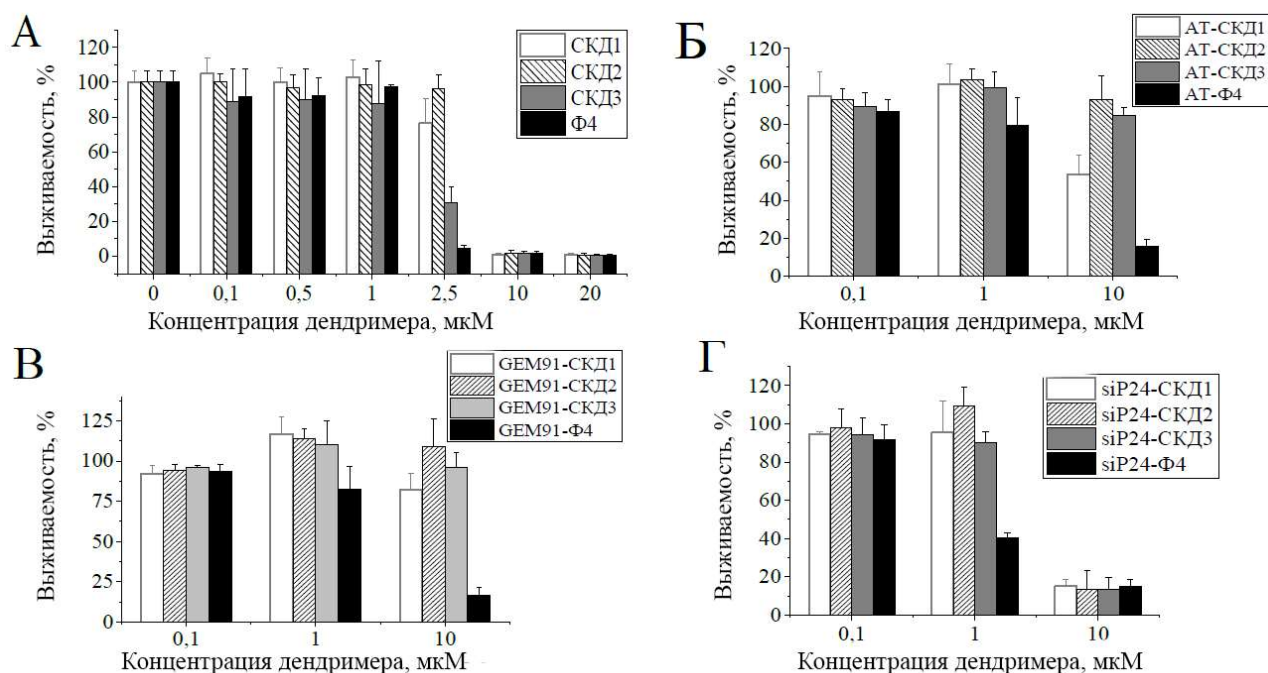


Рисунок 7. – Выживаемость МКПК под действием свободных дендримеров (А), а также в составе дендриплексов, содержащих АТ (Б), GEM91 (В) и siP24 (Г)

Возрастание выживаемости мононуклеарных клеток можно объяснить нейтрализацией катионных зарядов дендримеров отрицательно заряженными молекулами ОН. Однако, связывание дендримеров с миРНК не приводило к существенному снижению их цитотоксичности. Учитывая данные о нестабильности комплексов на протяжении 48 ч, причиной цитотоксичности

дендриплексов могут являться высвобожденные из комплексов дендримеры, о чем свидетельствуют данные о нестабильности комплексов с течением времени.

Знание о влиянии дендримеров и дендриплексов на тромбоциты человека является важным фактором оценки их гемосовместимости и потенциально возможного побочного влияния на организм человека *in vivo*. Нами изучено влияние дендримеров низких генераций, а также их комплексов, на процесс агрегации тромбоцитов.

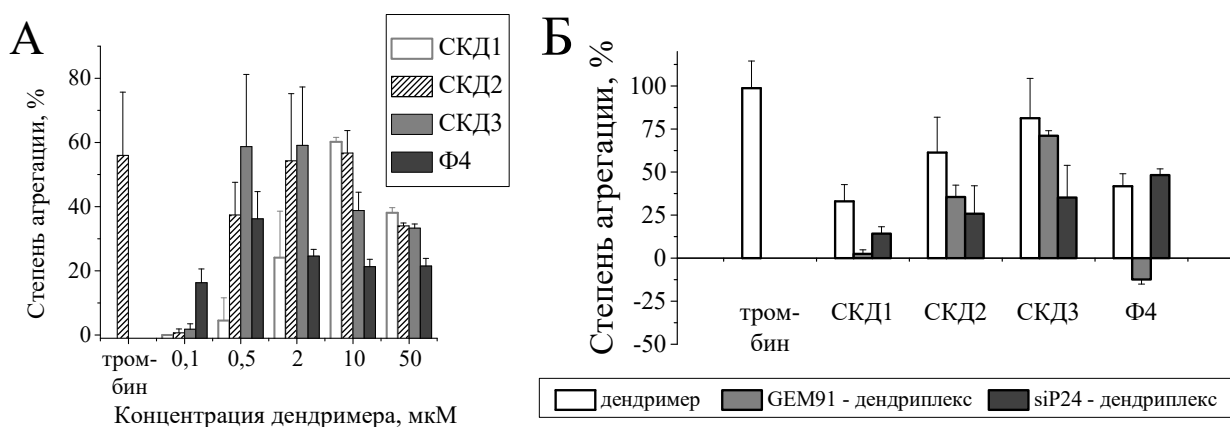


Рисунок 8. – Степень агрегации тромбоцитов после воздействия СКД-1, СКД-2, СКД-3 и Φ4 дендримеров (А) и их комплексов с GEM91 и siP24 (Б)

Обнаружено, что дендримеры инициируют агрегацию изолированных тромбоцитов (рисунок 8-А). Степень агрегации существенно зависела от генерации дендримера и от их концентрации. Фосфорный дендример 4-ой генерации был способен вызывать агрегацию даже при минимальных исследованных концентрациях – 100 нМ, что обусловлено его высокой плотностью поверхностного заряда. Снижение степени агрегации при возрастании концентрации дендримеров является результатом нарушения целостности клеточных мембран. Это приводит к повышению мутности клеточной суспензии – эффекту, противоположному агрегации – просветлению раствора.

Образование комплексов карбосилановыми дендримерами с КНК приводило к снижению степени (рисунок 8-Б) и скорости агрегации. Эффект действия фосфорного дендримера и его комплексов на тромбоциты существенно отличается от такового в случае карбосилановых дендримеров. Анализ литературных и экспериментальных данных позволил заключить, что комплексы Φ4-ОН не вызывают агрегацию тромбоцитов, тем не менее, вызывают у них структурно-морфологические изменения, приводящие к образованию псевдоподий. При этом, комплекс на основе того же фосфорного дендримера с двуцепочечной миРНК приводит к незначительному возрастанию степени агрегации.

В данных модельных исследованиях концентрация тромбоцитов в 500-1000 раз превышает нормальную концентрацию тромбоцитов в крови. Поскольку степень агрегации существенным образом зависит от концентрации клеток, можно заключить, что присутствие дендриплексов в концентрации 1 мкМ, вероятнее всего, не вызовет существенного эффекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Установлено, что взаимодействие между дендримерами и анти-ВИЧ ОН и миРНК приводит к формированию их комплексов [1]. Основным механизмом формирования комплексов – электростатическое взаимодействие между положительно заряженными дендримерами и отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами. Молярное соотношение «дендример:КНК», необходимое для полного связывания нуклеиновых кислот, зависит от типа и генерации дендримера, а также от вида КНК [3, 4, 7, 10, 14, 15, 16, 18].

2. Выявлено, что дзета-потенциал дендриплексов варьируется в пределах от -35 мВ до $+30$ мВ в зависимости от молярного соотношения КНК и дендримеров в составе комплексов. Дендриплексы с положительным дзета-потенциалом способствуют облегченному внутриклеточному транспорту комплексов по механизму адсорбционного эндоцитоза [1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 15, 16].

3. Показано, что гидродинамический диаметр всех дендриплексов варьируется в диапазоне 200-900 нм и зависит от молярного соотношения «дендример:КНК». Он также существенным образом зависит от дзета-потенциала и достигает максимальных значений при нейтральных значениях дзета-потенциала. Все комплексы имеют форму эллипсоидов, вне зависимости от входящих в состав КНК и дендримеров [3, 4, 7, 10, 14, 15, 16].

4. Установлено, что комплексы, образованные карбосилановыми дендримерами с ОН, оставались стабильными на протяжении 48 ч [3, 15, 17]. Однако, дендриплексы на основе миРНК и карбосилановых дендримеров разрушались в растворе полностью по истечении того же промежутка времени [4, 10].

5. Обнаружено, что свободные дендримеры связываются с альбумином. Альбумин не влияет на стабильность комплексов на основе карбосиланового дендримера 3-ей генерации и фосфорного дендримера 4-ой генерации. Показана дегградация комплексов карбосилановых дендримеров 1-ой и 2-ой генераций с миРНК в присутствии альбумина [3, 4, 6, 13], что свидетельствует о непригодности данных дендримеров для доставки нуклеиновых кислот.

6. Установлена зависимость гемотоксичности дендримеров от их концентрации, типа и генерации. С ростом концентрации и генерации дендримера их гемотоксичность возрастает. Фосфорный дендример проявляет менее выраженный цитотоксический эффект. Цитотоксическое воздействие дендримеров на клетки крови человека существенным образом снижается при образовании комплексов с ОН и миРНК. Основная причина данного эффекта – нейтрализация катионного поверхностного заряда дендримера в комплексе с КНК [3, 4, 5, 8, 9, 11, 12].

7. Обнаружено, что цитотоксичность дендримеров при длительной инкубации с моноклеарными клетками периферической крови существенно зависит от концентрации дендримера и незначительно зависит от его типа и генерации. В концентрациях менее 1 мкМ дендримеры были практически не цитотоксичны для клеток. Все исследованные комплексы, за исключением таковых на основе миРНК, являются не токсичными по отношению к моноклеарным клеткам периферической крови человека [3, 4, 5, 8, 9, 11, 12], что подтверждает пригодность исследованных дендримеров для доставки только одноцепочечных нуклеиновых кислот.

8. Обнаружено, что тромбоциты человека чувствительны к действию дендримеров и агрегируют при действии дендримеров в низких концентрациях (до 500 нМ). Формирование комплексов между дендримерами и ОН существенно снижает степень и скорость индуцированной ими агрегации изолированных тромбоцитов [5, 11].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Данная работа находится в рамках исследований, посвященных разработке новых путей лечения СПИДа на основе генетической терапии (ингибирование репликации вируса ВИЧ анти-ВИЧ ОН и миРНК). Полученные результаты будут использованы для дальнейших доклинических испытаний, а также для скрининга наиболее эффективных дендримеров трансфекции зараженных ВИЧ лимфоцитов.

Разработанные нами методы определения токсического действия дендримеров на эритроциты и флуоресцентного анализа комплексов дендримеров с нуклеиновыми кислотами внедрены в научный процесс НИЛ биоаналитических систем кафедры биофизики физического факультета БГУ (Акт внедрения от 17.10.2012).

Результаты исследований легли в основу разработки «Дендримеры и их применение в биологии и медицине», которая внедрена в учебный процесс кафедры биофизики физического факультета БГУ (Акт внедрения от 18.10.2011).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Главы в зарубежных монографиях

1. Dzmitruk, V. Dendrimers in Anti-HIV Therapy / V. Dzmitruk, D. Shcharbin, E. Pedziwiatr-Werbicka, M. Bryszewska // *Advances in Nanocomposite Technology / Advances in Nanocomposite Technology: Nanotechnology and Nanomaterials* / A. Hashim [et al.]; editor: A. Hashim. – InTech Publisher, 2011. – Chapter 16. – P. 361-374.
2. Shcharbin, D. Dendrimers in biology and medicine / D. Shcharbin, V. Dzmitruk, I. Halets, E. Pedziwiatr-Werbicka, M. Bryszewska // *Nanomedicine and Drug Delivery* / N. Sebastian [et al.]; editors: M. Sebastian, N. Ninan, A.K. Naghi. – Toronto, 2012. – Chapter 10. – P. 126-139.

Статьи в рецензируемых научных журналах

3. Shcharbin, D. Fourth generation phosphorus-containing dendrimers: prospective drug and gene delivery carrier / D. Shcharbin, A. Shakhbazau, N. Goncharova, I. Seviaryn, S. Kosmacheva, M. Potapnev, E. Pedziwiatr-Werbicka, M. Bryszewska, M. Talabaev, A. Chernov, V. Kulchitsky, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral // *Pharmaceutics*. – 2011. – V. 3, № 3. – P. 458-73.
4. Pedziwiatr-Werbicka, E. Novel 'Si-C' carbosilane dendrimers as carriers for anti-HIV nucleic acids: studies on complexation and interaction with blood cells / E. Pedziwiatr-Werbicka, E. Fuentes, V. Dzmitruk, J. Sanchez-Nieves, M. Sudas, E. Drozd, A. Shakhbazau, D. Shcharbin, F. J. de la Mata, R. Gomez-Ramirez, M. A. Munoz-Fernandez, M. Bryszewska // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2013. – V. 109. – P. 183-189.
5. Shcharbin, D. How to study Dendrimers and Dendriplexes III. Biodistribution, Pharmacokinetics and Toxicity *In vivo* / D. Shcharbin, A. Janaszewska, B. Klajnert-Maculewicz, B. Ziembra, V. Dzmitruk, I. Halets, S. Loznikova, N. Shcharbina, K. Milowska, M. Ionov, A. Shakhbazau, M. Bryszewska // *Journal of Controlled Release*. – 2014. – V. 181. – P. 40-52.
6. Дмитрук, О.Г. Агрегация тромбоцитов в присутствии катионных дендримеров и их комплексов с мРНК и ОДН и влияние альбуминов на данный процесс / О.Г. Дмитрук, Э. Вербицка-Пендзивятр, Д. Г. Щербин, Р. Гомез, Ф.-Х. де ла Мата, Ж.-П. Мажораль, С. Миньяни, М. Брышевска // *Новости медико-биологических наук*. – 2015. – Т. 12. – №4. – С.139-143

Статьи в сборниках материалов конференций

7. Dzmitruk, V. Cationic phosphorus-containing 4G dendrimer as a non-viral delivery system for anti-HIV-1 ODN / V. Dzmitruk, D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, M. Bryszewska, J.P. Majoral // «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем»: материалы междунар. науч. конф., Минск. 23—25 июня 2010 г. : в 2ч. / редкол.: Волотовский И. Д. [и др.]. – Минск, 2010. – Ч. 1. – С. 286-288.

8. Дмитрук, О. Анализ цитотоксичности (SI-C)-карбосилановых дендримеров и их комплексов / О. Дмитрук // «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» : материалы междунар. науч. конф. Минск. 19-21 июня 2012 г. : в 2ч. / редкол.: И.Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 2. – С. 274-277.
9. Дмитрук, О. Фосфорный дендример 4 поколения: влияние на клетки крови / О. Дмитрук, Д. Щербин, А. Шахбазов, Э. Пендзивятр-Вербицка, М. Брышевска, А.-М. Каминаде, Ж.-П. Мажораль // «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» : материалы междунар. науч. конф. Минск. 19-21 июня 2012 г. : в 2ч. / редкол.: Вологовский И. Д. [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 2. – С. 271-273.
10. Дмитрук, О. Взаимодействие (SI-C)-карбосилановых дендримеров с малыми противовирусными нуклеиновыми кислотами / О. Дмитрук, И. Галец, Д. Щербин, А. Шахбазов, Э. Пендзивятр-Вербицка, Р. Гомез, Ф. Кс. де ла Мата, М. Брышевска // "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем" : материалы междунар. науч. конф. Минск. 19-21 июня 2012 г. : в 2ч. / редкол. И.Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 2. – С. 268-270.
11. Dzmitruk, V. Dendrimers as carriers for antiviral gene therapy / V. Dzmitruk // "Фундаментальные науки – медицине" : материалы междунар. научн. конф., Минск, 17 мая 2013 г. : в 2ч. / редкол.: И. В. Залуцкий [и др.]. – Минск, 2013. – Ч. 2. – С. 216-220.
12. Dzmitruk, V. (SI-C)-carbosilane dendrimers as delivery system for anti-HIV-1 gene therapy / V. Dzmitruk, E. Pedziwiatr-Werbicka, R. Gomez-Ramirez, F. J. de la Mata, M. A. Muñoz-Fernández, M. Bryszewska // «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» : материалы междунар. науч. конф. Минск. 17-19 июня 2014 г. : в 2ч. / редкол.: Вологовский И. Д. [и др.]. – Минск, 2014. – Ч. 1. – С. 361-363.
13. Дмитрук, О.Г. Взаимодействие SI-C карбосилановых дендримеров с альбумином / О.Г. Дмитрук, J. de la Mata, R. Gomez-Ramirez, E. Pedziwiatr-Werbicka, M. Bryszewska, Д.Г. Щербин // «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» : материалы междунар. науч. конф. Минск. 17-19 июня 2014 г. : в 2ч. / редкол.: Вологовский И. Д. [и др.]. – Минск, 2014. – Ч. 2. – С. 248-250.

Тезисы докладов

14. Pedziwiatr-Werbicka, E. P4G and PPIG4 dendrimers as carriers for anti-HIV ODNs – characterization of dendriplexes / E. Pedziwiatr-Werbicka, M. Ferenc, V. Dzmitruk, D. Shcharbin, B. Klajnert, J.P. Majoral, M. Bryszewska // Therapeutic Nucleic Acids : book of abstracts of International Symposium , Lodz, Poland, 14-16 October 2010 / Editor: Nawrot B. – Lodz, 2010. – P. 86.
15. Dzmitruk, V. Cationic phosphorus-containing 4G dendrimer as a non-viral delivery system for anti-HIV-1 siRNA / V. Dzmitruk, D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, M. Bryszewska, J.-P. Majoral // "NANOBIOPHYSICS: fundamental and applied aspects" : book of abstracts of second international

- conference, 6-9 October 2011, Kiev, Ukraine / Editors: Karachevtsev V. [et al.]. – Kiev, 2011. – P. 102.
16. Pedziwiatr-Werbicka, E. Carbosilane dendrimers with Si-C bonds as a potential non-viral delivery system for anti-HIV 1 ODNs / E. Pedziwiatr-Werbicka, M. Bryszewska, V. Dzmitruk, I. Halets, D. Shcharbin, F. J. de la Mata, R. Gómez, A. Shakhbazau // 8th NanoBio-Europe conference : book of abstracts of international conference, Varese, Italy, 18-20 June 2012. – Varese, 2012. – P. 46.
17. Pedziwiatr-Werbicka, E. Characterization of dendriplexes formed by carbosilane dendrimers with Si-C bonds and anti- HIV siRNA / E. Pedziwiatr-Werbicka, V. Dzmitruk, I. Halets, D. Shcharbin, A. Shakhbazau, F. J. de la Mata, R. Gómez, M. Bryszewska // Biological Application of Dendrimers “Biodendrimer 2012” : book of abstracts of the 3rd International Symposium, Toledo, Spain, 5-8 September 2012. – Toledo, 2012. – P. 51.
18. Dzmitruk, V. Interactions between modified carbosilane dendrimers and anti-HIV-1 ODNs / V. Dzmitruk, E. Pedziwiatr-Werbicka, D. Shcharbin, F. J. de la Mata, R. Gómez, Maria Bryszewska // “Nowe trendy w toksykologii – nanocząstki i nanomateriały” : book of abstracts of International conference, Lodz, Poland, 28-30 May 2012. – Lodz, 2012. – P. 54.

РЭЗІЮМЭ

Дзмітрук Вольга Генадзьеўна

Фарміраванне і ўласцівасці дэндрыплексаў і іх узаемадзеянне з клеткамі крыві

Ключавыя словы: дэндрымер, міРНК, генетычная тэрапія, алігануклеатыд, дэндрыплекс, МКПК, трамбацыты, эрытрацыты, ВІЧ.

Мэта працы: высвятленне механізмаў фарміравання комплексаў паміж катыённымі дендрымерамі і супрацьвіруснымі кароткімі нуклеінавымі кіслотамі (КНК), а таксама даследаванне іх узаемадзеяння з клеткамі крыві чалавека (эрытрацытамі, лімфацытамі і трамбацытамі).

Аб'екты даследавання: фосфаразмяшчальны дэндрымер 4-ай генерацыі і стабільныя Si-C карбасіланавыя дэндрымеры 1-ай, 2-ой і 3-й генерацый, іх комплексы з алігануклеатадамі АТ / GEM91 і міРНК siP24; эрытрацыты, трамбацыты і монануклеарныя клеткі перыферычнай крыві чалавека.

Метады даследавання: флуарысцэнтны аналіз, кругавы дыхраізм, дынамічнае расейванне святла, электрафарэтычны фазавы аналіз расейнага святла (ξ -патэнцыял), атамна-сілавая мікраскапія, спектрафотаметрыя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: упершыню паказана здольнасць фосфарнага і Si-C карбасіланавых дэндрымераў утвараць комплексы з кароткаланцуговымі нуклеінавымі кіслотамі пасродкам самазбору. Выяўлены залежнасці гідрадынамічных памераў ад дзета-патэнцыялу дэндроплексаў. Устаноўлена, што даследаваныя дэндроплексы маюць форму эліпсоідаў і іх памеры знаходзяцца ў нанаразмерных маштабах (150-400 нм). Упершыню паказана адсутнасць залежнасці памераў і формы комплексаў ад генерацыі і хімічнай структуры дэндрымераў, якія іх утвараюць. Выяўлена, што стабільнасць дэндроплексаў ад часу інкубацыі і ў прысутнасці альбуміна вызначаецца як структурай КНК, так і тыпам дэндрымераў: карбасіланавыя дэндрымеры 1-ай і 2-ой генерацый не забяспечваюць дастатковай стабільнасці для пераносу міРНК. Усе даследаваныя дэндрымеры зніжаюць жыццяздольнасць клетак крыві. Упершыню паказана, што фарміраванне комплексаў з КНК істотна зніжае іх цытатаксічны ўплыў на эрытрацыты і монануклеарныя клеткі перыферычнай крыві чалавека, а таксама прыводзіць да значнага зніжэння ступені і хуткасці агрэгачыі трамбацытаў. Атрыманыя дадзеныя сведчаць аб патэнцыйнай магчымасці выкарыстання дэндрымераў для дастаўкі супрацьвіруснага генетычнага матэрыялу для генетычнай тэрапіі ВІЧ.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: метады аналізу комплексаўтварэння дэндрымераў з нуклеінавымі кіслотамі, а таксама вызначэння іх таксічнага ўплыву на эрытрацыты чалавека выкарыстоўваюцца ў навуковым працэсе кафедры біяфізікі фізічнага факультэта БДУ. Атрыманыя вынікі будуць выкарыстаны для скрынінга дэндрымераў для далейшых даследаванняў па трансфекцыі анты-ВІЧ алігануклеатадаў і міРНК ў лімфацыты, заражаныя ВІЧ.

Вобласць выкарыстання: біяфізіка, біялогія клеткі, нанатэхналогія, медыцына.

РЕЗЮМЕ

Дмитрук Ольга Геннадьевна

Формирование и свойства дендриплексов и их взаимодействие с клетками крови

Ключевые слова: дендример, миРНК, генетическая терапия, олигонуклеотид, дендриплекс, МКПК, тромбоциты, эритроциты, ВИЧ.

Цель работы: выяснение механизмов формирования комплексов между катионными дендримерами и противовирусными короткоцепочечными нуклеиновыми кислотами (КНК), а также исследование их взаимодействия с клетками крови человека (эритроцитами, лимфоцитами и тромбоцитами).

Объекты исследования: фосфоросодержащий дендример 4-ой генерации и стабильные Si-C карбосилановые дендримеры 1-ой, 2-ой и 3-ей генерации, их комплексы с олигонуклеотидами AT/GEM91 и миРНК siP24; эритроциты, тромбоциты и моноклеарные клетки периферической крови человека

Методы исследования: флуоресцентный анализ, круговой дихроизм, динамическое рассеяние света, электрофоретический фазовый анализ рассеянного света (ξ -потенциал), атомно-силовая микроскопия, спектрофотометрия.

Полученные результаты и их новизна: впервые показана способность фосфорных и Si-C карбосилановых дендримеров образовывать комплексы с короткоцепочечными нуклеиновыми кислотами посредством самосборки. Выявлены зависимости гидродинамических размеров от дзета-потенциала дендриплексов. Установлено, что исследованные дендриплексы имеют эллипсоидную форму и их размеры находятся в наноразмерных масштабах (150-400 нм). Впервые показана независимость размеров и формы комплексов от генерации и химической структуры образующих их дендримеров. Обнаружено, что стабильность дендриплексов от времени инкубации и в присутствии альбумина определяется как структурой КНК, так и типом дендримера: карбосилановые дендримеры 1-ой и 2-ой генераций не обеспечивают достаточной стабильности для переноса миРНК. Все исследованные дендримеры снижают жизнеспособность клеток крови. Впервые показано, что формирование комплексов с КНК существенно снижает их цитотоксическое действие на эритроциты и моноклеарные клетки периферической крови человека, а также приводит к значительному снижению степени и скорости агрегации тромбоцитов. Полученные данные свидетельствуют о потенциальной возможности применения дендримеров для доставки противовирусного генетического материала для генетической терапии ВИЧ.

Рекомендации по использованию: методы анализа комплексообразования дендримеров с нуклеиновыми кислотами, а также определения их токсического влияния на эритроциты человека используются в научном процессе кафедры биофизики физического факультета БГУ. Полученные результаты будут использованы для скрининга дендримеров для дальнейших исследований по трансфекции анти-ВИЧ ОН и миРНК в лимфоциты, зараженные ВИЧ.

Область применения: биофизика, клеточная биология, нанотехнологии, медицина.

SUMMARY

Volha Dzmitruk

Formation and properties of dendriplexes and their interaction with blood cells

Keywords: dendrimer, siRNA, gene therapy, oligonucleotide, dendriplex, PBMC, platelets, erythrocytes, HIV.

The aim of the work: to clarify the mechanisms of formation of complexes between cationic dendrimers and antiviral short nucleic acids (SNA), as well as the study of their interaction with human blood cells (erythrocytes, lymphocytes, and platelets).

The objects of research: phosphorus dendrimer of 4th generation and stable Si-C carbosilane dendrimers of the 1st, 2nd and 3rd generations, their complexes with oligonucleotides AT / GEM91 and siRNA siP24; erythrocytes, platelets and mononuclear cells of human peripheral blood.

Methods of research: fluorescent analysis, circular dichroism, dynamic light scattering, electrophoretic light scattering (ξ -potential), atomic force microscopy, spectrophotometry.

The results obtained and their novelty: for the first time the ability of phosphorous and stable Si-C carbosilane dendrimers to form complexes with short nucleic acid by self-assembly was shown. It was revealed that hydrodynamic size depends on zeta potential of dendriplexes. It is found that the dendriplexes have ellipsoidal shape and nanoscale size (150-400 nm). An independence of complexes' size and shape from the generation and chemical structure of forming dendrimer was first shown. It was found that the stability of the dendriplexes upon incubation time and in the presence of albumins is defined by the dendrimer and SNA structure: carbosilane dendrimers of the first and second generations do not provide enough stability for siRNA delivery. All studied dendrimers decreased the viability of blood cells. It was shown that the formation of complexes with SNA significantly reduces their cytotoxic effect on red blood cells and mononuclear cells of human peripheral blood, but also leads to significant reduction in the extent and rate of aggregation of platelets. Obtained results are background for the development of anti-HIV delivery system for HIV gene therapy.

Recommendation for practical use: methods of complex formation analysis of dendrimers with nucleic acids, as well as their toxic effects on human red blood cells are used in the scientific process of the Department of Biophysics, Physical Faculty of Belorussian State University. The results will be used for dendrimers screening to study transfection of the anti-HIV ON and siRNA into HIV infected cells.

Application areas: biophysics, cell biology, nanotechnology, medicine.

Подписано в печать 20.05.2016 Формат 60x84_{1/16} Бумага офсетная
Гарнитура Roman Печать цифровая Усл.печ.л. 1,3 Уч.изд.л. 1,4
Тираж 60 экз. Заказ № 2197

ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2
Тел. 284 18 66, 8 029 684 18 66

E-mail: pravo-v@tut.by; pravo642@gmail.com Отпечатано на издательской системе
KONICA MINOLTA в ИООО «Право и экономика»

Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185