

Исследование полиэтиленимина и анионных пептидов, как средств доставки плазмидной ДНК *in vitro* и *in vivo*

Научный руководитель – Киселев Антон Вячеславович

Панова Ю.С.¹, Штыкалова С.В.²

1 - Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: juliapan20037@gmail.com*; 2 - Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: sofia.shtykalova@gmail.com*

Генная терапия – направленное введение нового генетического материала (ДНК, РНК и производных) в клетки с терапевтическими целями. Существует две основные стратегии доставки генетических конструкций: методами на основе вирусных векторов и невирусной доставки. Вирусная доставка характеризуется высокой эффективностью, но высокой иммуногенностью, а также небольшой вместимостью векторов, невирусная – низкой иммуногенностью, относительной простотой химической модификации и высокой вместимостью переносимой ДНК-конструкции. Большинство невирусных систем доставки представлены катионными полимерами. Целью данного исследования является изучение тройных поли-электролитных комплексов ДНК с полэтиленимином (ПЭИ) и отрицательно заряженными пептидами Ебр, сRGD-Ебр, ЕбрН, Ебр0 как систем доставки генетических конструкций в клетки для целей генной терапии. Анионные глутамат-богатые пептиды были использованы в качестве экранирующего покрытия и различаются количеством остатков гистидина, введенных для увеличения эффективности выхода комплексов из эндосом, а также по наличию/отсутствию лиганда к интегрину $\alpha\nu\beta3$. В экспериментах на культуре клеток РАНС-1, содержащей большое число интегринов $\alpha\nu\beta3$ на поверхности, дополнительно был исследован анионный лиганд-модифицированный пептид сRGD-Ебр.

Были определены зарядовые соотношения ДНК/ПЭИ/анионный пептид, при которых достигается высокая эффективность трансфекции. Для анионного пептида с наименьшим количеством гистидина (Ебр0) эффективное зарядовое соотношение ДНК/ПЭИ/анионный пептид составило 1/16/2. В случае комплексов с анионами Ебр, сRGD-Ебр, ЕбрН эффективное соотношение составило 1/16/4. Также был проведен эксперимент по уменьшению конечного объема формирования комплексов, который не показал достоверных различий в эффективности трансфекции при уменьшении объема вводимого раствора. Уменьшение объема до 200 мкл без снижения вводимой дозы генетического материала (5 мкг плазмиды) позволило избежать значительного механического повреждения тканей при введении *in vivo*.

Эффективность трансфекции комплексами с плазмидой с геном *lacZ* оценивалась по активности бета-галактозидазы в гомогенизате *m.quadriceps*, в который осуществлялась внутримышечная инъекция, по сравнению с мышцей контралатеральной (контрольной) лапы. Во всех случаях наблюдались статистически значимые различия.

Оценка эффективности трансфекции комплексами с плазмидой с геном GFP проводилась путем анализа поперечных срезов мышц (толщина среза 5 мкм) на флуоресцентном микроскопе. Оценивали количество GFP-положительных фибрилл в обоих *m.quadriceps* мышцах. Наиболее значимые различия были показаны для комплексов Ебр0 и Ебр.

Таким образом, исследованные тройные комплексы продемонстрировали высокую эффективность в экспериментах по доставке маркерных генов в мышечную ткань *in vivo* и могут быть использованы для доставки терапевтических генных конструкций в будущем.