

## ДІЯ КОМПЛЕКСІВ ПОЛІМЕРНИХ НОСІЇВ З АНТИСЕНС-ОЛІГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДАМИ НА ГІСТОСТРУКТУРУ ПРИОНРЕПЛІКУВАЛЬНИХ ОРГАНІВ ЩУРІВ

Н. Ю. Сусол, Ю. В. Мартин, Н. В. Кузьміна, В. В. Влізло  
ua.nataliia@gmail.com

Інститут біології тварин НААН,  
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

*Полімерні матеріали (наноносії) забезпечують суттєві переваги стосовно спрямування, доставки та вивільнення лікарських речовин і відіграють роль одного з найважливіших інструментів в анти-сенс-терапії захворювань різноманітної етіології. Водночас проблемою для їх використання є токсичний вплив на організм тварин. Особливої актуальності набувають дослідження з розроблення ефективних носіїв нуклеотидів, які застосовуються для профілактики і лікування протейнопатій.*

*Вивчали транспортування та доставку олігодезоксинуклеотидів, з'єднаних з трьома новими полімерними носіями на основі диметиламіноетилметакрилату — МР-27, МР-2 та МР-3. Дослідження проводили на прикладі дії комплексів антисенс-олігодезоксинуклеотидів з полімерними наноносіями на клітинний пріон. Показано вплив комплексів на структуру пріонреплікувальних органів білих щурів (*Rattus norvegicus* var. *alba*, лінії Wistar).*

*Встановлено, що полімерні комплекси на основі МР-2 та МР-3 спричиняють незначні зміни мікроструктури мозку, тонкого кишечника та селезінки. Зокрема, на 7-му добу після ін'єкції в гістоструктурі головного мозку встановлено порушення проникності внутрішньомозкових капілярів та зменшення кількості нейронів в полі зору. У тонкому відділі кишечника встановлено руйнування ентероцитів, розтягнення серозної оболонки та збільшення пейєрових бляшок. На гістологічних препаратах селезінки виявлено збільшення розмірів поодиноких фолікулів.*

*Водночас дія носія МР-27 не викликає порушень у структурі тонкого кишечника, селезінки та головного мозку як окремо, так і в комплексі з антисенс-олігодезоксинуклеотидами. Отже, полімерний носій МР-27 на основі диметиламіноетилметакрилату може бути використаний для транспортування діючих речовин при конструюванні лікарських засобів.*

**Ключові слова:** ЩУРИ, ПРИОНРЕПЛІКУВАЛЬНІ ОРГАНИ, ГІСТОСТРУКТУРА, ПОЛІМЕРНІ НОСІЇ, АНТИСЕНС-ОЛІГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИ, КЛІТИННИЙ ПРИОН

## EFFECT OF NANOCARRIERS WITH ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES ON HISTOLOGICAL STRUCTURE OF ORGANS SYNTHESIZING PRION-PROTEIN

N. Yu. Susol, Yu. V. Martyn, N. V. Kuzmina, V. V. Vlizlo  
ua.nataliia@gmail.com

Institute of animal biology NAAS,  
38 V.Stus str., Lviv 79034, Ukraine

*Polymer compounds serves as a perspective carriers for medicinal preparations and engages antisense therapy against diseases with diverse etiology. However, the problem is in toxic effect of polymers on the animal organism. Of particular relevance acquire research on developing effective carriers of nucleotides, which could be used for prevention and treatment for disease of pathological protein synthesis.*

*We have been investigated the transportation and delivery of complexes of oligonucleotides with three newly polymer carriers based on dymethylaminoethylmethakrylate — МР-27, МР-2 and МР-3. The research was conducted by the example of action complexes polymer carriers with antisense oligonucleotides on cellular prion expressions. Nanocarriers influence on the structure of organs of white rats (*Rattus norvegicus* var. *alba*, Wistar line) was showed.*

*The complexes with polymers МР-2 and МР-3 caused the minor changes in the microstructure of the brain, small intestine and spleen. In particular, in histological structure of brain, reducing the number of neurons in sight was seen on the 7<sup>th</sup> day after injection. In the small intestine serous membrane sprawling and*

*Peyer plaques swelling have been detected. Histological preparations spleen revealed an increase in the size of individual follicles.*

*However, the effect of carrier MR-27 does not cause pathological changes in the structure of the small intestine, spleen and brain both separately and in combination with antisense oligonucleotides. So, polymeric carrier MY-27 can be used to transport of medicines.*

**Keywords:** RATS, BRAIN, SPLEEN, INTESTINE, POLIMERIC CARRIERS, ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES, CELLULAR PRION

## ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ С АНТИСЕНС-ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДАМИ НА ГИСТОСТРУКТУРУ ПРИОН-РЕПЛИЦИРУЮЩИХ ОРГАНОВ КРЫС

*Н. Ю. Сусол, Ю. В. Мартын, Н. В. Кузьмина, В. В. Влизло*  
ua.nataliia@gmail.com

Институт биологии животных НААН,  
ул. В. Стуса, 38, г. Львов, 79034, Украина

*Полимерные материалы (наноносители) играют роль одного из важнейших инструментов в антисенс-терапии заболеваний различной этиологии. В то же время проблемой для их использования является токсическое воздействие на организм животных. Особую актуальность приобретают исследования по разработке эффективных носителей нуклеотидов, применяемых для профилактики и лечения протейнопатий.*

*Изучали олигодезоксинуклеотиды, соединенные с тремя новыми полимерными носителями на основе диметиламиноэтилметакрилата — МР-27, МР-2 и МР-3. Исследования проводились на примере действия комплексов антисенс-олигодезоксинуклеотидов с полимерными наноносителями на клеточный прион. Показано влияние комплексов на структуру прионреплицирующих органов белых крыс (*Rattus norvegicus* var. *Alba*, линии *Wistar*).*

*Установлено, что полимерные комплексы на основе МР-2 и МР-3 вызывают незначительные изменения микроструктуры мозга, тонкого кишечника и селезенки. В частности, на 7-е сутки после инъекции в гистоструктуру головного мозга установлено нарушение проницаемости внутримозговых капилляров и уменьшение количества нейронов в поле зрения. В тонком отделе кишечника установлено разрушение энтероцитов, растяжение серозной оболочки и увеличение пейеровых бляшек. На гистологических препаратах селезенки обнаружено увеличение размеров отдельных фолликулов.*

*В то же время действие носителя МР-27 не вызывает нарушений в структуре тонкого кишечника, селезенки и головного мозга как отдельно, так и в комплексе с антисенс-олигодезоксинуклеотидами. Итак, полимерный носитель МР-27 на основе диметиламиноэтилметакрилата может быть использован для транспортировки действующих веществ при конструировании лекарственных препаратов.*

**Ключевые слова:** КРЫСЫ, ПРИОНРЕПЛИЦИРУЮЩИЕ ОРГАНЫ, ПОЛИМЕРНЫЕ НОСИТЕЛИ, АТИСЕНС-ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДЫ, КЛЕТОЧНЫЙ ПРИОН

Олігонуклеотиди є перспективним класом синтетичних препаратів. Такі сполуки можуть бути розроблені для будь-яких видів і послідовностей клітинної ДНК або іРНК. Вплив на експресію генів асОДН реалізують двома шляхами: стерично блокуючи процес зв'язування рибосом із мРНК та запускаючи механізм гідролізу мРНК за допомогою РНКаз Н. У результаті реалізації цих механізмів або їх синергічної дії утворення білкового продукту експресія гена не відбувається [1].

Антисенс-олігодезоксинуклеотиди (асОДН) і малі інтерферуючі РНК (міРНК) є найбільш широко використовуваними інгібіторами експресії генів [2]. Слід зазначити, що при застосуванні асОДН виникають певні труднощі внаслідок нестабільності та розщеплення їх у крові, а також низької проникності через клітинні мембрани [3]. Вони легко піддаються гідролізу РНКазами, що значно ускладнює їх застосування. Наявність двох ланцюгів збільшує імовірність розвитку не-



контрольованого процесу РНК інтерференції внаслідок часткової комплементарності міРНК та рецепторних РНК, тому підбір унікальних послідовностей, які не взаємодіють із жодною іншою мРНК, є досить складним завданням [4]. Ефективність застосування антисенс-олігонуклеотидів залежить від вибору носіїв для них. Для транспортування олігонуклеотидів, міРНК та генів застосовують ліпосоми, наночастинки, полімерні носії, нанокапсули, катіонні ліпіди [5]. Використання синтетичних агентів для контролю експресії генів сприяє вирішенню різних аспектів біологічних досліджень, і має дієвий вплив на лікування багатьох захворювань.

Сьогодні не існує засобів лікування та профілактики пріонних хвороб [6,7]. Зважаючи на те, що патогенез цих захворювань пов'язаний з синтезом клітинного пріона ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), припускається, що пригнічення експресії  $\text{PrP}^{\text{C}}$  в організмі запобігатиме розвитку трансмісивних губчастоподібних енцефалопатій. Інгібування експресії фізіологічного пріона за допомогою механізму РНК інтерференції зменшує прояв клінічних ознак пріонного захворювання у мишей, знижує ступінь депозитування патологічного пріона ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) та вакуолізації нервової тканини, чим продовжує тривалість життя інфікованих тварин. Крім того, відомо, що зменшення вмісту  $\text{PrP}^{\text{C}}$  у дорослих тварин не позначається негативно на їхньому здоров'ї [8, 9].

Мета роботи — встановити наявність токсичного впливу комплексів асОДН з полімерами МР-27, МР-2 та МР-3 на структуру головного мозку, тонкого відділу кишечника та селезінки білих щурів.

### Матеріали і методи

У дослідженнях використовували комплекси антисенс-олігонуклеотидів (асОДН) 5'-ССААГГТТССАТГАТ-3' для пригнічення експресії клітинного пріона та полімерних носіїв на основі диметиламіноетилметакрилату (DMAEM), а саме PEG-DMAEM-MР-27 (МР-27), PEG-DMAEM-MР-2 (МР-2), PEG-DMAEM-MР-3 (МР-3) [10].

Полімер МР-27 — це суміш поліетиленгліколю (ПЕГ) та полідиметиламіноетилмета-

крилату з кінцевим пероксидовмісним фрагментом. Полімер додатково очищений від іонів  $\text{Ce}^{4+}$  (Церій). У полімері МР-2 ПЕГ не входить як кінцевий фрагмент, а розміщений посередині між двома блоками DMAEMів. Полімер додатково очищений від іонів  $\text{Ce}^{4+}$ . Структура полімеру МР-3 аналогічна до структури МР-2, але він не був очищений від іонів Церію. Полімери розроблені в Національному університеті «Львівська політехніка» на кафедрі органічної хімії.

Приготування комплексів асОДН та поліDMAEM: 6,6 мг поліDMAEM розчиняли в 0,01 М HCl, рН 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.

Для проведення дослідів було сформовано чотири групи щурів *Rattus norvegicus* var. Alba, лінії Wistar: контрольна та три дослідні, по 10 тварин у кожній. Тваринам дослідних груп одноразово у хвостову вену вводили комплекси асОДН з полімерами у дозі 2 мг/кг маси тіла: I дослідній групі — асОДН з носієм МР-27, II групі — асОДН з МР-2 і III групі — асОДН з МР-3. Контрольній групі щурів вводили еквівалентні дози фізіологічного розчину.

Через 2 та 7 діб від початку експерименту тварин декапітували під легким хлороформним наркозом.

Для вивчення токсичного впливу комплексів асОДН з полімерними носіями МР-27, МР-3 та МР-2 на структуру пріонреплікувальних органів було проведено гістологічні дослідження селезінки, тонкого відділу кишечника та мозку білих щурів. Для досліджень вирізали шматочки тканин товщиною 0,2–0,5 см. Проби відбирали з середини клубової кишки, поперекового розрізу правої частини селезінки та великих півкуль в області плаща і поздовжньої щілини великого мозку. Матеріал фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, заливали у парафін, фарбували гематоксиліном та еозином [11].

Гістозрізи селезінки, тонкого відділу кишечника та головного мозку фотографували вмонтованою в мікроскоп відеокамерою

з фіксацією зображення програмним забезпеченням *Med. Cam*.

Досліди проводили з дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і Ухвали першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) [12].

### Результати й обговорення

Після введення контрольній групі фізіологічного розчину, а дослідним групам щурів — також комплексів полімерів МР-27, МР-2

та МР-3 з асОДН встановлено, що через дві доби відхилень у структурі тонкого кишечника, селезінки та головного мозку не виявлено.

Під час мікроскопічного дослідження тонкого кишечника (клубова кишка) на другу добу після введення кон'югатів встановлено, що слизова, підслизова, м'язова та серозна оболонки без структурних змін (*рис. 1а*). На гістозрізах видно, що слизова оболонка покрита ворсинками, пронизана вздовж гладкими м'язовими волокнами, зовні ворсинки покриті призматичним війчастим епітелієм. У підслизовій оболонці видно майснерівське сплетіння, дрібні кровоносні та лімфатичні судинки.

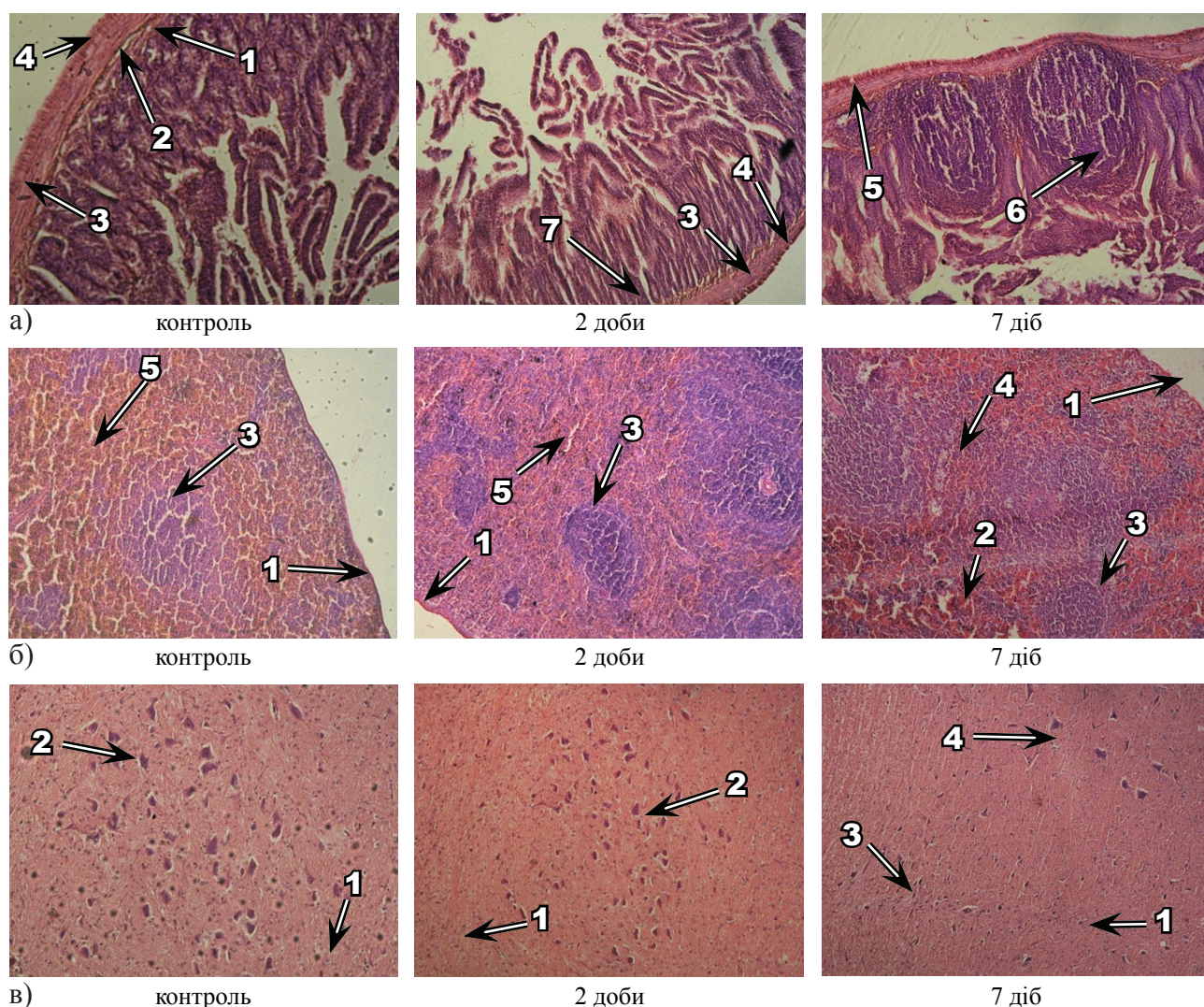


Рис. 1. Мікроструктура тонкого відділу кишечника, селезінки та мозку за введення олігонуклеотидів з полімерними носіями МР-3 (результати аналогічні МР-2, оскільки структура полімерів однакова)

Fig. 1. Microstructure small intestine, spleen, and brain after injections oligonucleotides with polymeric carriers MP-3

Примітки: а) — кишечник: 1 — слизова оболонка, 2 — підслизова оболонка, 3 — м'язова оболонка, 4 — серозна оболонка, 5 — розтягнення серозної оболонки, 6 — збільшення пейєрових бляшок, 7 — Ліберкюнові залози; б) — селезінка: 1 — капсула, 2 — трабекули, 3 — біла пульпа, 4 — мієлопоетична активність, 5 — червона пульпа; в) — мозок: 1 — нейроглія, 2 — нейрони, 3 — нервові волокна, 4 — зменшення кількості нейронів. Гематоксилін-еозин  $\times 100$



М'язова оболонка побудована з двох шарів: внутрішнього кругового, та зовнішнього поперечного, між шарами добре видно дрібні кровоносні судини. Серозна оболонка побудована зі сполучної тканини і мезотелію.

На другу добу після введення усіх комплексів встановлено, що селезінка щурів була витягнутої форми та м'якої консистенції, зовні вкрита капсулою, від якої відходять трабекули. Основу її складає червона пульпа, а лімфатичні вузлики формують білу пульпу. Проглядаються окремі кровоносні судини (рис. 1б).

Під час мікроскопічного дослідження гістозрізів тканин мозку на другу добу після

введення комплексів патологічних змін не встановлено. Проглядали нервові волокна, нейрони, кровоносні судини (рис. 1в).

Через 7 днів після введення МР-2 та МР-3 було встановлено деякі відхилення у тонкому відділі кишечника. Зокрема, спостерігалось руйнування клітин в гладких м'язах. Ентероцити в поодиноких криптах були зруйновані і перебували в стані зернової дистрофії. Серозна оболонка дещо рихла, місцями розтягнута. Відмічено збільшення пейєрових бляшок (рис. 1а).

При дослідженні селезінки виявлено, що на 7-му добу за введення комплексів асОДН

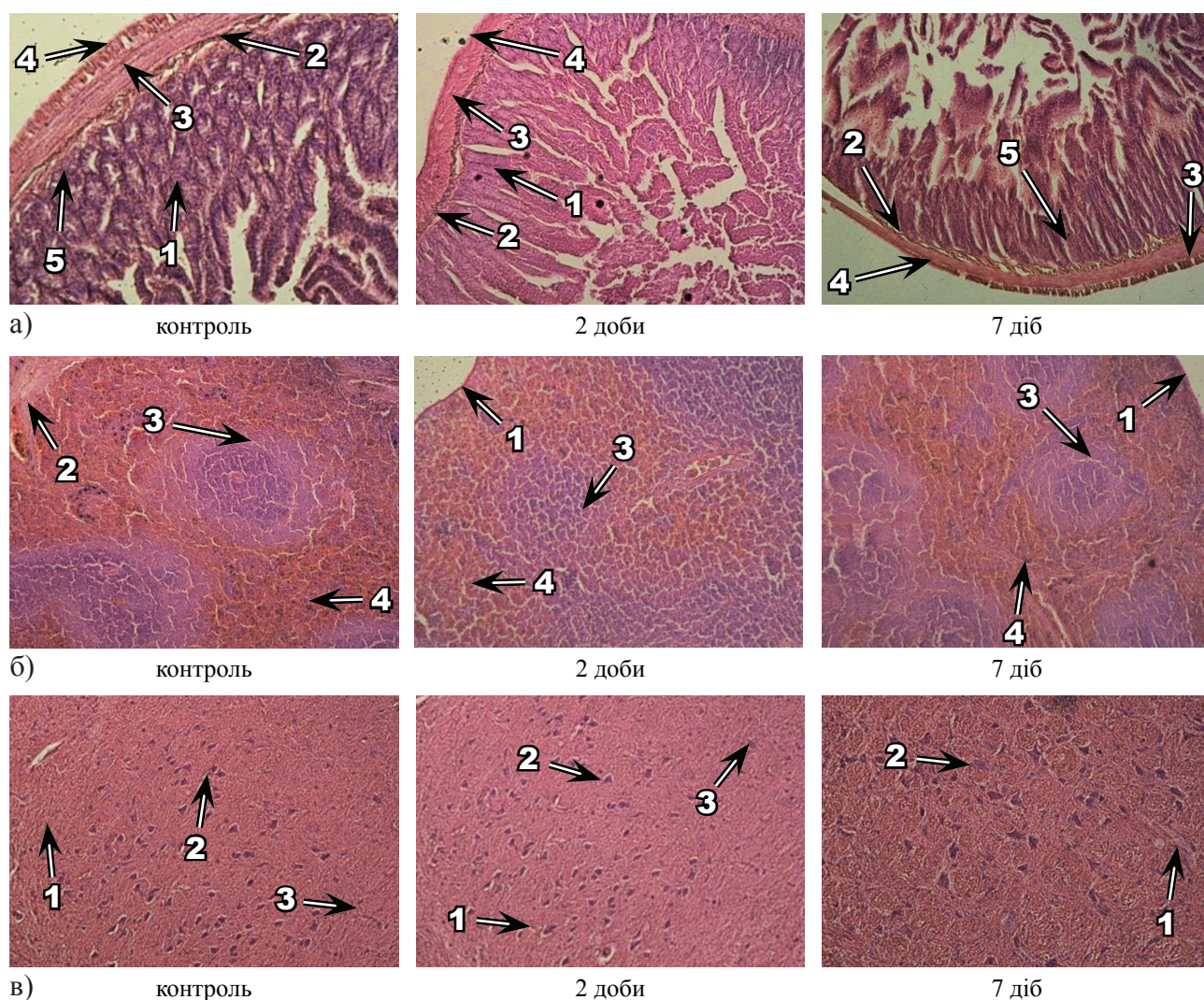


Рис. 2. Мікроструктура тонкого відділу кишечника, селезінки та мозку при введенні олігодезоксинуклеотидів з полімерними носіями МР-27

Fig. 2. Microstructure small intestine, spleen, and brain after injections oligonucleotides with polymeric carriers MP-27

Примітки: а) — кишечник: 1 — слизова оболонка, 2 — підслизова оболонка, 3 — м'язова оболонка, 4 — серозна оболонка, 5 — Ліберкюнові залози;  
б) — селезінка: 1 — капсула, 2 — трабекули, 3 — біла пульпа, 4 — червона пульпа;  
в) — мозок: 1 — нейроглія, 2 — нейрони, 3 — нервові волокна. Гематоксилін-еозин  $\times 100$ .

з полімерами МР-2 та МР-3 капсула і трабекули ставали тонкими, трабекулярні вени і артерії диференціювали слабо. Біла пульпа розвинута слабо, відмічено збільшення поодиноких фолікулів (рис. 1б).

Водночас комплекси у мозку спричиняли зменшення кількості нейронів в області прилягання мозочка на 7-му добу досліджень (рис. 1в). Капіляри та вени були розширені, окремі — переповнені кров'ю. Стінки судин дещо звужені. Ядра нейронів в обох групах розміщувались центрально або ексцентрично, мали різну форму та конфігурацію. Цитоплазма нейронів однорідна, в деяких інтенсивно забарвлена.

При введенні асОДН з носієм МР-27 на 7-му добу після ін'єкції патологічних змін у структурі селезінки, кишечнику та мозку не було виявлено (рис. 2).

## Висновки

1. Введення шурам внутрішньовенно комплексів полімерів МР-27, МР-2 та МР-3 з асОДН протягом двох діб не викликає змін у структурі пріонреплікувальних органів (тонкий кишечник, селезінка, головний мозок).

2. На 7-му добу після ін'єкції полімерів МР 2 та МР 3 з асОДН виявлено незначні зміни в гістоструктурі головного мозку (зменшення кількості нейронів), у тонкому відділі кишечнику (руйнування ентероцитів, розтягнення серозної оболонки та збільшення пейєрових бляшок) і селезінки (збільшення розмірів поодиноких фолікулів, стоншення капсули і трабекули, трабекулярні вени і артерії диференціюються слабо).

3. Комплекси асОДН з носієм МР-27 на 7-му добу після введення в організм не викликали змін в пріонреплікувальних органах шурів.

## Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати досліджень будуть корисні у розробці профілактичних заходів та методичних підходів до лікування протеїнопатій та нейродегенеративних захворювань, зокрема пріонних інфекцій.

1. Schlachetzki F., Boado J. Gene therapy of the brain: the trans-vascular approach. *Neurology*, 2004, Vol. 62, no. 8, pp. 75–81.

2. Yamamoto T., Nakatani M., Narukawa K. Antisense drug discovery and development. *Future Med. Chem.*, 2011, Vol. 3, pp. 59–65.

3. Vlizlo V. V., Stadnyk V. V., Mayor Ch. Ya., Verbitsky P. I. Physiological prion and its role in the functioning of the cell. *The Animal Biology*, 2008, vol. 10, no. 1–2, pp. 9–23. (in Ukrainian)

4. Trevitt C., Collinge J. A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain*, 2006, no. 129, pp. 2241–2265.

5. White M. D. Therapy for prion diseases: Insights from the use of RNA interference. *Prion*, 2009, Vol. 3, no. 3, pp. 121–128.

6. Verbitsky P. I. Spongiform encephalopathy in cattle and other prion infections. Kyiv, Vetinorm, 2005, 240 p. (in Ukrainian)

7. Pardridge W., Miller F., Weiss N. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2009, Vol. 1788, no. 4, pp. 842–857.

8. Mironov A. Jr., Latawiec D., Wille H. Cytosolic prion protein in neurons. *Neuroscience*, 2003, Vol. 23, pp. 1183–1193.

9. Mabbott N. A., Bruce M. E. Prion pathogenesis and secondary lymphoid organs. *Prion*, 2012, Vol. 1, no. 6, pp. 322–333.

10. Chen L. N., Zhang B. Y. Proteomic Analyses for the Global S-Nitrosylated Proteins in the Brain Tissues of Different Human Prion Diseases. *Prion*, 2015, vol. 11, no. 1–2, pp. 15–23.

11. Kushkevych M. V., Vlizlo V. V. Localization and level of the cellular prion in the jejunum of the rats Wistar line of different age groups. *Biological systems*, 2013, Vol. 3, pp. 325–329.

12. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and scientific purposes. Strasbourg, Council of Europe, 1986, pp. 52–53.