

Количество модифицированного протамина определяли методом абсорбционной спектроскопии (по методике определения концентрации двух веществ в растворе), пренебрегая гипохромным эффектом. Полученные значения концентраций ($C_{pr} = 3,29 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{cor} = 2,95 \cdot 10^{-4}$ М) свидетельствуют о выходе модифицированного белка, равном 89,6%. По нашим представлениям, такой выход реакции вполне удовлетворителен.

В качестве модельных плазмид нами использовались плазмиды pEGFP-C3 и pCMV-LacZhis, несущие соответственно маркерный ген белка EGFP, обладающего зеленой флуоресценцией в УФ, и ген фермента β -галактозидазы, обладающего сигналом ядерной локализации (NLS); экспрессия этих генов в эукариотических клетках обеспечивается наличием цитомегаловирусного промотора. Для изучения способности носителя связывать ДНК электрофоретически определяли количество конъюгата, полностью связывающее 1 мкг плазмиды; данное соотношение принималось как оптимальное для трансфекции. опыты проводили, формируя комплексы в различных растворах (PBS, 0.15 М NaCl, вода, 1 М NaCl) для определения влияния ионного состава и ионной силы раствора на связывание ДНК носителем.

Оптимальное соотношение ДНК / носитель было одинаковым для PBS, 0.15 М NaCl и воды и составило 1 / 0.6 по массе. Для 1 М NaCl оптимальное соотношение составило 1 / 4,0, что говорит о более слабом связывании ДНК носителем.

Изучение размера комплексов проводили путем формирования комплексов с предварительно окрашенной бромистым этидием плазмидной ДНК и последующего наблюдения смеси на люминесцентном микроскопе. Было выяснено, что в PBS и 0, 15 М NaCl при соотношении ДНК / носитель 1:0,6 комплексы образуют крупные агрегаты различной величины; размер самых крупных агрегатов измеряется сотнями нм. На основе полученных в данном опыте результатов можно предположить, что уровень трансфекции при использовании комплексов, сформированных в изотонических средах, будет мал вследствие образования агрегатов значительной величины. Однако данные предположения нуждались в экспериментальном подтверждении, и дальнейшая работа в соответствии со стандартным подходом в тестировании трансфецирующих агентов проводилась с использованием PBS и 0,15 М NaCl.

Выяснение способности конъюгата защищать ДНК от действия нуклеаз проводили с помощью метода «защиты от ДНКазы 1». В случае формирования комплексов в PBS и 0,15 М NaCl при соотношении плазмиды и конъюгата 1:0,8 осуществляется полная защита ДНК от действия нуклеазы; при соотношении 1:0,6 защищена значительная часть ДНК; при соотношении 1:0,2 плазида полностью деградирует.

При проведении трансфекции *in vivo* в качестве лабораторных животных были и использованы самцы мышей; количество вводимой каждому животному плазмиды составляло 25-50 мкг. Всего было использовано 49 животных. Комплексы для введения животным формировали в 0.15 М NaCl, соотношение плазида/носитель составляло 1/0.6. Для выявления белка GFP в тканях животных использовали метод флуоресцентной микроскопии и иммуноэлектрофоретические методы; для выявления β -галактозидазной активности – окраску с X-Gal. Маркерных белков в тканях животных не обнаружено.

Итак, нами разработан метод модификации протамина гемисукцинатом кортизола; получен препарат, содержащий 89% модифицированного белка. Показано, что полученный конъюгат способен эффективно связывать ДНК; оптимальное для трансфекции соотношение ДНК/носитель составило 1/0,6 по массе. Показано, что конъюгат способен защищать ДНК от действия нуклеаз при соотношении ДНК/носитель 1/0,6 – 1/0,8 по массе. Показана зависимость величины комплексов от ионного состава раствора и соотношения ДНК/носитель; в изотонических средах размеры комплексов составляют несколько сотен нм. Проведены опыты по трансфекции *in vivo*; экспрессии маркерных генов в тканях животных не выявлено.

Основным направлением дальнейшей работы, по-видимому, станет оптимизация условий формирования комплексов, при которых будут образовываться агрегаты малой величины, так как

мы полагаем, что именно большие размеры комплексов не позволяют им проникать в клетки путем РЭ.