



УДК 577.113.6:546.824-31+578.825.1:578.282

НЕАГЛОМЕРИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-СОДЕРЖАЩИЕ НАНОКОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА

© 2024 г. М. Н. Репкова*, О. Ю. Мазурков**, Е. И. Филиппова**, Н. А. Мазуркова**, Ю. Е. Полетаева*, Е. И. Рябчикова*, В. Ф. Зарытова*, А. С. Левина*.[#]

* Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

** ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор",
Россия, 630559 Новосибирская обл., р.п. Кольцово

Поступила в редакцию 05.04.2024 г.

После доработки 13.04.2024 г.

Принята к публикации 14.04.2024 г.

Стабильность и монодисперсность – важные характеристики наночастиц и наноконпозитов, обеспечивающие надежность их применения в биологических системах и воспроизводимость результатов. Целью данной работы было получение неагломерированных олигонуклеотид-содержащих наноконпозитов на основе наночастиц диоксида титана в форме анатаза (Ans~ODN). При иммобилизации олигонуклеотидов на наночастицах в воде образуются монодисперсные частицы небольшого размера, в то время как в присутствии NaCl происходит агрегация наночастиц и наноконпозитов. Сравнение биологической активности наноконпозитов, полученных в воде и солевом растворе, проведено на примере ингибирования репликации вируса простого герпеса первого типа в культуре клеток VERO. Исследованный наноконпозит подавлял репликацию вируса на 4.5 порядка независимо от способа приготовления (в воде или в 0.9% NaCl), если он был использован через сутки после получения. Через 10 суток хранения активность образца, приготовленного в солевом растворе, была на два порядка ниже, чем у сохранившего свою активность образца, приготовленного в воде. Таким образом, показано, что в отличие от наноконпозитов, приготовленных в присутствии соли и теряющих свою эффективность при хранении, наноконпозиты, не склонные к агрегации, могут быть получены в воде и храниться в течение длительного времени для будущего использования.

Ключевые слова: наночастицы анатаза, олигонуклеотид-содержащие наноконпозиты, противовирусная активность, вирус простого герпеса

DOI: 10.31857/S0132342324060128, EDN: NDZVCX

ВВЕДЕНИЕ

Фрагменты нуклеиновых кислот (НК) и их аналоги рассматриваются как перспективные агенты для избирательного воздействия на внутриклеточный генетический материал. Для широкого использования в терапии необходимы эффективные методы доставки препаратов на основе нуклеиновых кислот. Известно, что олигонуклеотиды (ODN, фрагменты НК) обладают

очень низкой эффективностью проникновения, в первую очередь из-за гидрофобной природы плазматической мембраны клеток. Преодоление этого барьера позволит использовать препараты НК при лечении различных заболеваний, связанных с появлением в организме чужеродных или поврежденных нуклеиновых кислот. Для создания эффективных систем доставки фрагментов нуклеиновых кислот применяют различные методы, например, включение в

Сокращения: ВПГ – вирус простого герпеса; ДСР – динамическое светорассеяние; ИПП – индекс подавления продукции вируса; НК – нуклеиновые кислоты; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; Ans – наночастицы диоксида титана в форме анатаза; ODN – олигодезоксирибонуклеотид; PL – полилизин; Ans/PL-ODN и Ans/PL•ODN – олигонуклеотид-содержащие наноконпозиты на основе наночастиц анатаза соответственно с ковалентной или ионной связью между PL и ODN; Ans~ODN – Ans/PL-ODN или Ans/PL•ODN; pdi – индекс полидисперсности.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (913) 756-76-93; эл. почта: asl1032@yandex.ru).

липосомы, конъюгацию с полимерами различной природы и т.д. [1]. Стремительно развивающаяся нанобиотехнология внесла свой вклад в решение проблемы доставки НК с использованием широкого спектра наночастиц [2–4]. Одно из преимуществ использования для доставки НК-фрагментов наночастиц – их способность защищать НК от действия внутриклеточных нуклеаз [2, 3].

Наночастицы диоксида титана привлекают внимание как потенциальные носители фрагментов НК благодаря способности проникать через плазматическую мембрану, стабильности и возможности модификации поверхности для иммобилизации различных соединений [5–8]. Показано, что TiO_2 -наночастицы защищают иммобилизованные на них олигонуклеотиды от деградации в клеточной среде [9–10].

Известно, что наночастицы, в частности наночастицы диоксида титана, имеют склонность к агрегации [11–14], что ограничивает их применение в биологических системах. Стабильность и монодисперсность – важные характеристики наночастиц и наноконпозитов, которые обеспечивают надежность их применения *in vitro* или *in vivo* и воспроизводимость результатов.

Целью данной работы было получение неагломерированных олигонуклеотид-содержащих наноконпозитов на основе наночастиц диоксида титана в форме анатаза (Ans~ODN) для воздействия на внутриклеточные нуклеиновые кислоты-мишени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение наноконпозитов Ans~ODN. ODN-содержащие наноконпозиты на основе наночастиц диоксида титана в кристаллической форме анатаза готовили двумя способами [15, 16]: 1) наноконпозит Ans/PL•ODN с ионной связью между ODN и PL (полилизин) синтезировали путем иммобилизации ODN на наночастицах,

предварительно связанных с PL; 2) наноконпозит Ans/PL-ODN с ковалентной связью между PL и ODN получали при иммобилизации на наночастицах анатаза предварительно синтезированного конъюгата PL-ODN.

Ранее наноконпозиты Ans/PL•ODN и Ans/PL-ODN готовили в солевых растворах (0.9% NaCl). Полученные таким образом наноконпозиты проявляли высокую противовирусную активность в отношении разных субтипов вируса гриппа A *in vitro* [17–19] и *in vivo* [9, 20] и эффективно корректировали гипертензию на модели крыс НИСАГ (крыс с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией) [21].

Влияние NaCl на агрегацию наночастиц и наноконпозитов. Для характеристики наночастиц анатаза и наноконпозитов на их основе использовали метод динамического светорассеяния (ДСР), который позволяет оценить размер и поверхностный заряд наночастиц. На первом этапе мы показали влияние NaCl на агрегацию наночастиц и наноконпозитов (табл. 1). Размер наноконпозитов Ans/PL•ODN, образованных после электростатического присоединения ODN к наночастицам, предварительно покрытым полилизин, незначительно отличается от размера наноконпозитов Ans/PL-ODN с ковалентной связью между PL и ODN, поэтому в табл. 1 и 2 приведены усредненные значения для обоих типов наноконпозитов, обозначенных как Ans~ODN.

Состояние наночастиц Ans зависит от концентрации соли, и уже при 0.02 М NaCl частицы образуют скопления размером до микрометров. Наличие на наночастицах иммобилизованных PL и ODN предотвращает их агрегацию до концентрации NaCl 0.05 М. При увеличении концентрации NaCl в смеси появляются частицы разного размера, т.е. образец становится более гетерогенным, что отражается на увеличении индекса гетерогенности или полидисперсности

Таблица 1. Гидродинамический диаметр (d) и величина индекса полидисперсности (pdi) исследованных образцов в зависимости от концентрации NaCl

Образец	Параметр	Концентрация NaCl, М					
		0	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2
Ans	d, нм	22.2 ± 9.2	73.1 ± 16.8	2087 ± 164	2534 ± 405	3360 ± 904	–
	pdi	0.237 ± 0.009	0.609 ± 0.042	0.409 ± 0.036	0.439 ± 0.091	0.449 ± 0.055	–
Ans/PL	d, нм	27.5 ± 1.8	27.2 ± 1.4	28.4 ± 1.0	50.9 ± 15.4	110 ± 43.3	2229 ± 569
	pdi	0.250 ± 0.004	0.313 ± 0.009	0.319 ± 0.010	0.348 ± 0.030	0.530 ± 0.038	0.338 ± 0.058
Ans~ODN ₁	d, нм	28.0 ± 3.8	32.7 ± 2.6	34.5 ± 7.9	33.3 ± 7.9	827 ± 193	2625 ± 265
	pdi	0.286 ± 0.041	0.353 ± 0.012	0.388 ± 0.001	0.395 ± 0.001	0.319 ± 0.098	0.295 ± 0.035

Примечание: поскольку значения показателей для наноконпозитов Ans/PL•ODN и Ans/PL-ODN с ионной или с ковалентной связью между PL и ODN незначительно отличаются, в таблице приведены усредненные значения для обоих типов наноконпозитов, обозначенных как Ans~ODN.

Таблица 2. Гидродинамический диаметр (d) и ξ -потенциал исследованных образцов в воде

№	Образец	d, нм	pdi	ξ -потенциал, мВ
1	Ans	21.1 ± 2.5	0.371 ± 0.017	-30.6 ± 0.5
2	Ans/PL	28.6 ± 2.0	0.239 ± 0.012	53.2 ± 0.2
3	Ans~ODN ₁ (21-мер)	32.8 ± 0.6	0.282 ± 0.065	30.4 ± 0.2
4	Ans~ODN ₂ (33-мер)	37.4 ± 10.0	0.257 ± 0.062	11.4 ± 0.6
5	PL-ODN ₁ (21-мер)	70.0 ± 2.6	0.166 ± 0.018	57.6 ± 0.9
6	PL-ODN ₂ (33-мер)	75.2 ± 10.5	0.208 ± 0.017	–

(pdi) (табл. 1; данные для нанокompозита с участием ODN₁ приведены в качестве примера). Индекс полидисперсности (pdi) отражает возможное присутствие агрегатов. Значение pdi для монодисперсных образцов не должно превышать 0.5 [22]. Принимая во внимание значения pdi и размер частиц, образец Ans удовлетворяет критериям качества только в отсутствие NaCl. Подобное влияние NaCl на агрегацию наночастиц анатаза отмечено в работе [23]. Образцы Ans/PL и Ans~ODN₁ удовлетворяют критериям качества в диапазоне концентраций NaCl 0–0.05 М.

При получении нанокompозитов Ans/PL•ODN и Ans/PL-ODN в 0.9% растворе NaCl образуются агрегаты наночастиц с размерами до микрометров. Мы попытались решить проблему агрегации путем иммобилизации конъюгатов PL-ODN на наночастицах Ans или ODN на Ans/PL в водных растворах. При этом следовало показать возможность иммобилизации олигонуклеотидов на наночастицах, т.е. формирования нанокompозитов, в отсутствие NaCl.

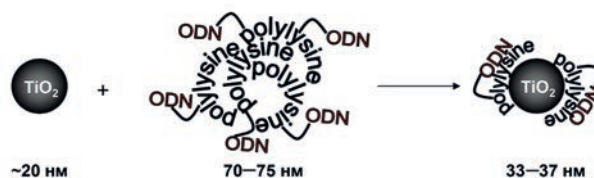
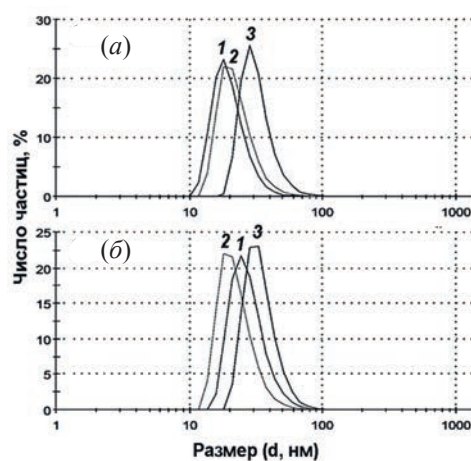
Оценка размера и ξ -потенциала наночастиц и нанокompозитов. Иммобилизацию олигонуклеотидов в воде на наночастицах Ans исследовали методом ДСР. Были измерены гидродинамические диаметры (d) исходных наночастиц Ans, конъюгатов PL-ODN и нанокompозитов после иммобилизации PL-ODN на Ans или ODN на Ans/PL (табл. 2). Гидродинамический диаметр исходных наночастиц в воде составлял ~20 нм. После связывания с PL размер наночастиц увеличивался до 28.6 нм, а после связывания с конъюгатом PL-ODN – до 32.8 и 37.4 нм, в зависимости от длины олигонуклеотида (табл. 2).

Интересно отметить, что размер нанокompозитов Ans/PL-ODN меньше, чем размер конъюгатов PL-ODN (рис. 1), что может быть обусловлено преобразованием рыхлой структуры конгломератов PL-ODN в более компактную при “обволакивании” наночастицы.

Значения pdi в табл. 2 для наночастиц анатаза и нанокompозитов на их основе свидетельствуют об относительной монодисперсности образцов. По данным ДСР полученные результаты удов-

летворяют критериям качества для каждого образца (Results meet quality criteria according to size quality report).

Мы проверили, насколько стабильны частицы Ans и нанокompозиты на их основе при длительном хранении в воде при 4°C. На рис. 2 приведены данные для Ans, Ans/PL и Ans/PL-ODN. Размер наночастиц Ans несколько увеличился через три месяца с ~20 до ~28 нм, т.е. эти наночастицы имеют тенденцию к агрегации, однако в значительно меньшей степени по сравнению с таковой в солевых растворах (табл. 1). В отличие от наночастиц Ans, нанокompозиты Ans/PL и Ans/PL-ODN за этот период не изменили свой гидродинамический диаметр и дисперсность, вероятно, из-за того, что

**Рис. 1.** Схема образования нанокompозитов Ans/PL-ODN.**Рис. 2.** Распределение частиц по размерам по данным ДСР через 1–2 ч (а) и через 3 месяца (б) после приготовления образцов. 1 – Ans, 2 – Ans/PL, 3 – Ans/PL-ODN. Концентрация частиц и нанокompозитов – 0.1 мг/мл в расчете на Ans.

слой PL или PL-ODN предотвращает агрегацию. Аналогичный эффект наблюдался в работе [24] при защите наночастиц Ans белковыми слоями. Следует отметить, что замораживание суспензий наночастиц и наноконкомпозитов на основе анатаза приводит к их заметной агрегации (размеры увеличиваются до 400–600 нм).

Присоединение PL и PL-содержащих олигонуклеотидных конъюгатов в основном обусловлено электростатическим взаимодействием положительно заряженных аминогрупп с отрицательно заряженной поверхностью Ans при нейтральном pH [8]. Это предположение подтверждается значениями ξ -потенциала исследуемых образцов (табл. 2). Величины ξ -потенциала изменяются с отрицательных на положительные значения, когда исходные наночастицы Ans связывают PL (ср. строки 1 и 2) или PL-ODN (ср. строки 1 и 3 или 4), причем в первом случае (присоединение PL) это изменение более выражено, чем в случае присоединения PL-ODN, т.к. отрицательно заряженные межнуклеотидные фосфатные группы олигонуклеотида вносят свой вклад в суммарный заряд наноконкомпозита (уменьшают “положительное” влияние PL). Разница между величинами ξ -потенциала для наноконкомпозитов, содержащих ODN₁ (21-мер) и ODN₂ (33-мер) (табл. 2, строки 3 и 4) объясняется большим вкладом отрицательного заряда более протяженного олигонуклеотида, что приводит к уменьшению положительного заряда на частицах в случае 33-мера.

Уменьшение положительного заряда наноконкомпозита An/PL-ODN₁ по сравнению с PL-ODN₁ (табл. 2, строки 3 и 5) можно объяснить вкладом отрицательно заряженных наночастиц.

Данные о размерах и значениях ξ -потенциала наноконкомпозитов Ans/PL•ODN по сравнению с данными для исходных наночастиц Ans и конъюгатов Ans/PL однозначно показывают, что эти наноконкомпозиты могут быть сформированы в водном растворе в отсутствие NaCl, т.е. PL и ODN могут успешно связываться, соответственно, с наночастицами Ans и Ans/PL в водных растворах.

Исследование наночастиц и наноконкомпозитов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Исследование наночастиц методом ПЭМ позволяет определить их форму и физические размеры, а также визуализировать их пространственную организацию. В образцах водной суспензии наночастиц Ans наблюдаются округлые частицы (2.5–4.0 нм) средней или высокой электронной плотности (4.0–6.5 нм) (рис. 3а). Основную долю составляют первые, организованные в “цепочки” и “веточки”, лежащие на сеточке по отдельности или в виде рыхлых скоплений разного размера. “Цепочки” частиц иногда замыкались в замкнутые округлые профили (рис. 3а). Подобная организация округлых частиц Ans в цепочки была показана методом сканирующей электронной микроскопии [25]. Электронно-плотные частицы располагались случайным образом. Следует отметить, что прак-

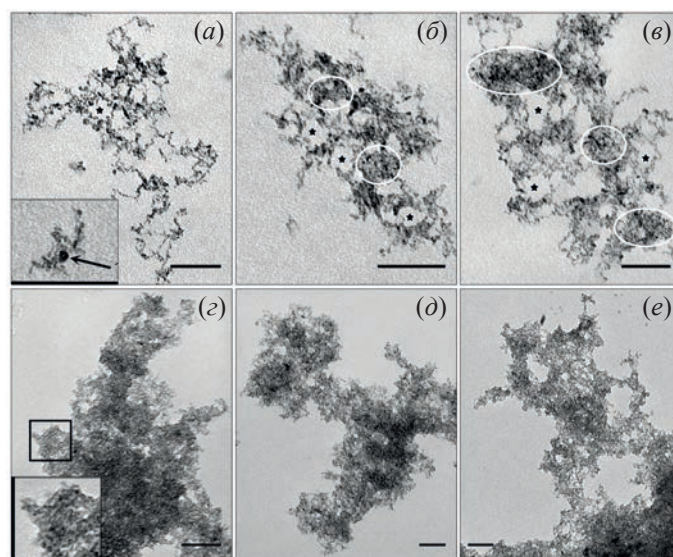


Рис. 3. Ультраструктура суспензий наночастиц Ans, Ans/PL и Ans/PL•ODN, полученных методом ПЭМ: (а) – водная суспензия наночастиц Ans. На врезке – частицы средней электронной плотности, округлая электронно-плотная частица показана стрелкой; (б) и (в) – водные суспензии наночастиц Ans/PL и Ans/PL•ODN. Звездочками показаны полости замкнутых округлых профилей. Участки плотного расположения наночастиц выделены окружностями; (г) – суспензия наночастиц Ans в 0.9%-ном растворе NaCl. На врезке представлен увеличенный участок скопления, видны “склеенные” частицы; (д) и (е) – суспензии наночастиц Ans/PL и Ans/PL•ODN. Сорбция суспензии на сеточку. Длина масштабных отрезков – 100 нм.

тически все наночастицы Ans были организованы в рыхлые скопления, отдельные частицы наблюдались крайне редко; аналогичная картина была отмечена во всех препаратах водных суспензий. Округлые электронно-плотные структуры (7–10 нм) встречались в образцах водной суспензии наночастиц Ans (рис. 3а, врезка), а также во всех остальных образцах частиц в водной суспензии.

В водной суспензии структура и размеры наночастиц Ans/PL не отличались от структуры исходных наночастиц Ans, однако несколько менялась пространственная организация их скоплений: наряду с “цепочками” и “веточками” появились многочисленные электронно-плотные локусы, в которых наночастицы плотно прилегали друг к другу (рис. 3б). Формирование локусов указывает на изменения поверхностных свойств наночастиц Ans при обработке полилизинном, приводящие к их неупорядоченному “слипанию”.

Добавление олигонуклеотида не привело к заметным изменениям морфологии наночастиц Ans/PL•ODN в водной суспензии по сравнению с наночастицами Ans/PL. В рыхлых скоплениях наночастиц Ans/PL•ODN заметно возрастала доля электронно-плотных локусов по сравнению с наночастицами Ans/PL (рис. 3в).

Полученные результаты показывают выраженное сродство наночастиц Ans друг к другу: в свежеприготовленной водной суспензии они объединяются в разветвленные линейные структуры, формирующие рыхлые скопления. Модификация Ans полилизинном приводит к уплотнению скоплений за счет неупорядоченного “слипания” наночастиц, формирующих электронно-плотные локусы. Визуально величина скоплений уменьшается по сравнению с исходными наночастицами Ans. Модификация олигонуклеотидом наночастиц Ans/PL усиливает их связывание друг с другом, что отражается на пространственной организации их скоплений, в которых возрастает доля “плотных” локусов и сокращается длина линейных компонентов.

В отличие от водной суспензии, в 0.9%-ном растворе NaCl наночастицы Ans формировали плотные комковатые скопления различного размера и формы (рис. 3г). Отдельные наночастицы и “цепочки” наночастиц просматривались лишь

на периферии скоплений. Структура скоплений наночастиц Ans/PL и Ans/PL•ODN в 0.9%-ном растворе NaCl визуально не отличалась от наблюдаемой в образцах наночастиц Ans: модифицированные наночастицы формировали плотные комковатые скопления различного размера и формы (рис. 3г–е).

Инкубация водных суспензий наночастиц Ans, Ans/PL и Ans/PL•ODN в течение суток при 4°C не привела к заметным изменениям морфологии наночастиц, характера сорбции на сеточку и пространственной организации скоплений. Суспензия содержала рыхлые разветвленные скопления разного размера, “цепочки” и “веточки” наночастиц Ans, как и свежеприготовленные образцы. Морфология скоплений наночастиц Ans, Ans/PL и Ans/PL•ODN через 24 ч инкубации в 0.9%-ном растворе NaCl при 4°C также заметно не изменялась по сравнению со свежеприготовленными образцами.

Таким образом, результаты ПЭМ иллюстрируют связывание наночастиц анатаза с полилизинном и олигонуклеотидом, а также показывают различия между суспензиями наночастиц и нанокомпозитов в воде и в растворе NaCl.

Противовирусная активность нанокомпозитов в отношении ВПГ-1. Мы сравнили биологическую активность нанокомпозитов, полученных в воде и 0.9%-ном NaCl, на примере ингибирования репликации вируса простого герпеса первого типа в зараженных клетках VERO. В качестве действующего агента в составе нанокомпозитов мы использовали олигонуклеотид GCCGAGGTCCATGTCGTACGC (ODN₁), направленный на определенный участок генома вируса простого герпеса первого типа (ВПГ-1), а именно на сайт инициации трансляции мРНК белка UL13 [26].

Нанокомпозит Ans/PL•ODN₁ подавлял репликацию ВПГ-1 на 4.5 порядка независимо от способа приготовления (в воде или в 0.9% NaCl), если он был использован через сутки после получения (табл. 3). Через 10 суток хранения активность образца Ans/PL•ODN₁, приготовленного в солевом растворе, была на два порядка ниже, чем у сохранившего свою активность образца, приготовленного в воде.

Таблица 3. Противовирусная активность образцов Ans/PL•ODN в клетках VERO, зараженных ВПГ-1

Образец	Способ приготовления	ИПП вируса, lg
Ans/PL•ODN ₁	H ₂ O, сутки	4.5
	0.9% NaCl, сутки	4.5
	H ₂ O, 10 суток	4.5
	0.9% NaCl, 10 суток	2.5

Примечание: ИПП – индекс подавления продукции вируса; ИПП = Титр вируса в контроле – Титр вируса в опыте (lg).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез наночастиц. Наночастицы TiO_2 в кристаллической форме (анатаз) (Ans) синтезировали, как описано в работе [15]. Ans получали добавлением смеси тетраизопропоксида титана и 2-изопропанола (6 : 1, v/v) в водный раствор HNO_3 при интенсивном перемешивании, соблюдая соотношение $[\text{H}^+] : [\text{Ti}] = 0.5$ и $[\text{H}_2\text{O}] : [\text{Ti}] = 200$. Золь перемешивали в течение 7 ч при 70°C и затем охлаждали до комнатной температуры. Затем золь диализовали против воды при $3\text{--}4^\circ\text{C}$ до pH 3.3–3.5, разбавляли раствор до концентрации 5 мг/мл, добавляли равный объем изопропилглицидилового эфира и 0.2 М водный раствор LiOH до pH 7.2. Полученную реакционную смесь диализовали против воды.

Синтез олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды синтезировали амидофосфитным методом на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) из синтонов (Glen Research, США). В работе использовали следующие олигонуклеотиды: ODN_1 5'-GCCGAGGTCCATGTCGTACGCr (21-мер), ODN_2 5'-GAAATAAGAGGCTAGCTACAACGACCTTCATTAr (33-мер). Концентрацию олигонуклеотидов и их конъюгатов с полилизином определяли по оптическому поглощению на 260 нм, измеренному на спектрофотометре U-1800 (Shimadzu, Япония).

Синтез нанокомпозиов Ans/PL, Ans/PL-ODN и Ans/PL•ODN. В работе использовали поли-L-лизин гидробромид (PL, MW 15000–30000, Sigma-Aldrich, США). Полилизин-содержащие олигонуклеотиды (PL-ODN) синтезированы, как описано в работе [27], с использованием растворенного в воде полилизина при молярном отношении аминок групп в полилизине к олигонуклеотиду 100 : 1. Конъюгаты PL-ODN диализовали против воды для удаления остаточных количеств диметилсульфоксида и непрореагировавших олигонуклеотидов. Водные растворы PL-ODN (50–80 мМ) хранили при 4°C перед использованием.

Ans/PL получали, как описано в работе [15], добавляя 20 мкл 0.1 М водного раствора полилизина (в расчете на мономерное звено) к 1 мл суспензии наночастиц (1 мг). Таким образом, при полном связывании полилизина с наночастицами емкость препарата Ans/PL по аминок группам составляла 2 мкмоль/мг.

Нанокомпозиовы Ans/PL-ODN получали, как описано в работе [16], смешивая суспензию наночастиц Ans (0.1 мг) в 100 мкл воды с 10 мкл 0.1 мМ раствора PL-ODN. Нанокомпозиовы Ans/

PL•ODN получали, как описано в работе [16], при смешивании наночастиц, покрытых полилизином (Ans/PL) (0.1 мг по Ans-наночастицам, 2 мкмоль/мг по NH_2 -группам), с ODN (10 мкл 0.1 мМ) в 100 мкл воды или 140 мМ раствора NaCl. Емкость нанокомпозиов по олигонуклеотиду составляла 20 нмоль/мг в обоих случаях.

Все манипуляции с наночастицами и нанокомпозиатами проводили после обработки ультразвуком (90 Вт, 25°C) в течение 30 с.

Размер частиц и значения ξ -потенциала. Размер (гидродинамический диаметр, d) и ξ -потенциал исследуемых образцов измеряли методами динамического рассеяния света и фазового анализа рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZS Plus (Malvern, Великобритания) в водной среде. Ans, Ans/PL, Ans/PL-ODN и Ans/PL•ODN использовали в концентрации 0.1 мг/мл в расчете на наночастицы с содержанием полилизина 2 мкмоль/мг и олигонуклеотидов 20 нмоль/мг. Значения ξ -потенциала образцов измеряли с использованием кюветы DTS1070. Каждый образец готовили по меньшей мере в трех экземплярах, измерения каждого из них проводили в трех повторях при комнатной температуре. Значения размера частиц и ξ -потенциала усредняли по этим экспериментам. Влияние соли на агрегацию наночастиц и нанокомпозиов исследовали, добавляя к суспензии 1 М раствор NaCl до соответствующей концентрации соли (50–100 мМ). Результаты представлены в табл. 1 и 2.

Противовирусная активность нанокомпозиов. Противовирусную активность образцов изучали на клетках VERO (ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия), инфицированных вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) штамма VR-3 в “профилактическом” режиме. Титры ВПГ-1 в вируссодержащей жидкости (ВСЖ) в контроле (без образца) и опыте (с образцом) рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах 50% тканевых цитопатических доз в мл ($\text{lg TCD}_{50}/\text{мл}$) по методу Спирмена–Кербера [28]. Клетки VERO в логарифмической фазе (10^5 кл./мл) высевали в питательной среде DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium), содержащей 10%-ную фетальную телячью сыворотку (Gibco, США), в 96-луночные планшеты (100 мкл/луночка) и инкубировали при 37°C , 5% CO_2 и влажности 100%. После достижения ~80% монослоя среду удаляли, в лунки добавляли исследуемые образцы Ans/PL•ODN (5 мкМ по ODN) в 100 мкл среды DMEM, содержащей 2%-ную фетальную телячью сыворотку. В качестве контроля использовали 100 мкл среды DMEM. Клетки инкубировали при 37°C ,

5% CO₂ и влажности 100% в течение 4 ч с последующим добавлением раствора ВПГ-1, множественность инфицирования 0.001 ТЦД₅₀/кл. (тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая гибель 50% клеток). Клетки инкубировали в течение 48 ч в тех же условиях.

Вирус-ингибирующий эффект исследуемых образцов рассчитывали по формуле: ИПП = Титр вируса в контроле – Титр вируса в опыте (lg). В контрольном образце значение титра вируса было равно 7.0 ± 0.3 lg ТЦД₅₀/мл.

Электронная микроскопия. Свежеприготовленные суспензии Ans, Ans/PL и Ans/PL•ODN (0.1 мг/мл в расчете на Ans; 2 мкмоль PL и 20 нмоль ODN на 1 мг Ans) в воде или 0.9%-ном растворе NaCl, а также суспензии этих частиц после инкубации в течение 24 ч при 4°C, обрабатывали ультразвуком (90 Вт, 25°C) в течение 30 с. Суспензии каждого образца (10 мкл) сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой в течение 30 с, избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой, сетки высушивали на воздухе. Препараты изучали в просвечивающем электронном микроскопе Jem-1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Образцы изучали при аппаратном увеличении микроскопа 50–150 тыс. раз. Снимки получали с помощью цифровой камеры бокового ввода Veleta (SIS, Германия). Ультраструктуры суспензий приведены на рис. 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены неагломерированные олигонуклеотид-содержащие наноконпозиты на основе наночастиц анатаза (Ans/PL•ODN, и Ans/PL-ODN). При иммобилизации олигонуклеотидов на наночастицах в воде образуются монодисперсные частицы небольшого размера, в то время как в присутствии NaCl происходит агрегация наночастиц и наноконпозитов. Исследование биологической активности наноконпозитов на примере подавления репликации вируса простого герпеса первого типа показало, что наноконпозит Ans/PL•ODN₁, полученный в воде, проявил высокую противогерпетическую активность в культуре клеток (подавление репликации ВПГ-1 на 4.5 порядка), которая сохранялась по крайней мере в течение 10 суток. Активность того же наноконпозита, полученного в солевом растворе, уменьшалась на два порядка за это время. Таким образом, продемонстрировано, что полученные наноконпозиты могут храниться в воде при 4°C в течение длительного времени без падения их эффективности. Это упрощает и расширяет воз-

можность применения предложенных наноконпозитов в качестве биологически активных агентов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00184).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Автор АСЛ руководитель. Авторы МНР, ОЮМ, ЕИФ, НАМ, ЮЕП, ЕИР и ВФЗ внесли равный вклад в исследование и подготовку текста статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ming X, Laing B. // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2015. V. 87. P. 81–89.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.002>
2. Samanta, A. Medintz I.L. // Nanoscale. 2016. V. 17. P. 9037–9095.
<https://doi.org/10.1039/c5nr08465b>
3. Weng Y., Huang Q., Li C., Yang Y., Wang X., Yu J., Huang Y., Liang X.J. // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2020. V. 19. P. 581–601.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.004>
4. Zhang X., Wang F., Liu B., Kelly E.Y., Servos M.R., Liu J. // Langmuir. 2014. V. 30. P. 839–845.
<https://doi.org/10.1021/la404633p>
5. Haghighi F.H., Mercurio M., Cerra S., Salamone T.A., Bianymotlagh R., Palocci C., Spica V.R., Fratoddi I. // J. Mater. Chem. B. 2023. V. 11. P. 2334–2366.
<https://doi.org/10.1039/d2tb02576k>
6. Thurn K.T., Arora H., Paunesku T., Wu A., Brown E.M., Doty C., Kremer J., Woloschak G. // Nanomedicine. 2011. V. 7. P. 123–130.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.09.004>
7. Челобанов Б.П., Репкова М.Н., Байбородин С.И., Рябчикова Е.И., Стеценко Д.А. // Мол. биол. 2017. Т. 51. С. 695–704.
<https://doi.org/10.1134/S0026893317050065>

8. *Beutner R., Michael J., Schwenzer B., Scharmwebe D.* // J. R. Soc. Interface. 2010. V. 7. S93–S105.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0418.focus>
9. *Levina A., Repkova M., Shikina N., Ismagilov Z., Kupryushkin M., Pavlova A., Mazurkova N., Pyshnyi D., Zarytova V.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2021. V. 162. P. 92–98.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.03.006>
10. *Thurn K.T., Paunesku T., Wu A., Brown E.M.B., Lai B., Vogt S., Maser J., Aslam M., Dravid V., Bergan R., Woloschak G.E.* // Small. 2009. V. 5. P. 1318–1325.
<https://doi.org/10.1002/sml.200801458>
11. *Vollath D.* // Beilstein J. Nanotechnol. 2020. V. 11. P. 854–857.
<https://doi.org/10.3762/bjnano.11.70>
12. *Li G., Lv L., Fan H., Ma J., Li Y., Wan Y., Zhao X.S.* // J. Coll. Interface Sci. 2010. V. 348. P. 342–347.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.04.045>
13. *Pellegrino F., Pellutì L., Pellutì L., Sordello F., Sordello F., Minero C., Ortel E., Hodoroaba V.D., Maurino V.* // Appl. Catal. B Environ. 2017. V. 216. P. 80–87.
<https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.05.046>
14. *Kätelhön E., Sokolov S.V., Bartlett T.R., Compton R.G.* // Chemphyschem. 2017. V. 18. P. 51–54.
<https://doi.org/10.1002/cphc.201601130>
15. *Levina A., Ismagilov Z., Repkova M., Shatskaya N., Shikina N., Tusikov F., Zarytova V.* // J. Nanosci. Nanotechnol. 2012. V. 12. P. 1812–1820.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5190>
16. *Levina A.S., Ismagilov Z.R., Repkova M.N., Shikina N.V., Bayborodin C.I., Shatskaya N.V., Zagrebelsky S.N., Zarytova V.F.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 87–98.
<https://doi.org/10.1134/S1068162013010068>
17. *Levina A.S., Repkova M.N., Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Mazurkova N.A., Zarytova V.F.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. V. 40. P. 196–202.
<https://doi.org/10.1134/s1068162014020095>
18. *Repkova M.N., Levina A.S., Chelobanov B.P., Mazurkova N.A., Ismagilov Z.R., N/V/ Shatskaya, S.V. Baiborodin, Filippova E.I., Mazurkova N.A., Zarytova V.F.* // Int. J. Antimicrob. Agents. 2017. V. 49. P. 703–708.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.026>
19. *Levina A.S., Repkova M.N., Bessudnova E.V., Filippova E.I., Zarytova V.F.* // Beilstein J. Nanotechnol. 2016. V. 7. P. 1166–1173.
<https://doi.org/10.3762/bjnano.7.108>
20. *Repkova M.N., Levina A.S., Ismagilov Z.R., Mazurkova N.A., Mazurkov O.Ju., Zarytova V.F.* // Nucleic Acid Ther. 2021. V. 31. P. 436–442.
<https://doi.org/10.1089/nat.2021.0061>
21. *Repkova M.N., Levina A.S., Seryapina A.A., Shikina N.V., Bessudnova E.V., Zarytova V.F., Markel A.L.* // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 454–457.
<https://doi.org/10.1134/S000629791704006X>
22. *Люблинский С.Л., Люблинская И.Н., Колоскова Е.М., Азизов А.М., Каркищенко В.Н., Нестеров М.С., Канцов А.В., Агельдинов Р.А., Герасимов В.Н., Груненко Д.В.* // Биомедицина. 2021. Т. 17. С. 18–37.
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-18-37>
23. *Shih Y.H., Liu W.S., Su Y.F.* // Env. Toxicol. Chem. 2012. V. 31. P. 1693–1698.
<https://doi.org/10.1002/etc.1898>
24. *Patel S., Patel P., Bakshi S.R.* // Cytotechnology. 2017. V. 69. P. 245–263.
<https://doi.org/10.1007/s10616-016-0054-3>
25. *Theissmann R., Drury Ch., Rohe M., Koch T., Winkler J., Pikal P.* // Beilstein J. Nanotechnol. 2024. V. 15. P. 317–332.
26. *Levina A.S., Repkova M.N., Zarytova V.F.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 49. P. 1243–1262.
<https://doi.org/10.1134/S1068162023060067>
27. *Levina A.S., Mikhaleva E.A., Repkova M.N., Zarytova V.F.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 34. P. 89–95.
<https://doi.org/10.1134/s1068162008010111>
28. *Mahy B.W.J., Kangro H.O.* // Virology Methods Manual. London: Academic Press, 1996. 374 p.

Non-Agglomerated Oligonucleotide-Containing Nanocomposites Based on Titanium Dioxide Nanoparticles

M. N. Repkova*, O. Yu. Mazurkov**, E. I. Filippova**, N. A. Mazurkova**,
Yu. E. Poletaeva*, E. I. Ryabchikova*, B. F. Zarytova*, and A. S. Levina*,[#]

[#] Phone +7 (913) 756-76-93; e-mail: asl1032@yandex.ru

* *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

** *FBRI State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia*

Stability and monodispersity are important properties of nanoparticles and nanocomposites that ensure the reliability of their application in biological systems and the reproducibility of results. The preparation of non-agglomerated oligonucleotide-containing nanocomposites based on anatase titanium dioxide nanoparticles (Ans~ODN) is the aim of this work. The immobilization of oligodeoxynucleotides on TiO₂ nanoparticles has been studied by the dynamic light scattering and transmission electron microscopy. The antiviral activity of the synthesized samples has been performed on VERO cells infected with herpes simplex virus of the first type. The effect of NaCl on the agglomeration of nanoparticles and nanocomposites in aqueous solutions has been studied. The presence of NaCl leads to agglomeration of nanoparticles and nanocomposites. It has been shown that nanocomposites are formed in an aqueous solution in the absence of NaCl. A comparison of the biological activity of nanocomposites prepared in water and saline solution has been carried out with an example of inhibition of replication of the herpes simplex virus of the first type in the cell culture. The studied nanocomposite, regardless of the preparation method (in water or 0.9% NaCl), inhibited virus replication by 4.5 orders of magnitude when used 1 day after preparation. After 10 days of storage, the activity of the sample prepared in saline solution was two orders of magnitude lower than that of the active sample prepared in water. We have developed the method for the preparation of non-agglomerated oligonucleotide-containing nanocomposites based on anatase nanoparticles and demonstrated their potential use for the study of their biological activity. Unlike nanocomposites prepared in the presence of salt, which lose their efficacy during storage, nanocomposites that are not prone to agglomeration can be obtained in water for future use.

Keywords: anatase nanoparticles, oligonucleotide-containing nanocomposites, antiviral activity, herpes simplex virus