

ФОРМИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ, СОДЕРЖАЩИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ АГЕНТЫ, СПЕКТРАЛЬНЫМИ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Касьяненко Н.А., Бакулев В.М., Артамонова Д.А.

Санкт-Петербургский государственный университет

ул. Ульяновская, 1, г. Санкт-Петербург, 198504, РФ, e-mail: nkasyanenko@mail.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0615

Аннотация. В последнее время усилился интерес к использованию молекулы ДНК при конструировании новых систем для их применения в терапии различных заболеваний. При этом нуклеиновые кислоты используются не только как факторы влияния на организм на генетическом уровне (например, в качестве генных векторов), но и как инструменты для переноса различных биологически активных агентов в клетки-мишени. В этом случае речь идет об использовании высокомолекулярных ДНК. Важным этапом при создании таких структур является компактизация ДНК, обеспечивающая их проникновение через мембраны, а также защищающая ДНК от действия нуклеаз. В качестве компактизирующих агентов используют различные катионные полимеры. Включение в формируемые компактные ДНК-полимерные частицы наночастиц благородных металлов может расширить область применения таких структур в медицине за счет каталитических и оптических свойств наночастиц металлов. Целью данной работы стало изучение систем, сформированных путем компактизации ДНК с использованием синтетического полимера, сопряженного с наночастицами серебра. Рассматривается результат добавления в такие структуры люминесцирующего красителя. В работе для этой цели используется известный краситель этидиум бромид. Физико-химические свойства сформированных структур изучали методами вискозиметрии, УФ-спектрофотометрии, люминесцентной спектроскопии.

Ключевые слова: ДНК, наночастицы серебра, ДНК-полимерные частицы с включением красителя и наночастиц металла.

Нуклеиновые кислоты являются привлекательными объектами для терапевтического применения [1,2]. Лекарства на основе нуклеиновых кислот могут достигать долгосрочных эффектов, воздействуя на молекулярные основы заболеваний, связанных с повреждением ДНК. В частности, нуклеиновые кислоты могут быть использованы для создания различных структур, используемых в современной терапии рака [3]. Помимо генных векторов, к числу таких структур относят многофункциональные наноплатформы, содержащие различные компоненты, которые могут найти применение в тераностике. Действительно, молекула ДНК обладает такими свойствами, как превосходная биосовместимость, возможность самосборки различных конструкций, способность связывать различные биологически активные агенты. Помимо низкомолекулярных ДНК при создании лекарств иногда необходимо использовать высокомолекулярные образцы. Терапия на основе нуклеиновых кислот использует молекулы ДНК и их фрагменты не только для вмешательства в болезни на генетическом уровне, но и в качестве инструментов для доставки лекарств и других полезных объектов.

Терапевтическое использование природных нуклеиновых кислот затруднено их чувствительностью к нуклеазам и полиэлектролитными свойствами из-за их полианионной природы. Это можно минимизировать, переводя ДНК и ее комплексы в компактное состояние. Кроме того, эффективная доставка *in vivo* является ключом к клиническому применению препаратов на основе нуклеиновых кислот. Она также накладывает ограничения на размер структур, способных проникать через клеточные мембраны. Так как ДНК является сильно заряженной и жесткой макромолекулой, для решения проблемы ее компактизации *in vitro* обычно используют поликатионы, многовалентные ионы, полиамины.

Изучение многокомпонентных систем, сформированных при компактизации ДНК с включением наночастиц металлов и других компонентов, которые обладают биологической активностью, важно для понимания молекулярных основ формирования терапевтических и диагностических средств нового поколения.

Целью исследования являлось формирование и характеристика систем, содержащих высокомолекулярную ДНК, компактизирующий ее полимер, наночастицы благородных металлов (в работе используются наночастицы серебра) и этидиум бромид в качестве модельного люминофора.

Физико-химические свойства сформированных структур изучали методами ультрафиолетовой спектроскопии (спектрофотометр СФ-2000, Россия), вискозиметрии с использованием низкоградиентного ротационного вискозиметра типа Зимма-Крозера [4], флуоресцентной спектроскопии (спектрофлуориметр Hitachi F-7100). Использовали коммерческий препарат высокомолекулярной ДНК тимуса телят фирмы Sigma Aldrich. Молекулярная масса образца была определена вискозиметрически по значению характеристической вязкости ДНК в 0,15 М NaCl [5] и составила 12×10^6 г/моль. Соплимер МАГ-ДМАЭМ с включенными наночастицами серебра, синтезированный в ИВС РАН по методике, описанной в работе [6], был любезно предоставлен к.х.н. Назаровой О.В. Отношение мономерных звеньев полимера к AgNO_3 при восстановлении серебра равно 9. Использовали краситель этидиум бромид, EtBr, соли NaCl, NaNO_3 и AgNO_3 , боргидрид натрия NaBH_4 фирмы «Вектон».

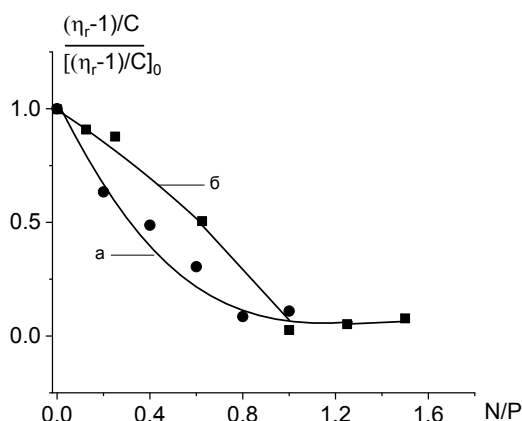


Рисунок 1. Зависимость относительного изменения приведенной вязкости растворов ДНК в 0,005 М NaNO₃ с сополимером (а) и сополимером, сопряженным с наночастицами серебра (б) от величины N/P. С(ДНК)=0,0066%

Для компактизации отрицательно заряженной ДНК и ее комплексов с заданными компонентами использовали катионные полимеры. Так как в основе формирования интерполиэлектrolитных комплексов лежат электростатические взаимодействия, такие системы необходимо формировать в растворах малой ионной силы – в нашем случае мы использовали базовый раствор 0,005 М NaNO₃. Компактизацию ДНК удобно рассматривать, используя метод вискозиметрии, так как изменение приведенной вязкости растворов ДНК отражает изменение объема ее молекулярного клубка. Из-за разницы в молекулярной массе (молекулярная масса полимера, оцененная по вязкости его растворов, составляла 15 000 г/моль) присутствие полимера в растворе не оказывало заметного влияния на измеряемую величину относительной вязкости раствора $\eta_r = \eta/\eta_0$, где η и η_0 – вязкость раствора и растворителя соответственно. Измерения проводили при 21° С, градиенты скорости не превышали значения 2 см⁻¹, что избавляло от необходимости измерения градиентной зависимости вязкости для используемых растворов. Величину относительной вязкости использовали для расчета приведенной вязкости раствора $(\eta_r - 1)/C$, где С – концентрация ДНК в растворе.

На рисунке 1 а приведена зависимость относительного изменения приведенной вязкости растворов ДНК с полимером без наночастиц от величины N/P, которая отражает отношения молярных концентраций ионогенных групп поликатиона и ДНК. Хорошо видно, что добавление катионного полимера в раствор ДНК приводит к падению приведенной вязкости растворов. При N/P=0.8 наблюдается полная компактизация макромолекулы. При использовании сополимера с наночастицами (рис. 1 б) общее падение приведенной вязкости ДНК от N/P и итоговая компактизация ДНК не изменились, что указывает на сохранение поликатионных свойств полимера после формирования наночастиц. Тем не менее, некоторая разница в ходе зависимости указывает на изменение электростатических взаимодействий при использовании сополимера с наночастицами, что и следовало ожидать.

Таким образом, при N/P>0.9 в растворах ДНК с сополимером, сопряженным с наночастицами, чрезвычайно малое значение приведенной вязкости отражает формирование компактных структур. Наличие наночастиц серебра в изучаемых растворах, как и в растворах сополимера без ДНК, проверяли по наличию пика плазмонного резонанса наночастиц серебра, появляющегося вне полос поглощения ДНК и полимера (рис. 2).

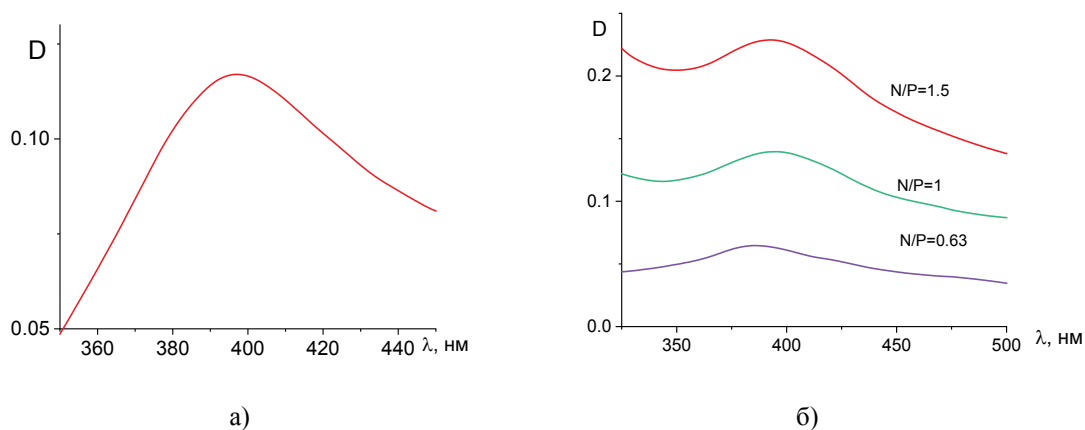


Рисунок 2. Пик плазмонного резонанса наночастиц серебра в растворах сополимера в 0,005 М NaNO₃ (а), С(пол)= 10⁻⁴ М, и ДНК с сополимером в 0,005 М NaNO₃ (б) при разных значениях N/P. С(ДНК)=0,0035%

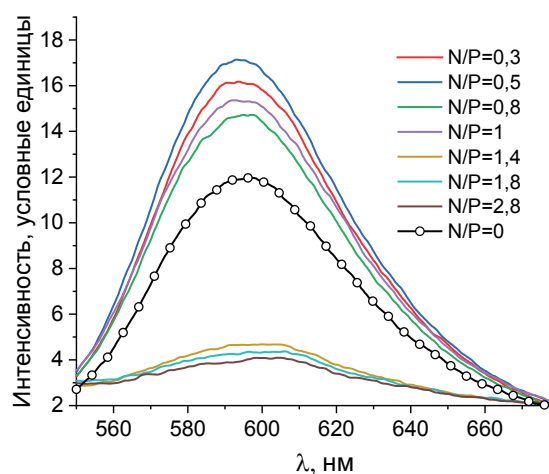


Рисунок 3. Спектр испускания флуоресценции красителя в растворах, содержащих разные концентрации сополимера или при разных значениях N/P (при постоянной концентрации ДНК) в $0,005\text{ M NaNO}_3$ при $\lambda_{\text{ex}}=500\text{ nm}$. Сополимер добавляли в растворы, содержащие комплексы ДНК с красителем

Как известно, в окрестности наночастиц благородных металлов наблюдается усиление электромагнитного поля, что позволяет использовать композиты наночастиц с люминофорами при создании различных устройств. Для совмещения наночастиц с люминофорами удобно использовать связующие компоненты, которые обеспечивают сближение наночастиц с флуоресцирующими агентами. Если мы воспользуемся катионным сополимером, который связан с наночастицами (в нашем случае – наночастицами серебра), то из-за формирования интерполиэлектролитных комплексов с отрицательно заряженной молекулой ДНК в растворе компактные частицы будут содержать ДНК, полимер и наночастицы серебра. Предварительно связывая с ДНК флуоресцирующий краситель (в нашем случае - краситель EtBr) можно получить структуры, в которых краситель находится в непосредственной близости от наночастиц серебра. Так как эффект усиления оптических свойств соединений в композитах с наночастицами благородных металлов проявляется на расстоянии, не превышающем 2 nm , можно ожидать, что такие наноструктуры проявят интересные оптические свойства.

Спектры флуоресценции красителя в комплексах с ДНК в растворах, содержащих $0,005\text{ M NaNO}_3$ и сополимер с наночастицами при разных N/P показывают, что интенсивность люминесценции EtBr возрастает с увеличением N/P по сравнению с таковой без добавления сополимера (рис. 3). При проведении эксперимента краситель был связан с ДНК, после чего в раствор добавляли разные концентрации сополимера. Концентрации красителя и ДНК оставались постоянными. Несмотря на то, что краситель несет положительный заряд и частично экранирует заряд ДНК, положительно заряженный сополимер находит возможность связаться с ДНК и компактизировать ее. В результате компактизации ДНК краситель и наночастицы серебра сближаются, что приводит к тому, что интенсивность люминесценции красителя существенно возрастает с увеличением величины N/P от 0 до $0,5$. При $N/P > 1$, когда формируются компактные дискретные структуры, интенсивность люминесценции значительно падает.

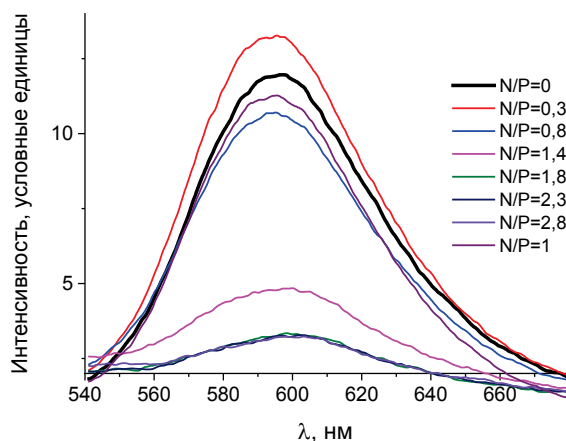


Рисунок 4. Спектр люминесценции EtBr при его добавлении к комплексам ДНК с сополимером в $0,005\text{ M NaNO}_3$ при $\lambda_{\text{ex}}=500\text{ nm}$

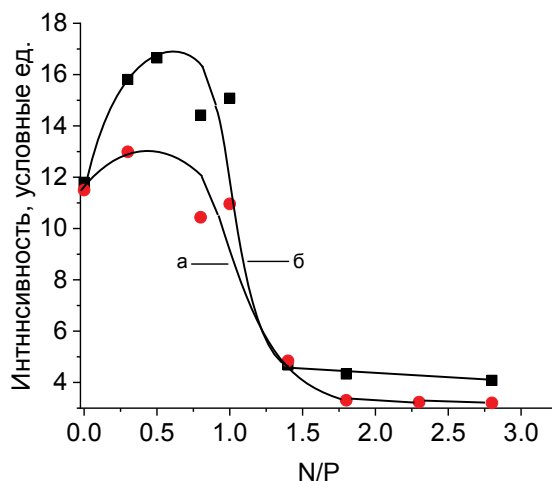


Рисунок 5. Зависимость амплитуды полосы испускания при 600 нм от отношения N/P для комплексов красителя с ДНК в 0,005 М NaNO₃ при добавлении сополимера в раствор ДНК до и после добавления красителя, $\lambda_{\text{ex}}=500$ нм

Если краситель добавлять в раствор ДНК после ее связывания с сополимером, наблюдается другой результат (рис. 4). Несмотря на то, что при $N/P=0,3$ также фиксируется увеличение интенсивности люминесценции, что можно объяснить эффектом влияния наночастиц серебра, это увеличение не столь значительно, как в описанном выше эксперименте при другом порядке добавления компонентов в раствор ДНК.

В остальных растворах интенсивность люминесценции снижается – в этом случае для красителя после формирования интерполиэлектродитных комплексов затруднен доступ к ДНК, которая находится в составе компактных частиц. На рис. 5 представлены результаты обработки спектров, приведенных на рисунках 3 и 4. Хорошо видно, что при проведении эксперимента порядок добавления сополимера в раствор ДНК при формировании ее комплексов с красителем играет важную роль.

Таким образом, в работе показано, что использование катионного сополимера МАГ-ДМАЭМ с включенными наночастицами серебра для компактизации ДНК в растворе малой ионной силы (0,005 М NaNO₃) приводит к формированию интерполиэлектродитных комплексов с включением наночастиц серебра. При этом компактизация ДНК принципиально не отличается от наблюдаемой при использовании такого же сополимера без наночастиц. Иными словами, сопряженные с сополимером наночастицы серебра компактизации ДНК в растворах малой ионной силы не мешают.

При исследовании люминесценции EtBr в связанном с ДНК состоянии после формирования интерполиэлектродитных комплексов ДНК с сополимером с включением серебряных наночастиц зарегистрировано увеличение интенсивности люминесценции красителя. При $N/P > 1$ интенсивность люминесценции падает по сравнению с таковой для растворов, содержащих комплексы ДНК с красителем без сополимера.

Порядок добавления красителя и сополимера с наночастицами серебра в раствор ДНК влияет на эффект усиления люминесценции этидиума бромиды. Компактизация ДНК, предшествующая добавлению красителя в раствор, затрудняет доступ молекулам красителя к местам его связывания с ДНК.

Список литературы / References:

1. Lv Z., Zhu Yi., Li F. DNA Functional Nanomaterials for Controlled Delivery of Nucleic Acid-Based Drugs. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021, vol. 9, p. 720291, doi: 10.3389/fbioe.2021.720291.
2. Bege M., Borbás A. The Medicinal Chemistry of Artificial Nucleic Acids and Therapeutic Oligonucleotides. *Pharmaceuticals*, 2022, vol. 15, p. 909, doi: 10.3390/ph15080909.
3. Wu X., Wu T., Lu J., Ding B. Gene therapy based on nucleic acid nanostructure. *Adv. Healthc. Mater.*, 2020, vol. 9, e2001046, doi: 10.1002/adhm.202001046.
4. Frisman E.V., Schagina L.V., Vorobiev V.I. A glass rotation viscometer. *Biorheology*, 1965, vol. 2, pp. 189-194.
5. Eigner J., Doty P. The native, denatured and renatured states of deoxyribonucleic acid. *Journal of Molecular Biology*, 1965, vol. 12, pp. 549-580, doi: 10.1016/S0022-2836(65)80312-6.
6. Shvedchenko D.O., Nekrasova T.N., Nazarova O.V., Buffat P.A., Suvorova E.I. Mechanism of formation of silver nanoparticles in MAG–DMAEMA copolymer aqueous solutions. *J Nanopart Res*, 2015, vol. 17, pp. 1-13, doi: 10.1007/s11051-015-3083-5.

FORMATION AND STUDY OF MULTICOMPONENT SYSTEMS CONTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS BY SPECTRAL AND HYDRODYNAMIC METHODS**Kasyanenko N.A., Bakulev V.M., Artamonova D. A.**

Saint-Petersburg State University

Ulyanovskaya str., 1, Saint Petersburg, 198504, Russia, e-mail: nkasyanenko@mail.ru

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0615

Abstract. The usage of the DNA molecule in the design of new systems for their application in the therapy of various diseases has generated a lot of interest recently. Nucleic acids are used not only as factors of the influence on sick organism at the genetic level (for example, as gene vectors), but also as tools for the transfer of various biologically active agents into target cells. The high-molecular DNA can be applied in this case. An important step in the creation of such structures is DNA packaging. It ensures the penetration of DNA structures through membranes and also protects DNA from the action of nucleases. Various cationic polymers are used as compacting agents. Inclusion of noble metal nanoparticles into compact DNA-polymer structures can expand the scope of such constructions in medicine due to the catalytic and optical properties of metal nanoparticles. The aim of this work was to study the properties of the systems formed by DNA compaction using a synthetic polymer conjugated with silver nanoparticles. The result of adding a luminescent dye to such structures is considered. In this work, the well-known dye ethidium bromide is used for this purpose. The physicochemical properties of the formed structures were studied by viscometry, UV spectrophotometry, and luminescence spectroscopy.

Key words: *DNA, silver nanoparticles, DNA-polymer particles with inclusion of a dye and metal nanoparticles.*