

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 544.77

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЭТАПНОЙ СБОРКИ ЛИПИДНЫХ
НАНОЧАСТИЦ С ИНКАПСУЛИРОВАННОЙ НУКЛЕИНОВОЙ
КИСЛОТОЙ**

**Богдан Донатович Шмыков, Ольга Владимировна Заборова, Вадим
Александрович Тимошенко, Владимир Глебович Сергеев**

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический
факультет, Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Ольга Владимировна Заборова,
zaborovaov@my.msu.ru

Аннотация. Исследован процесс формирования двух-, трех- и четырехкомпонентных липидных наночастиц содержащих ДНК. Показано, что двухкомпонентные частицы состава фосфолипид – катионное ПАВ хотя и являются стабильными, эффективность инкапсуляции ДНК в такие частицы не превышает 5%. Введение в систему холестерина повышает жесткость мембраны и увеличивает эффективность инкапсуляции до 40%. При введении липида, конъюгированного с полиэтиленгликолем, не только повышается агрегативная устойчивость частиц, но и возрастает до 60% эффективность инкапсуляции ДНК.

Ключевые слова: липидные наночастицы, инкапсуляция нуклеиновой кислоты, комплексы нуклеиновая кислота – катионное ПАВ, липоплексы

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2026-67-5-355-375

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда N 25-23-00291, <https://rscf.ru/project/25-23-00291/>. Исследование методом трекинг-анализа наночастиц проводилось при поддержке ЦКП МГУ «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование», национального проекта «Наука» и Программы развития МГУ.

Для цитирования: Шмыков Б.Д., Заборова О.В., Тимошенко В.А., Сергеев В.Г. Моделирование поэтапной сборки липидных наночастиц с инкапсулированной нуклеиновой кислотой // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2026. Т. 67. № 5. С. 355–375.

ORIGINAL ARTICLE

**STEP-BY-STEP ASSEMBLY SIMULATION OF LIPID NANOPARTICLES
WITH ENCAPSULATED NUCLEIC ACID**

**Bogdan D. Shmykov, Olga V. Zaborova, Vadim A. Timoshenko, Vladimir G.
Sergeyev**

Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia

Corresponding author: Olga V. Zaborova, zaborovaov@my.msu.ru

Abstract. The formation of two-, three-, and four-component lipid nanoparticles containing DNA was studied. It was demonstrated that two-component particles composed of phospholipid and cationic surfactant are stable, however the encapsulation

efficiency of DNA did not exceed 5%. Addition of cholesterol to the system increased membrane rigidity and encapsulation efficiency to 40%. Addition of PEGylated lipid increased both the aggregation stability of nanoparticles and DNA encapsulation efficiency up to 60%.

Keywords: lipid nanoparticles, nucleic acid encapsulation, nucleic acid–cationic surfactant complexes, lipoplexes

Financial Support. This work was supported by Russian Science Foundation (project 25-23-00291), <https://rscf.ru/project/25-23-00291/>. The NTA experiments were performed using the equipment of MSU Shared Research Equipment Center “Technologies for obtaining new nanostructured materials and their complex study” and purchased by MSU in the frame of the Equipment Renovation Program (National Project “Science”).

For citation: Shmykov B.D, Zaborova O.V., Timoshenko V.A., Sergeyev V.G. Step-by-step Assembly Simulation of Lipid Nanoparticles with Encapsulated nucleic acid // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Khimiya. 2026. T. 67. № 5. S. 355–375.

Введение (обзор литературы)

Липидные наночастицы (ЛНЧ) на сегодняшний день активно используются в терапии для доставки нуклеиновых кислот. Они зарекомендовали себя как высокоэффективные и надежные средства доставки препаратов, которые позволяют значительно повысить качество терапии [1]. ЛНЧ превосходят по своей эффективности все предыдущие поколения средств доставки нуклеиновых кислот (липосом, липоплексов, катионных наномульсий) [2]. Современные липидные наночастицы обычно состоят из четырех липидных компонентов: ионизируемого катионного липида, холестерина, фосфолипида и липида, конъюгированного с полиэтиленгликолем (липид-ПЭГ). Такая комбинация приводит к образованию устойчивой дисперсии частиц, которая обладает мономодальным распределением по размерам, и может обеспечить высокую «загрузку» нуклеиновой кислоты. Более того, такие частицы способны сохранять свою стабильность и загруженную нуклеиновую кислоту при соответствующих условиях хранения в течение года [1, 3]. Ионизированный катионный липид отвечает за связывание нуклеиновых кислот и их инкапсуляцию в частицы в момент получения, поскольку получение проводят в кислой среде с pH ниже pK_a липида. Таким образом, липид способен электростатически связываться с отрицательно заряженными фосфатными группами нуклеиновых кислот [3]. Фосфолипид участвует в формировании мембраны липидных наночастиц, а также способствует слиянию ЛНЧ с клеточными мембранами, улучшая доставку препаратов внутрь клетки [4]. Холес-

терин включается в состав ЛНЧ для повышения жесткости мембраны и уменьшения ее проницаемости, что способствует сохранению инкапсулированного вещества до попадания в клетку. Холестерин также снижает адсорбцию белков на поверхности частиц, что увеличивает время циркуляции последних в организме [4]. Липид, конъюгированный с полиэтиленгликолем, участвует не только в формировании липидной мембраны, но он также обеспечивает агрегативную устойчивость ЛНЧ за счет формирования структурно-механического барьера, позволяет регулировать размеры частиц и их распределение по размерам, уменьшает иммунную реакцию организма и регулирует фармакокинетику и фармакодинамику частиц [1, 5].

В литературе чаще всего упоминаются два метода получения ЛНЧ (микрофлюидный и ручной), которые основаны на смешении спиртового раствора липидов, взятых в необходимом соотношении, и водного буферного раствора нуклеиновой кислоты (цитратного с pH 3 или ацетатного с pH 4) для протонирования ионизируемого липида и связывания нуклеиновой кислоты при интенсивном перемешивании. Указанные методы различаются в зависимости от способа, которым производят перемешивание раствора. В случае микрофлюидного подхода потоки растворов смешиваются в специальном микрофлюидном канале, где за счет турбулентного течения формируются частицы необходимого размера. В ручном методе используют вортекс или различные мешалки. Полученная суспензия

подвергается диализу против фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) для удаления этилового спирта и нейтрализации зарядов ионизированного липида. Итоговая суспензия готова к анализу, хранению и дальнейшему использованию [3, 6–9].

На сегодняшний день остается неясным вопрос механизма сборки ЛНЧ и загрузки нуклеиновых кислот в них. Исследователи сходятся во мнении, что основную роль в загрузке выполняет ионизируемый катионный липид [10, 11]. Поскольку получение ЛНЧ проводят в кислой среде, как правило, в цитратном (рН 3) или ацетатном (рН 4) буфере, а значения pK_a используемых липидов составляют от 6,5 до 7,0, то липид находится в протонированном состоянии. Положительно заряженные атомы азота липида электростатически связываются с отрицательно заряженными фосфатными группами нуклеиновых кислот, при этом происходит образование полимер-коллоидного комплекса, который и обеспечивает сольubilизацию в липидные частицы. Тем не менее при детальном изучении этого процесса возникают разные точки зрения.

В работе [12] высказано предположение, что при смешении водной и спиртовой фаз изначально происходит формирование моноламеллярных липидных везикул, содержащих протонированный липид на поверхности. Затем эти везикулы взаимодействуют с молекулами нуклеиновых кислот, в результате чего претерпевают перестройки и формируют липидные наночастицы с инкапсулированной нуклеиновой кислотой. Похожие выводы приведены и в работе [13], где показано, что при формировании пустых, т.е. не содержащих нуклеиновую кислоту, частиц в нейтральной среде липиды распределяются неравномерно: ядро формируют преимущественно холестерин и ионизируемый липид, а фосфолипид и липид-ПЭГ находятся на поверхности. При понижении рН среды происходит перераспределение компонентов – ионизируемый липид выходит на поверхность частиц и становится способным связывать нуклеиновую кислоту. Именно таким образом, посредством взаимодействия протонированного липида на поверхности частиц с нуклеиновыми кислотами, и происходит, по мнению авторов, формирование частиц.

Гипотеза образования первичных агрегатов встречается и в работах [14–17], где выделяют стадию взаимодействия ионизируемого катионного липида с нуклеиновой кислотой как ключевую. При нейтрализации зарядов молекула нуклеиновой кислоты постепенно покрывается

слоем липидов, образуя диск. Из-за гидрофобных взаимодействий происходит агрегация с другими липидами, приводящая к деформации диска и дальнейшему формированию частиц. При этом показано, что повышение скорости смешения спиртовой и водной фаз сокращает время существования липидного диска и происходит более быстрый переход к конечным ЛНЧ [17].

В исследованиях [14, 16, 17] используются также методы молекулярного моделирования, подтверждающие экспериментальные данные SAXS и крио-ТЕМ для липидных наночастиц. Все исследования сходятся в том, что именно молекулы нуклеиновых кислот, в частности РНК, индуцируют образование ламеллярной структуры, особенно при соотношениях N/P (моль протонируемых атомов азота липида к числу фосфатных групп РНК) не более 3. За счет образования липидных дисков на РНК и их дальнейших перестроек основана инкапсуляция и получение готовых ЛНЧ. В случае избытка липида (высокое значение N/P) будет формироваться липидное ядро частицы, в которое будут встраиваться комплексы РНК с ионизируемым липидом. Наличие внутри частиц РНК, связанной с липидом, подтверждается также данными ЯМР на ядрах ^{31}P : при нахождении внутри частиц на спектре пропадает характерный пик РНК, который отчетливо виден для свободной молекулы [18]. На ЯМР-спектре также присутствует размытый пик фосфолипидов, который становится наиболее интенсивным при разрушении частиц. Это указывает на то, что внутри ЛНЧ и нуклеиновая кислота, и липиды, находятся в малоподвижном состоянии.

В работе [19] сделан акцент на последующие изменения, происходящие с липидными частицами в результате смешения. После получения частиц микрофлюидным методом их оставляли при комнатной температуре (20–23 °C) на 20 ч. В течение этого времени липидные частицы претерпевали перестройки, способствующие встраиванию молекул нуклеиновой кислоты в частицы. При проведении стабилизации частиц в среде с 50% этанола эффективность процесса также повышалась благодаря большей дестабилизации липидной мембраны. На процесс стабилизации влияет также содержание липида-ПЭГ в частицах. В работе показано, что его высокое содержание (14 мол.%) препятствует перестройкам липидных наночастиц из-за образования структурно-механического барьера. Таким образом, варьируя различные параметры при стабилизации липидных частиц (состав растворителя,



Мольные доли компонентов в липидных наночастицах и липосомах

ДСДМАБ	ДОФХ	Холестерин	С14-ПЭГ
Двухкомпонентные			
30	70	0	0
40	60	0	0
50	50	0	0
60	40	0	0
70	30	0	0
Трехкомпонентные			
50	40	10	0
50	30	20	0
50	20	30	0
50	10	40	0
Четырехкомпонентные»			
50	10	39	1
50	10	36	4
50	10	33	7

Катионное поверхностно-активное вещество дистеароилдиметиламмоний бромид ДСДМАБ (Sigma-Aldrich, США); фосфолипид

диолеилфосфатидилхолин ДОФХ (Avanti Lipids, Великобритания); холестерин (Sigma-Aldrich, США); липид, конъюгированный с полиэтиленгликолем C14-ПЭГ (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (аммонийная соль)) (Avanti Lipids, Великобритания) применяли для формирования липидных наночастиц разного состава. Все липиды растворяли в этиловом спирте и использовали в виде рабочих растворов с концентрацией 40 мг/мл (ДСДМАБ) или 10 мг/мл (ДОФХ, холестерин, C14-ПЭГ). Структурные формулы используемых соединений приведены на рис. 1.

Стоковый раствор ДНК готовили разбавлением раствора ДНК (Деринат®, Россия), состоящей примерно из 300 пар нуклеотидов, до концентрации 2 мг/мл.

Фосфатный буферный раствор PBS (10x) готовили растворением в 1 литре в воды 80,0 г хлорида натрия NaCl, 2,0 г хлорида калия KCl, 14,4 г гидрофосфата натрия Na_2HPO_4 и 2,4 г дигидрофосфата калия KH_2PO_4 .

Формирование комплекса

Комплексы ДНК–ДСДМАБ готовили смешением рабочих растворов ДНК и ДСДМАБ в необходимых соотношениях при нейтральном значении pH 7. Содержание этилового спирта в системе контролировали количеством добавленного спиртового раствора ДСДМАБ. В целях получения необходимого содержания этилового спирта добавляли нужное количество перегнанного этанола.

Получение липидных наночастиц ручным методом

В экспериментах использовали рабочие растворы липидов в этаноле, смешанные в определенных мольных соотношениях (табл. 1). Концентрацию нуклеиновой кислоты в водном растворе рассчитывали исходя из количества катионного липида ДСДМАБ таким образом, чтобы мольное соотношение фосфатных групп нуклеиновой кислоты и молекул катионного липида (далее ДНК : ДСДМАБ) было равно 1:1. Раствор липидов в органическом растворителе добавляли к водному раствору ДНК в соотношении 1:3 при интенсивном перемешивании. Полученную суспензию диализовали в течение 12 ч против фосфатного буфера PBS при комнатной температуре. Готовые частицы хранили при температуре +4 °С.

Формирование липосом

Формирование липосом проводили методом гидратации пленки [20]. Раствор смеси липидов или липидов с комплексом ДНК–ДСДМАБ в органическом растворителе упаривали под вакуумом на ротационном испарителе (ИР-1М2 «Химлабприбор», Россия) Полученную липидную пленку гидратировали при интенсивном перемешивании на вортексе (Multi-Vortex V-32, Biosan, Латвия). Затем получали моноламеллярные липосомы методом экструзии (мини экструдер, Avanti®PolarLipids Inc., США) через мембрану с размером пор 200 нм. Используемые в работе соотношения липидов представлены в табл. 1.

Методы анализа

Для изучения изменения мутности раствора ДНК при добавлении раствора ДСДМАБ регистрировали спектры оптической плотности образцов при разном соотношении компонентов и брали значения на фиксированной длине волны 480 нм, где отсутствует поглощение света компонентами, а имеет место только рассеяние частицами. По данным, полученным при изучении серии образцов, строили график изменения мутности системы. Гидродинамический диаметр (D_h) частиц измеряли методом динамического рассеяния света (ДРС) на приборе NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments, США) при фиксированном угле 90 град. и температуре 25 °С. По результатам трех измерений рассчитывали средний размер частиц D_h и средний индекс полидисперсности PDI. Для оценки гидродинамического диаметра D_h использовали также метод трекинг-анализа наночастиц, используя прибор ZetaView® x30 (Particle Metrix, США). По результатам пяти измерений рассчитывали средний размер частиц, а также их концентрацию в исследуемом образце. Число молекул ДНК, приходящихся на одну наночастицу, рассчитывали по формуле (1):

$$N_{\text{ДНК}} = \frac{m_0 \cdot EE}{C_{\text{частиц}} \cdot \frac{m_H \cdot n_H}{N_A}}, \quad (1)$$

где $N_{\text{ДНК}}$ – число молекул ДНК, приходящихся на одну частицу, m_0 – масса ДНК, исходно взятая для получения частиц, EE – эффективность инкапсуляции ДНК в частицы, $C_{\text{частиц}}$ – концентрация частиц в образце, N_A – число Авогадро, m_H – средняя масса одной пары нуклеотидов, n_H – число пар нуклеотидов в молекуле ДНК.

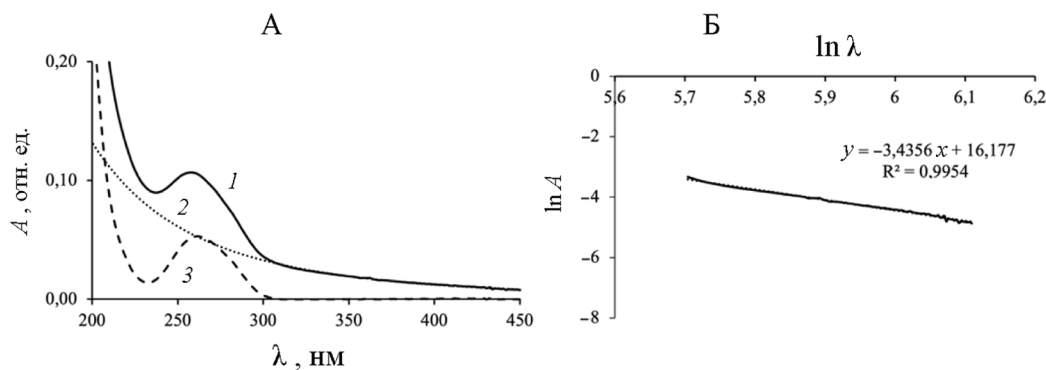


Рис. 2. А – спектр оптической плотности для образца частиц с инкапсулированной ДНК (кривая 1), вклад рассеяния, рассчитанный по уравнению Геллера (кривая 2), вклад ДНК в оптическую плотность образца после вычета вклада рассеяния (кривая 3); Б – логарифмическое представление зависимости оптической плотности от длины волны для нахождения параметров уравнения Геллера

Измерение ζ -потенциала частиц проводили методом лазерного микроэлектрофореза на приборе NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments, США). По результатам трех измерений рассчитывали среднее значение ζ -потенциала.

Определение содержания ДНК в частицах

Для определения содержания ДНК в образцах использовали однолучевой спектрофотометр (Agilent 8453, Agilent Technologies, США). Макромолекулы ДНК имеют характерный пик поглощения в области 260 нм, по которому можно определить концентрацию ДНК в исследуемом образце. При измерении поглощения суспензии наночастиц в интенсивность пика с максимумом при 260 нм вносит вклад рассеяние света образцом, в результате чего значения оказываются завышенными. Для учета вклада рассеяния образца использовали уравнение Геллера (2) [21], применимое для рассеяния Ми ($1/20 < r/\lambda < 1/3$, r – размер частиц):

$$A = m \cdot \lambda^{-x}, \quad (2)$$

где A – оптическая плотность (отн. ед.), m и x – константы, λ – длина волны (нм).

Для нахождения коэффициентов m и x использовали логарифмическую форму уравнения Геллера в интервале длин волн от 350 до 500 нм. Полученную зависимость аппроксимировали линейной функцией, угол наклона которой был равен $-x$, а свободный член – $\lg A$ (рис. 2, Б). Найденные коэффициенты позволили оценить вклад рассеяния в оптическую плотность в области 260 нм (D_{260}). Вклад поглощения молекулами ДНК в оптическую плотность образца определяли по формуле (3), где $A_{\text{ДНК}}$ – вклад поглощения молекулами ДНК

на длине волны 260 нм, A_{260} – оптическая плотность образца на длине волны 260 нм, D_{260} – вклад рассеяния частицами на длине волны 260 нм:

$$A_{\text{ДНК}} = A_{260} - D_{260}.$$

Пример обработки экспериментальных данных приведен на рис. 2:

В приведенном примере (рис. 2, А) с учетом рассеяния интенсивность пика в области 260 нм составила $A_{260} = 0,1062$, а вклад рассеяния при 260 нм составил $D_{260} = 0,0536$. Следовательно, поглощение молекулами ДНК

$$A_{\text{ДНК}} = 0,1062 - 0,0536 = 0,0526,$$

что свидетельствует о наличии молекул ДНК в образце. Эффективность инкапсуляции ДНК (ЕЕ) рассчитывали по формуле (3):

$$EE\% = \frac{A_{260}(\text{образец}) - D_{260}(\text{образец})}{A_{260}(\text{ДНК исходная})} \cdot 100\%, \quad (3)$$

где $A_{260}(\text{образец})$ – оптическая плотность образца при 260 нм, $D_{260}(\text{образец})$ – вклад рассеяния образца при 260 нм, $A_{260}(\text{ДНК исходная})$ – оптическая плотность при 260 нм раствора ДНК с концентрацией, взятой для приготовления частиц.

Результаты и обсуждение

Электростатическое взаимодействие отрицательно заряженных фосфатных групп нуклеиновой кислоты и положительно заряженных атомов азота ионизируемых катионных липидов является одной из причин формирования липидных наночастиц, содержащих нуклеиновую кислоту. Для изучения различных способов формирования частиц удобно выбрать липид, имеющий в своем составе четвертичный атом азота, который

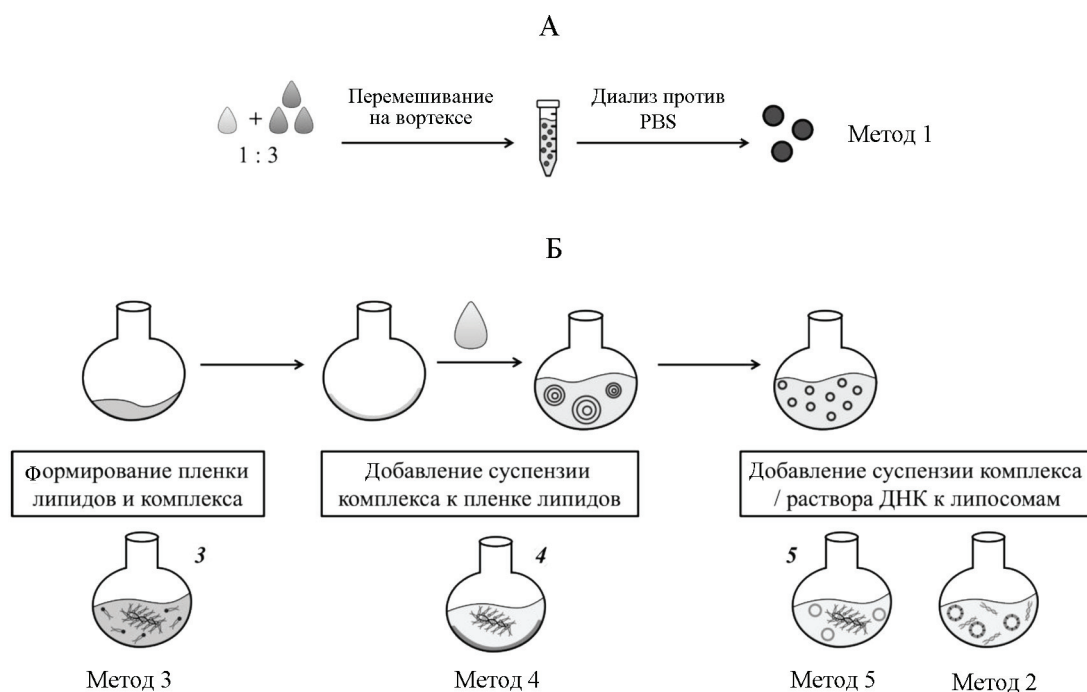


Рис. 3. Методы получения частиц: А – метод ручного смешения (1); Б – введение ДНК на основных стадиях получения частиц: гидратация предварительно сформированной пленки липидов и комплекса (3), гидратация пленки липидов водной суспензией комплекса (4), смешение липосом с водной суспензией комплекса (5), смешение липосом с водным раствором ДНК, т.е. образование липоплексов (2)

имеет положительный заряд вне зависимости от величины pH среды. В качестве такого липида был выбран дистеароилдиметиламмоний бромид (ДСДМАБ), который помимо четвертичного атома азота имеет схожую структуру со многими коммерчески используемыми липидами. В качестве нуклеиновой кислоты была выбрана дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), поскольку она обладает хорошей стабильностью и меньшей требовательностью к условиям работы по сравнению с РНК. В работе использовали двуцепочечную ДНК «Деринат»®, содержащую 300 пар нуклеотидов [22]. Отметим, что в литературе хорошо изучены комплексы ДСДМАБ с ДНК, а именно: концентрации начала образования комплексов, их морфология и способность к редиспергированию в органических растворителях [23–26].

Формирование липидных частиц с инкапсулированной ДНК проводили следующими способами (рис. 3):

- 1) ручное смешение;
- 2) образование липоплексов;
- 3) гидратация пленки липидов и комплекса ДНК–ДСДМАБ;
- 4) гидратация пленки липидов водной суспензией комплекса ДНК–ДСДМАБ;

5) смешение липосом с водной суспензией комплекса ДНК–ДСДМАБ.

Как было отмечено ранее, загрузка нуклеиновой кислоты в липидные наночастицы происходит главным образом за счет ее связывания с ионизируемым катионным липидом при образовании гидрофобного комплекса, поэтому сначала было изучено формирование комплекса ДНК–ДСДМАБ.

Комплекс ДНК–ДСДМАБ

За взаимодействием ДСДМАБ с ДНК следили по изменению оптической плотности на длине волны 480 нм (мутности) в системе при постепенном добавлении катионного ПАВ к раствору нуклеиновой кислоты. Соотношение компонентов характеризовалось параметром N/P, равным отношению числа молей атомов азота катионного липида ДСДМАБ (N) к числу молей фосфатных групп ДНК (P), что эквивалентно соотношению $n(\text{ДСДМАБ}) : n(\text{ДНК})$. Полученная зависимость представлена на рис. 4:

Как видно из рис. 4, при добавлении к исходному раствору ДНК даже небольшого количества ДСДМАБ происходит возрастание мутности. Увеличение мутности в системе связано с

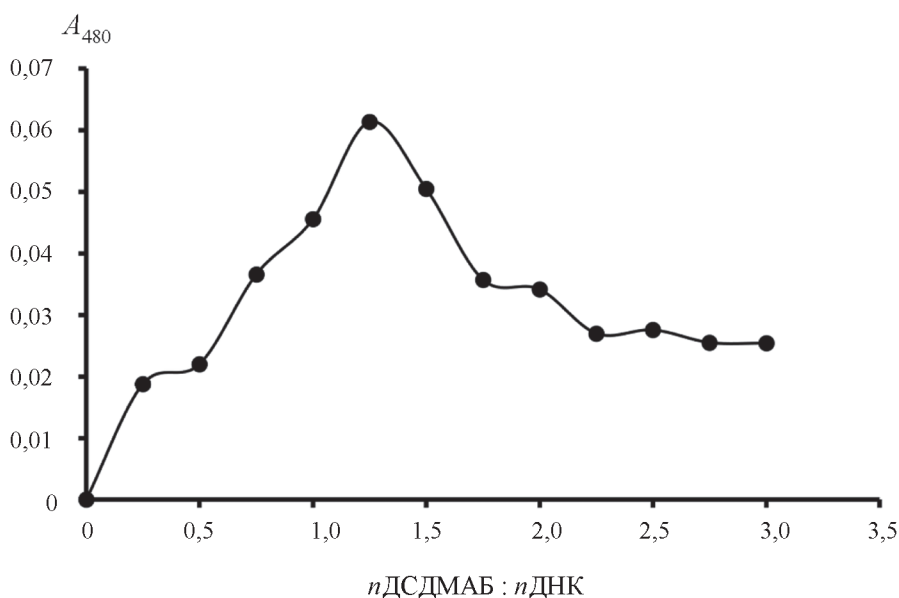


Рис. 4. Изменение мутности раствора ДНК при добавлении раствора ДСДМАБ; $C_{\text{ДНК}} = 0,05$ мг/мл

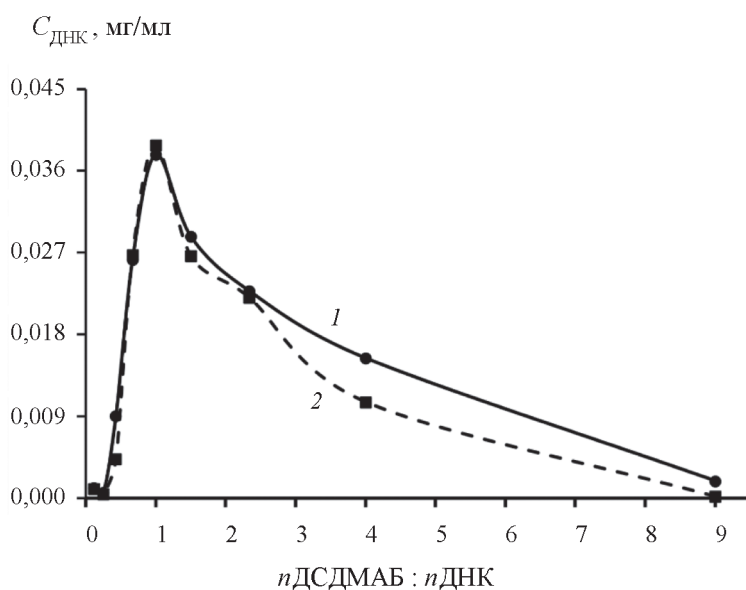


Рис. 5. Определение состава комплекса ДНК–ДСДМАБ в водно-спиртовой среде методом изомолярных серий

образованием нерастворимого комплекса ДНК–ДСДМАБ. Положительно-заряженные атомы азота катионного липида взаимодействуют с отрицательно-заряженными фосфатными группами ДНК, в результате чего образуется нерастворимый полимер-коллоидный комплекс [23]. Дальнейшее добавление ДСДМАБ приводит к уменьшению мутности, что связано с дезагрегацией полимер-коллоидных комплексов ДНК–ДСДМАБ за счет дополнительной адсорбции молекул ДСДМАБ на

гидрофобную поверхность комплекса и его гидрофилизации.

Из литературы [22] известно, что при взаимодействии ДСДМАБ с ДНК в водной среде образуется комплекс состава, близкого к стехиометричному (1:1). Так как при получении липидных наночастиц взаимодействие компонентов происходит в водно-спиртовой среде, мы определили состав комплекса ДНК–ДСДМАБ при двух фиксированных значениях количества этанола

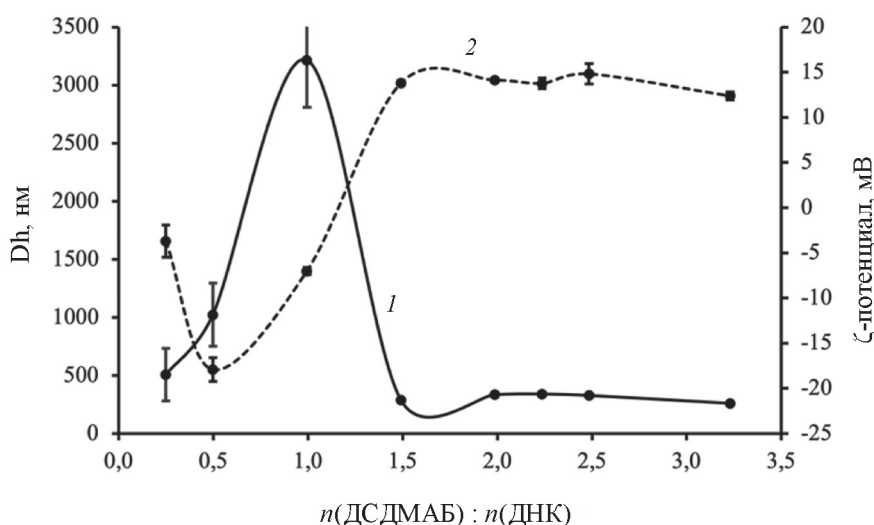


Рис. 6. Размер (1) и ζ -потенциал (2) комплексов ДСДМАБ–ДНК в интервале соотношений $n(\text{ДСДМАБ}) : n(\text{ДНК})$ от 0,25 до 3,2

(6 и 25 об.%), соответствующих аналогичному содержанию этанола в системе при получении ЛНЧ. Для определения состава комплекса использовали метод изомолярных серий, который заключается в фиксировании общего количества компонентов при варьировании их соотношения. По положению максимума (рис. 5) концентрации ДНК в комплексе относительно соотношения компонентов был определен состав комплекса ДНК–ДСДМАБ как 1:1. Таким образом, наличие в системе менее полярного растворителя этанола не влияет на состав комплекса ДНК–ДСДМАБ.

Так как методы формирования частиц (3, 4 и 5) предполагают использование предварительно

сформированного комплекса ДСДМАБ–ДНК в виде суспензий как в водной, так и в органической средах, мы более подробно изучили физико-химические характеристики частиц, находящихся в системах с соотношением ДСДМАБ : ДНК от 0,25 до 3,2 (рис. 6).

На рис. 6 видно, что при увеличении количества ДСДМАБ в системе размеры комплексов (кривая 1) проходят через максимум при соотношении компонентов 1:1, соответствующему образованию нейтрально заряженного комплекса. При дальнейшем добавлении катионного липида (соотношение ДСДМАБ : ДНК > 1) размеры комплексов уменьшаются и достигают значений

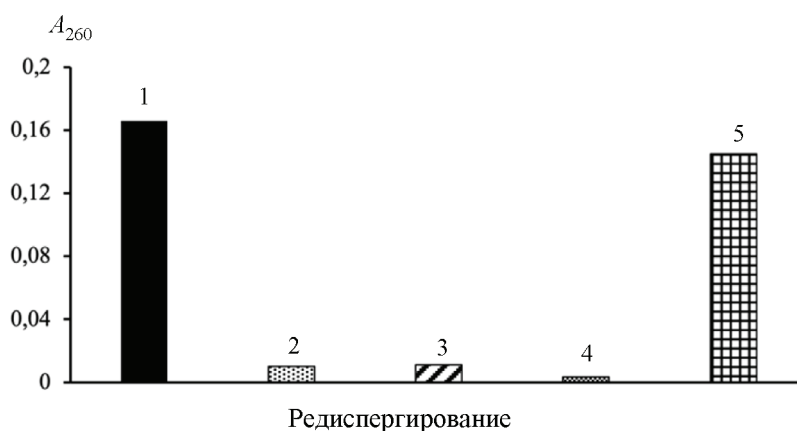


Рис. 7. Редиспергирование комплекса ДНК : ДСДМАБ (1:1) (1 – суспензия комплекса в воде до центрифугирования, 2 – надосадочная жидкость после центрифугирования; 3 – суспензия комплекса после редиспергирования в воде, 4 – суспензия комплекса после редиспергирования в этаноле, 5 – суспензия комплекса после редиспергирования в хлороформе)

около 300 нм. Зависимость размеров частиц от соотношения ДСДМАБ : ДНК в системе хорошо согласуется с зависимостью мутности от соотношения компонентов (рис. 4). При увеличении количества ДСДМАБ происходит нейтрализация отрицательных зарядов молекулы ДНК молекулами катионного ПАВ, в результате чего ζ -потенциал комплексов становится равен нулю (рис. 6, кривая 2). Дальнейшее увеличение количества ДСДМАБ в системе приводит к перезарядке частиц и увеличению ζ -потенциала до 15 мВ, что, вероятно, связано с гидрофилизацией комплекса и, следовательно, дезагрегацией полимер-коллоидного комплекса.

Для комплекса состава 1:1 была изучена возможность редиспергирования в водной и органических средах. Предварительно сформированный комплекс состава 1:1 выделяли путем центрифугирования, а затем редиспергировали в наиболее популярных растворителях, использующихся при формировании липидных наночастиц (воде, этаноле и хлороформе). Эффективность редиспергирования определяли по интенсивности полосы поглощения в области 260 нм для полученных образцов (рис. 7). На рис. 7 показано, что комплекс ДСДМАБ : ДНК = 1:1 в воде и этаноле практически не редиспергируется, при этом при редиспергировании осадка комплекса в хлороформе наблюдали практически полный переход нерастворимого комплекса в раствор, что также хорошо согласуется с литературными данными для комплекса дистеароилдиметиламмоний хлорида с ДНК [24]. Таким образом, с помощью хлороформа комплекс ДСДМАБ–ДНК можно с высокой эффективностью (более 90%) реди-

спергировать и использовать для приготовления липидной пленки, содержащей комплекс. Важно подчеркнуть, что редиспергирование комплекса ДСДМАБ–ДНК в хлороформе подтверждает его гидрофобность и дает практическое обоснование возможности формирования ЛНЧ, содержащих нуклеиновую кислоту, способом 3.

Двухкомпонентные частицы с инкапсулированной ДНК

Классическим способом формирования липидных наночастиц является смешение спиртового раствора липидов с водным раствором нуклеиновой кислоты с последующим диализом суспензии наночастиц для удаления спирта из системы.

Для формирования двухкомпонентных наночастиц использовали следующие липиды: фосфолипид диолеилфосфатидилхолин (ДОФХ), широко используемый при получении ЛНЧ, и катионное ПАВ ДСДМАБ. Была приготовлена серия двухкомпонентных наночастиц, содержащих от 30 до 70 мол.% ДСДМАБ, и фиксированным соотношением $N/P = 1$, где N – число молей атомов азота катионного липида, P – число молей отрицательно заряженных фосфатных групп нуклеиновой кислоты. Для всех полученных частиц были определены размеры (D_h), величины дзета-потенциала, а также измерены спектры поглощения. На рис. 8 представлены характерные спектры оптической плотности и дифференциального распределения размеров частиц по интенсивности, содержащих 60 мол.% ДСДМАБ.

На спектре оптической плотности (рис. 8, А) отчетливо виден пик поглощения с максимумом на 260 нм, соответствующий поглощению молекул

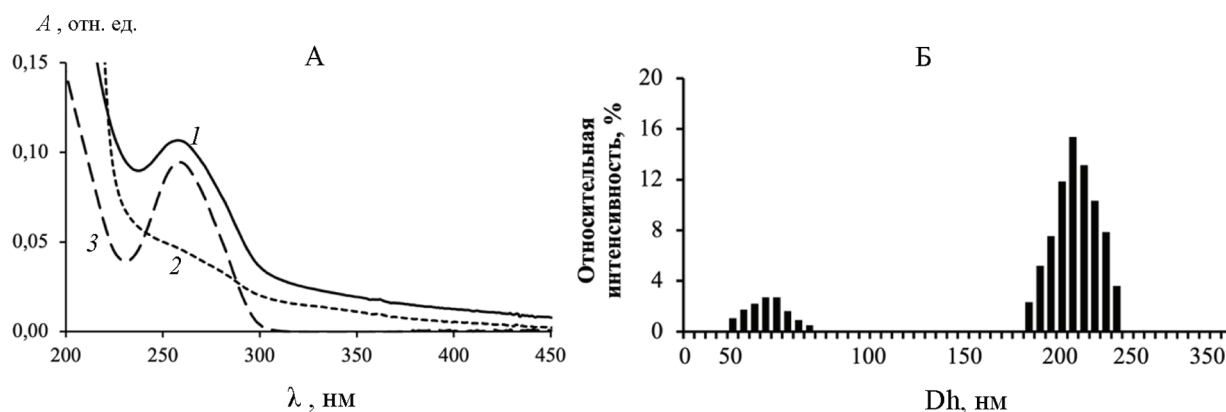


Рис. 8. (А) Спектры оптической плотности для двухкомпонентных частиц, полученных методом ручного смешения, содержащих (кривая 1) и не содержащих (кривая 2) ДНК; $C_{\text{ДНК}} = 0,005$ мг/мл (кривая 3). (Б) Распределение размеров двухкомпонентных частиц по интенсивности. Содержание ДСДМАБ 60 мол.%, соотношение $N/P = 1$

ДНК. На спектре также хорошо виден вклад рассеяния частиц в оптическую плотность на длинах волн выше 300 нм. Из-за вклада рассеяния частиц величина оптической плотности в области 260 нм не позволяет сделать однозначный вывод о количественном содержании ДНК в системе. Для качественной оценки наличия ДНК в образце был определен вклад поглощения молекулами ДНК при 260 нм, $A_{\text{ДНК}}$ (см. Экспериментальную часть). Для двухкомпонентных липидных частиц, содержащих 60 мол.% ДСДМАБ, $A_{\text{ДНК}}$ составил 0,0448, что соответствует концентрации ДНК в образце, равной 0,1377 мг/мл. Для липидных наночастиц, полученных классическим методом ручного смешения характерна эффективная (более 90%) инкапсуляция молекул нуклеиновых кислот [1]. Таким образом, мы предполагаем, что для всех частиц, полученных методом ручного смешения, вклад поглощения ДНК в оптическую плотность образцов дают молекулы ДНК, инкапсулированные в частицы.

Помимо характерных размеров около 200 нм (рис. 8, Б), в системе также обнаружено небольшое число частиц с размером около 60 нм. Известно, что для частиц, полученных ручным методом смешения, характерно присутствие фракции малых размеров [27, 28]. Поэтому наличие фракции частиц с размером 60 нм указывает на то, что при добавлении раствора липидов в этаноле к водному раствору ДНК на первой стадии происходит образование плоских бислойных фрагментов размером 60 нм, из которых затем формируются ЛНЧ. Из-за возникающей неоднородности

в системе в начальный момент смешения часть образовавшихся бислойных фрагментов формируют собственные частицы небольшого размера, которые сохраняются в системе в течение минимум 1,5 месяцев. В табл. 2 представлены размеры (D_h), заряд поверхности, $A_{\text{ДНК}}$ и значения эффективности инкапсуляции ДНК для всех полученных частиц.

Из табл. 2 видно, что все частицы имеют размер около 200 нм и положительный заряд поверхности, а ДНК присутствовала во всех образцах. Количество связанной в частицы ДНК практически не менялось в течение нескольких дней, что свидетельствует о способности полученных частиц удерживать нуклеиновую кислоту. При увеличении содержания ДСДМАБ в частицах наблюдалось увеличение эффективности инкапсуляции, однако величины инкапсуляции ДНК все равно оставались достаточно низкими, не более 5%. Это объясняется влиянием двух факторов. Во-первых, это может быть связано с состоянием молекулы ДНК в водно-спиртовой среде в момент смешения: при концентрации этанола 25% снижается диэлектрическая проницаемость воды, в результате чего ДНК начинает частично конденсироваться, переходя в более компактные метастабильные структуры [29–31]. Такие структуры молекул ДНК обладают меньшей доступностью для связывания с катионным ПАВ, поэтому при формировании частиц липиды взаимодействуют преимущественно с неконденсированными молекулами ДНК. В результате формируются липидные

Т а б л и ц а 2

Размеры, ζ -потенциал, $A_{\text{ДНК}}$ и эффективность инкапсуляции ДНК липидных наночастиц ДОФХ–ДСДМАБ, полученных ручным методом

Мольная доля ДСДМАБ, %	Число дней после получения	D_h , нм	ζ , мВ	$A_{\text{ДНК}}$	EE, %
30	0	307 ± 36	37 ± 1	0,0178	1,9
	4	229 ± 4	32 ± 2	0,0177	1,9
40	0	232 ± 8	38 ± 3	0,0202	2,1
	4	210 ± 1	31 ± 3	0,0202	2,1
50	0	222 ± 4	26 ± 1	0,0179	1,8
	4	215 ± 1	33 ± 4	0,0173	1,8
60	0	179 ± 5	20 ± 1	0,0448	4,7
	4	185 ± 1	27 ± 1	0,0447	4,6
70	0	241 ± 38	36 ± 4	0,0508	5,1
	4	194 ± 5	35 ± 3	0,0506	5,1

частицы с меньшим содержанием инкапсулированной нуклеиновой кислоты. Нельзя также исключать тот факт, что конденсированные молекулы ДНК могут адсорбироваться на стенках сосуда и на диализной мембране, из-за чего их нельзя обнаружить в растворе.

Во-вторых, классические ЛНЧ имеют в своем составе дополнительные липиды, такие как холестерин и липид-ПЭГ, способствующие оптимальной организации липидного ядра и сохранению инкапсулированной нуклеиновой кислоты. Отсутствие этих компонентов также могло повлиять на снижение эффективности инкапсуляции молекул ДНК.

Второй способ формирования липидных наночастиц с ДНК (смешение катионных липосом с водным раствором нуклеиновой кислоты) является известным методом получения липоплексов – комплексов нуклеиновых кислот с липосомами. При взаимодействии катионных липосом с молекулами ДНК происходит их полная структурная перестройка: моноламеллярные везикулы переходят в упорядоченные мультламеллярные липоплексы, состоящие из чередующихся липидных бислоев и молекул ДНК [32]. Такая организация формируется вне зависимости от липидного состава катионных липосом и определяется главным образом электростатическим связыванием с молекулами ДНК [33]. Таким образом, образование липоплексов сопровождается универсальной переорганизацией мембран, не зависящей от состава и фазы липидного бислоя.

Для изучения липоплексов были сформированы липосомы ДОФХ–ДСДМАБ с различным содержанием ДСДМАБ (30, 40, 50, 60 и 70 мол.%). Введение в состав липосом ДСДМАБ с

температурой фазового перехода 45 °С [34] (температура фазового перехода ДОФХ составляет –17 °С [35]) меняет структуру и фазовое состояние мембраны. Известно, что при температуре ниже фазового перехода смешанного липидного бислоя липид с большей температурой фазового перехода при его содержании от 30 мол.% формирует рафты – островки, состоящие из этого липида в гель-фазе [36, 37]. Предположительно, температура фазового перехода всех изученных нами двухкомпонентных липосом выше температуры, при которой проводили эксперименты. Соответственно, структура мембран липосом отличается только размером и количеством рафтов, состоящих из ДСДМАБ, что не будет принципиально менять характер взаимодействия липосом с ДНК при формировании липоплексов. Липоплексы формировались с разным молярным соотношением ДНК к ДСДМАБ: 0; 0,1; 0,4; 0,7; 1,0; 1,3. Для всех полученных липоплексов были определены размеры и ζ -потенциал (рис. 9). Для липоплексов, вне зависимости от содержания ДСДМАБ, наблюдается увеличение размеров частиц при увеличении количества ДНК. При достижении соотношения ДНК : ДСДМАБ = 1 происходит сильное помутнение образца с постепенным образованием осадка (рис. 9, А, темные столбики). Для некоторых липоплексов (60 и 70 мол.% ДСДМАБ) образование осадка происходило при достижении соотношения ДНК : ДСДМАБ = 0,7. По-видимому, это вызвано неравномерным распределением ДСДМАБ во внутреннем и внешнем слоях липидного бислоя исходных катионных липосом. Дальнейшее увеличение количества ДНК приводит к восстановлению агрегативной устойчивости системы и уменьшению размеров

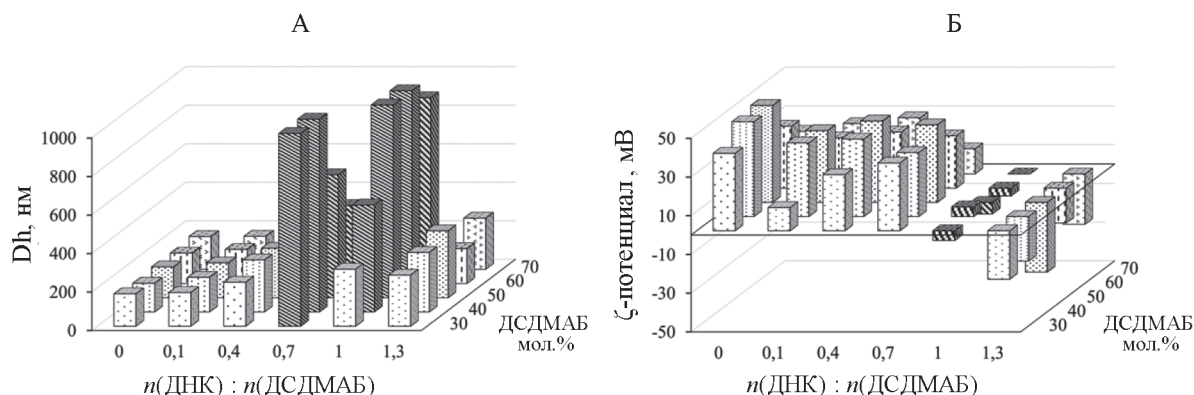


Рис. 9. Размер (А) и ζ -потенциал (Б) частиц полученных липоплексов ДОФХ–ДСДМАБ–ДНК с разным содержанием компонентов

липоплексов. Эти данные хорошо согласуются с величинами ζ -потенциала полученных липоплексов. Катионные липосомы имеют большой положительный заряд (от 20 до 57 мВ), а при постепенном увеличении количества ДНК в системе происходит уменьшение величины заряда с последующей сменой его знака. В случае, когда величина ζ -потенциала приближается к нулю, происходит резкое увеличение размеров частиц до 2 мкм, связанное с коагуляцией комплексов. Когда количество связанной с частицами ДНК возрастает, начинается процесс дезагрегации и восстановления агрегативной устойчивости, вызванный появлением электростатического отталкивания одноименно-заряженных частиц. Важно отметить, что размеры значительной части липоплексов не превышают 300 нм, следовательно, существует потенциальная возможность использовать такие частицы в биомедицинских целях.

Для оценки стабильности липоплексов следили за изменением размера и ζ -потенциала липоплексов в течение нескольких дней. Липоплексы, имеющие ζ -потенциал 0 ± 5 мВ, агрегативно неустойчивы и выпадают в осадок. Это относится ко всем липоплексам с соотношением ДНК : ДСДМАБ = 1. Также неустойчивыми были липоплексы с соотношением ДНК : ДСДМАБ = 0,7 и мольной долей ДСДМАБ 30 и 40% соответственно. Большинство полученных липоплексов сохраняло размеры и заряд поверхности постоянными в течение как минимум одной недели, что свидетельствует о стабильности полученных комплексов.

Третий способ формирования двухкомпонентных липидных частиц с ДНК – гидратация пленки, содержащей ДОФХ и комплекс ДНК–ДСДМАБ состава 1:1. Содержание ДСДМАБ варьировали от 30 до 70 мол.% от общего количества липидов

(ДОФХ и ДСДМАБ) (табл. 1). Размеры (D_h), индекс полидисперсности (PDI), величины ζ -потенциала, $A_{\text{ДНК}}$ и эффективность инкапсуляции ДНК в частицы приведены в табл. 3.

Из табл. 3 следует, что вне зависимости от содержания ДСДМАБ все частицы имели близкие значения размера и индекса полидисперсности, а величина заряда частиц закономерно возрастала с долей катионного ПАВ. С увеличением содержания катионного ДСДМАБ возрастала и его доля на поверхности частиц, что и обуславливало рост величины ζ -потенциала. Вклад поглощения молекулами ДНК в случае двухкомпонентных частиц, полученных способом 3, оказался равным нулю, что свидетельствует об отсутствии инкапсулированной частицы ДНК. Вероятно, комплекс ДНК–ДСДМАБ не смог равномерно распределиться в липидной пленке на стадии выпаривания растворителя и последующей ее гидратации. В водной фазе из-за больших размеров (до 2 мкм) частицы комплекса не могли пройти через поры мембраны экструдера (200 нм), из-за чего были удалены из системы. Однако во время выпаривания растворителя, вероятно, происходила частичная перестройка гидрофобного комплекса, и часть катионного ДСДМАБ оказалась включенной в липидную пленку формируемых частиц, о чем свидетельствуют значения ζ -потенциала полученных частиц (табл. 3).

Четвертый способ получения частиц – гидратация пленки ДОФХ водной суспензией комплекса ДНК–ДСДМАБ (1:1). Физико-химические характеристики частиц, полученных этим способом (табл. 4), близки по значениям к таковым для частиц, полученных третьим способом (см табл. 3). Отсутствие вклада поглощения молекулами ДНК в области 260 нм

Таблица 3

Размеры, PDI, ζ -потенциал, $A_{\text{ДНК}}$ и эффективность инкапсуляции частиц, полученных при гидратации пленки ДОФХ и комплекса ДНК–ДСДМАБ

Образец	Мольная доля ДСДМАБ, %	D_h , нм	PDI	ζ , мВ	$A_{\text{ДНК}}$	EE, %
30-1	30	190 ± 8	0,190	8 ± 2	0	–
40-1	40	185 ± 1	0,129	16 ± 1	0	–
50-1	50	184 ± 6	0,211	23 ± 2	0	–
60-1	60	187 ± 10	0,312	28 ± 2	0	–
70-1	70	186 ± 13	0,321	35 ± 2	0	–

Т а б л и ц а 4

Размеры, PDI, ζ -потенциал частиц, $A_{\text{ДНК}}$ и эффективность инкапсуляции частиц, полученных при гидратации пленки ДОФХ водной суспензией комплекса ДНК–ДСДМАБ

Образец	Мольная доля ДСДМАБ, %	D_h , нм	PDI	ζ , мВ	$A_{\text{ДНК}}$	EE, %
30-1	30	253 ± 7	0,203	4 ± 2	0,0012	0,23
40-1	40	209 ± 2	0,178	1 ± 2	0,0039	0,47
50-1	50	199 ± 1	0,083	11 ± 2	0,0071	1,45
60-1	60	195 ± 5	0,293	15 ± 2	0	–
70-1	70	183 ± 4	0,094	29 ± 1	0	–

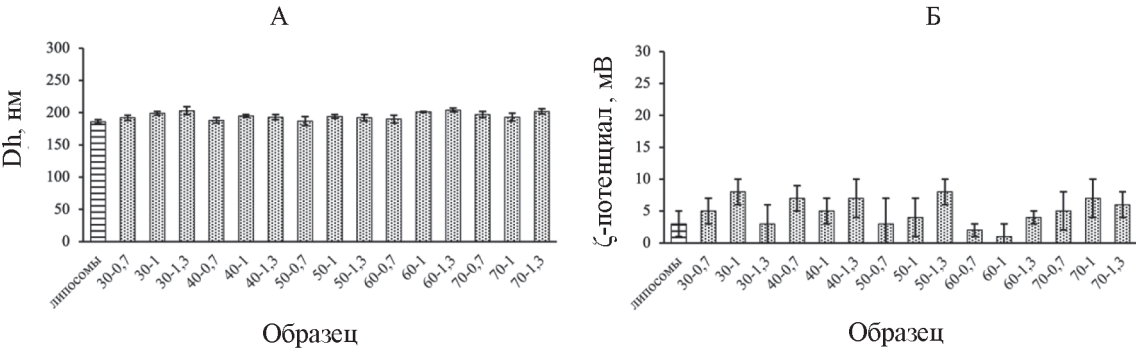


Рис. 10. Размер (А) и ζ -потенциал (Б) частиц, полученных смешением липосом ДОФХ и водной суспензии комплекса

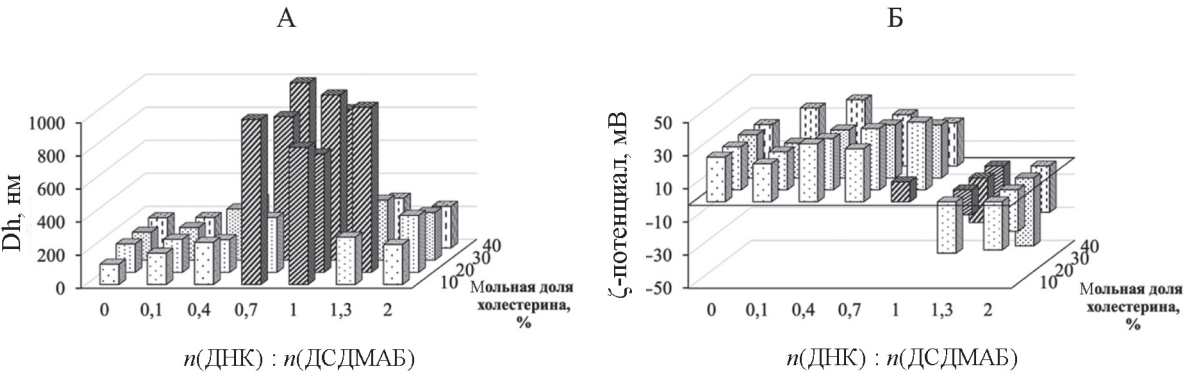


Рис. 11. Размер (А) и ζ -потенциал (Б) частиц липоплексов ДОФХ–ДСДМАБ–холестерин с ДНК при разном соотношении компонентов

($A_{\text{ДНК}}$) для этих частиц указывает на то, что получить частицы с инкапсулированной ДНК таким способом нельзя.

При пятом способе получения частиц, смешении липосом из ДОФХ и водной суспензии

комплекса ДНК–ДСДМАБ (1:1), взаимодействие между липосомами и комплексом практически полностью отсутствовало. Об этом свидетельствуют практически идентичные размеры липосом и частиц в образце после смешения

ния липосом и комплекса, а также значения ζ -потенциала (рис. 10), т.е. при прямом смешении комплекс не может инкапсулироваться в липосомы.

Таким образом, из всех описанных подходов получения модельных ЛНЧ с инкапсулированной ДНК наиболее перспективными оказались ручной метод формирования ЛНЧ (метод 1) и образование липоплексов (метод 2). Для дальнейших исследований мы также будем использовать гидратацию пленки липидов и комплекса (метод 3), поскольку отсутствие сигнала ДНК может объясняться низкой концентрацией, которую мы не можем зафиксировать из-за рассеяния образца.

**Трехкомпонентные частицы
с инкапсулированной ДНК**

Следующий важный компонент липидных наночастиц – холестерин, который отвечает за жесткость липидной мембраны и придает ЛНЧ структурную стабильность. Мольная доля холестерина в ЛНЧ варьируется в каждом конкретном случае, но обычно не превышает 40%. Поэтому для исследования модельных частиц было выбрано содержание холестерина в 10, 20, 30 и 40 мол.%. Доля катионного компонента (ДСДМАБ) составила 50 мол.%, а доля фосфолипида (ДОФХ) ме-

нялась от 40 до 10 мол.% (табл. 1). В табл. 5 представлены размеры частиц, ζ -потенциал, значения параметра $A_{\text{ДНК}}$ и эффективность инкапсуляции ДНК в частицы.

Из полученных данных видно, что все образцы после получения имели схожие размеры 170–200 нм и близкие значения ζ -потенциала от 10 до 31 мВ. По-видимому, содержание холестерина в частицах практически не имеет влияния на размер и поверхностный заряд трехкомпонентных ЛНЧ, полученных ручным методом смешения (метод 1). При этом с ростом мольной доли холестерина в частицах несколько увеличивалась эффективность инкапсуляции (EE) и для образца с 40 мол.% холестерина достигала 80% в момент получения. Одно из объяснений такого сильного влияния холестерина на эффективность загрузки нуклеиновых кислот в ЛНЧ предложили в работе [4]: холестерин, дополняя геометрию ионизируемого липида, уравнивает плотность заряда на молекуле нуклеиновой кислоты и липидном слое, образуя с ней электростатический комплекс, что приводит к увеличению инкапсуляции НК в ЛНЧ. Таким образом, для изученных нами систем можно сделать вывод о дополнительном влиянии холестерина на эффективность загрузки нуклеиновых кислот в частицы.

Таблица 5

Размеры, ζ -потенциал, $A_{\text{ДНК}}$ и эффективность инкапсуляции ДНК липидных наночастиц ДОФХ, ДСДМАБ и холестерина, полученных ручным методом

Мольная доля холестерина, %	Число недель после получения	Dh, нм	ζ , мВ	$A_{\text{ДНК}}$	EE, %
10	0	185 ± 12	10 ± 1	0,0720	57
	6	178 ± 2	19 ± 3	0,0642	51
	6 + центрифуга	171 ± 1	14 ± 2	0,0544	48
20	0	198 ± 2	26 ± 2	0,0831	65
	6	219 ± 7	26 ± 2	0,0816	62
	6 + центрифуга	171 ± 1	13 ± 1	0,0745	59
30	0	172 ± 4	19 ± 1	0,0639	51
	6	203 ± 6	11 ± 2	0,0541	47
	6 + центрифуга	179 ± 2	9 ± 4	0,0524	42
40	0	177 ± 2	31 ± 3	0,0991	80
	6	194 ± 4	26 ± 3	0,0915	73
	6 + центрифуга	180 ± 2	22 ± 2	0,0833	65

Устойчивость частиц определяли следующим способом: по прошествии 6 недель у образцов были измерены соответствующие параметры (размер частиц, их заряд и эффективность инкапсуляции), затем все образцы были центрифугированы (10 об/мин, 30 минут) и еще раз охарактеризованы. Стоит отметить, что с течением времени вклад поглощения молекул ДНК в области 260 нм практически не менялся, следовательно, и ее концентрация в системе сохранялась, что свидетельствует об устойчивости к сохранению инкапсуляции ДНК в частицах. Практически неизменными остались также размеры частиц, в том числе после центрифугирования. Частицы, сильно увеличившиеся в размерах или изменившие свою структуру, в процессе центрифугирования были удалены из системы, при этом доля таких частиц была очень мала, ввиду незначительных изменений характеристик системы. Для липоплексов, сформированных из липосом, состоящих из ДОФХ, ДСДМАБ, холестерина и ДНК, были определены размеры частиц (D_h) и заряд поверхности (рис. 11).

Как и для липоплексов с двухкомпонентными липосомами, при приближении к соотношению ДНК : ДСДМАБ = 1 наблюдается резкий рост размеров частиц до 2 мкм, вызванный потерей агрегативной устойчивости. Интересно, что в случае трехкомпонентных липосом агрегация липоплексов начинается уже при соотношении ДНК : ДСДМАБ = 0,7. Исключением являются лишь образцы с 20% холестерина. Вероятно, как и в случае с двухкомпонентными липоплексами, это связано с несимметричным распределением липидов в мембране. Величины ζ -потенциалов изменяются закономерно. При небольшом количестве ДНК (соотношение $n(\text{ДНК})$ и $n(\text{ДСДМАБ})$ равно 0,1 и 0,4) они имеют положительные значения, а при избытке (соотношение $n(\text{ДНК})$

и $n(\text{ДСДМАБ})$ равно 1,3 и 2,0) – отрицательные. Интересно, что при соотношении ДНК : ДСДМАБ = 1 не наблюдалось близких к нулю значений ζ -потенциала. Добавление холестерина в состав липосом из ДОФХ оказывает влияние главным образом на механические свойства липидной мембраны, а именно: уменьшает латеральную подвижность липидов и делает мембрану более жесткой, сохраняя при этом липидный бислой в жидко-кристаллическом фазовом состоянии [35, 38, 39]. Мы предполагаем, что из-за повышенной жесткости липидной мембраны затрудняется взаимодействие между одной катионной липосомой и молекулами ДНК. В результате происходит агрегация нескольких катионных липосом в присутствии молекул ДНК, что приводит к резкому увеличению размеров частиц (рис. 11, А), при этом избыточный положительный заряд липосом ничем не компенсируется, т.е. образуется определенная супрамолекулярная структура, которая и дает положительные значения ζ -потенциала. Для липоплексов с соотношением ДНК : ДСДМАБ, равным 1,3 и 2 избыток положительных зарядов взаимодействует с молекулами ДНК, которые покрывают поверхность липосом и дают итоговый отрицательный заряд (рис. 11, Б).

Методом гидратации пленки ДОФХ, холестерина и комплекса ДНК–ДСДМАБ (1:1) (метод 3) с аналогичными соотношениями компонентов были получены частицы. Для них были определены размеры (D_h), индекс полидисперсности, заряд поверхности и вклад в поглощение молекулами ДНК (табл. 6). Как видно из табл. 6, значения ζ -потенциала частиц возрастают по мере увеличения мольной доли холестерина. По-видимому, это связано с формированием ядра частиц, обогащенного молекулами холестерина, что вызывает «выталкивание»

Т а б л и ц а 6

Размеры, ζ -потенциал, $A_{\text{ДНК}}$ и эффективность инкапсуляции частиц, полученных при гидратации пленки ДОФХ, холестерина и комплекса ДНК–ДСДМАБ

Мольная доля холестерина, %	D_h , нм	PDI	ζ , мВ	$A_{\text{ДНК}}$	EE, %
10	191 ± 1	0,032	14 ± 3	0	–
20	173 ± 3	0,105	21 ± 3	0,0031	3,3
30	170 ± 2	0,076	29 ± 2	0,0269	28,5
40	181 ± 4	0,102	32 ± 3	0,0406	43,1

части молекул ДСДМАБ в приповерхностный слой частиц. Также с увеличением количества холестерина уменьшается доля фосфолипида ДОФХ, отрицательные заряды фосфатных групп которого также способствуют частичному снижению заряда частиц.

С увеличением содержания холестерина в системе заметно повышалось и содержание ДНК в частицах. Для частиц, содержащих 10 мол.% холестерина, вклад поглощения молекулами ДНК ($A_{\text{ДНК}}$) был нулевым, что свидетельствует об отсутствии инкапсуляции ДНК в частицы. Для остальных образцов происходила загрузка ДНК в частицы, при этом увеличение мольной доли холестерина способствует лучшей инкапсуляции молекул ДНК. Максимальная эффективность инкапсуляции ДНК наблюдалась для частиц, содержащих 40 мол.% холестерина (табл. 6).

Для классических методов инкапсуляции ДНК (ручной метод смешения и формирования липоплексов) эффективность инкапсуляции нуклеиновой кислоты в трехкомпонентные частицы была выше, чем для частиц, полученных методом 3. Однако важно отметить, что добавление холестерина в систему из двух липидов и ДНК позволяет достичь эффективности инкапсуляции ДНК до 43% для частиц, полученные методом 3.

**Четырехкомпонентные частицы
с инкапсулированной ДНК**

Четвертым компонентом ЛНЧ является липид, конъюгированный с полиэтиленгликолем (ПЭГ). В качестве такого вещества использовали 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (С14-ПЭГ). Содержание этого компонента в частицах невелико и обычно не превышает нескольких процентов. В дальнейших экспериментах мольная доля С14-ПЭГ составляла 1, 4 и 7%. Доля катионного компонента и фосфолипида составила 50 и 10 мол.% для ДСДМАБ и ДОФХ соответственно. Содержание холестерина варьировало от 39 до 33 мол.% в зависимости от содержания С14-ПЭГ.

Размеры четырехкомпонентных частиц, полученных ручным методом, составляли около 200 нм вне зависимости от содержания С14-ПЭГ. Интересно, что несмотря на одинаковое содержание катионного ДСДМАБ в частицах, образцы с 1 мол.% С14-ПЭГ имели несколько более высокие значения ζ -потенциала. Вероятно, это обусловлено экранированием положительных зарядов фрагментами ПЭГ при большем содержании С14-ПЭГ. В табл. 7 приведены

Таблица 7

Размеры, PDI, ζ -потенциал, $A_{\text{ДНК}}$ и эффективность инкапсуляции ДНК для четырехкомпонентных частиц, полученных ручным методом

Мольная доля С14-ПЭГ, %	D_h , нм	PDI	ζ , мВ	$A_{\text{ДНК}}$	EE, %
1	203 ± 3	0,270	13±1	0,0431	46
4	187 ± 6	0,241	4±2	0,0556	59
7	183 ± 5	0,283	5±1	0,0552	56

Таблица 8

Размеры, PDI, ζ -потенциал, $A_{\text{ДНК}}$ и эффективность инкапсуляции ДНК для частиц, полученных при гидратации пленки ДОФХ, холестерина, С14-ПЭГ и комплекса ДНК–ДСДМАБ

Мольная доля С14-ПЭГ, %	D_h , нм	PDI	ζ , мВ	$A_{\text{ДНК}}$	EE, %
1	166 ± 7	0,233	8 ± 2	0,0301	32
4	154 ± 3	0,148	4 ± 3	0,0219	26
7	145 ± 4	0,283	4 ± 1	0,0282	30

Т а б л и ц а 9

Число молекул ДНК, приходящихся на одну частицу

Образец	Число частиц в анализируемом образце	Число молекул ДНК на одну частицу
1% С14-ПЭГ, ручной метод	$1,58 \cdot 10^{11}$	266
4% С14-ПЭГ, ручной метод	$4,46 \cdot 10^{10}$	341
7% С14-ПЭГ, ручной метод	$1,16 \cdot 10^{11}$	362
1% С14-ПЭГ липоплекс ДНК:ДСДМАБ 1:1	$2,59 \cdot 10^{10}$	961
4% С14-ПЭГ липоплекс ДНК:ДСДМАБ 1:1	$1,04 \cdot 10^{11}$	539
7% С14-ПЭГ липоплекс ДНК:ДСДМАБ 1:1	$3,91 \cdot 10^{10}$	637
1% С14-ПЭГ, гидратация плёнки	$7,10 \cdot 10^{10}$	248
4% С14-ПЭГ, гидратация плёнки	$5,80 \cdot 10^{10}$	253
7% С14-ПЭГ, гидратация плёнки	$3,80 \cdot 10^{10}$	387

размеры, ζ -потенциал, $A_{\text{ДНК}}$ и эффективность инкапсуляции ДНК для полученных частиц.

Для всех образцов наблюдалась инкапсуляция молекул ДНК в частицы. Следует отметить, что при увеличении содержания липида-ПЭГ в системе наблюдается рост этого параметра, а значит и увеличение эффективности инкапсуляции. Важно отметить, что при использовании оптимальных липидных составов эффективность инкапсуляции как ДНК, так и РНК в липидные наночастицы может достигать значений выше 80%. Так, в работе [40] эффективность инкапсуляции ДНК в частицы, полученные ручным методом, достигала 86%. В другом исследовании [41] с похожей методикой получения ЛНЧ эффективность инкапсуляции мРНК составила 87%.

Для изучения липоплексов были сформированы четырехкомпонентные липосомы, которые смешивались с раствором ДНК в разных соотношениях относительно ДСДМАБ. У полученных липоплексов были определены размеры и ζ -потенциал в день получения и два дня спустя (рис. 12).

В отличие от всех предыдущих липоплексов, при соотношении ДНК : ДСДМАБ = 1 в четырехкомпонентных липоплексах не происходило увеличения размера частиц. Большие агрегаты (более 500 нм) наблюдались только для липоплексов, сформированных липосомами, содержащими 1 и 4 мол.% С14-ПЭГ, при соотношении ДНК : ДСДМАБ, равном 0,4 и 0,7. Для образцов, содержащих 7 мол.% С14-ПЭГ, не наблюдалось

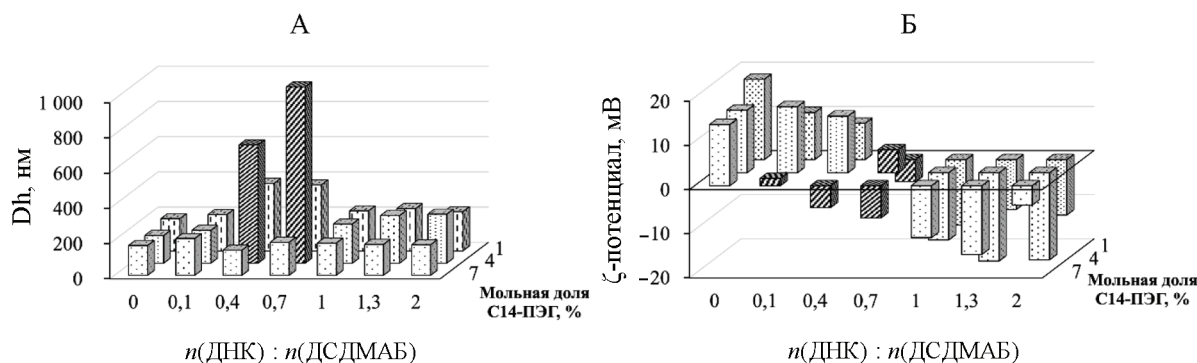


Рис. 12. Размеры D_h (А) и ζ -потенциал (Б) частиц липосом и липоплексов ДОФХ, холестерина, С14-ПЭГ и ДСДМАБ с разным соотношением компонентов

образования частиц более 300 нм. По величинам ζ -потенциала (рис. 12) видно постепенное снижение заряда частиц при увеличении количества ДНК в системе, тем не менее агрегации, как в предыдущих экспериментах, не наблюдалось. Это обусловлено наличием на поверхности цепей полиэтиленгликоля, которые образуют вокруг частиц структурно-механический барьер, препятствующий агрегации. И действительно, даже при близких к нулю зарядах поверхности частиц агрегации не происходит.

В табл. 8 представлены физико-химические характеристики частиц, полученных при гидратации пленки ДОФХ, холестерина, С14-ПЭГ и комплекса ДНК–ДСДМАБ (1:1). Размеры этих частиц близки к четырехкомпонентным липосомам, использованным для формирования липоплексов в предыдущем эксперименте. Величины ζ -потенциала напротив, несколько меньше, чем у липосом, и больше похожи на величины для липоплексов, где доля ДНК составляет 0,4–0,7 от числа молей ДСДМАБ. При увеличении мольной доли С14-ПЭГ происходило небольшое уменьшение количества инкапсулированной ДНК с 32 до 26%. Вероятно, избыточное число цепей полиэтиленгликоля препятствует загрузке комплекса в частицы при гидратации пленки из-за создания стерического барьера. Таким образом, для получения ДНК-содержащих частиц путем гидратации пленки липидов и гидрофобного комплекса ДНК–ДСДМАБ (1:1) достаточно использовать липид, конъюгированный с полиэтиленгликолем в небольших количествах.

Полученные четырехкомпонентные частицы содержали наибольшее количество инкапсулированной ДНК (до 59% для липоплексов) по сравнению со всеми исследуемыми частицами, поэтому для них было определено число молекул ДНК, приходящихся на одну частицу. Для этого использовали метод трекинг-анализа наночастиц, который позволяет определить не только размер частиц, но и их концентрацию. Размеры четырехкомпонентных частиц, полученные методом трекинг-анализа, были схожи с результатами измерения размеров методом динамического светорассеяния. С учетом разбавления образцов, количества использованной ДНК и эффективности инкапсуляции было определено число молекул ДНК, приходящихся на одну частицу (табл. 9).

Интересно, что число молекул ДНК, приходящихся на одну частицу, рассчитанное по формуле (1), возрастает при увеличении мольной доли С14-ПЭГ для ручного метода и метода

гидратации пленки. Таким образом, избыточные молекулы липида-ПЭГ также улучшают инкапсуляцию и способствуют сохранению ДНК внутри частиц. В случае образования липоплексов наблюдается обратная ситуация – при увеличении содержания С14-ПЭГ количество связанной ДНК уменьшается. Это можно объяснить формированием стерического барьера вокруг липоплексов, который препятствует дальнейшему взаимодействию ДНК с липидами. В методах ручного смешения и гидратации пленки стерический барьер формируется уже после инкапсуляции ДНК в частицах.

Таким образом, процесс формирования ЛНЧ происходит синхронно при смешении спиртовой фазы липидов и водной фазы с нуклеиновой кислотой. Важно отметить значительную интенсивность поглощения частиц в области 260 нм, которая указывает на высокое содержание ДНК в системе. По сравнению с альтернативными методами получения ЛНЧ, ручной метод показывает явное преимущество с точки зрения инкапсуляции ДНК. Для достижения сравнимых результатов в методе гидратации пленки необходимо использовать значительное количество липида-ПЭГ, что будет ограничивать целевое применение ЛНЧ – доставку лекарственных препаратов.

Заключение

В работе проведено комплексное исследование сборки липидных наночастиц разного состава с инкапсулированной нуклеиновой кислотой. В ходе исследования установлены закономерности, определяющие эффективность загрузки нуклеиновой кислоты в частицы.

Из всех изученных методов формирования ЛНЧ наилучшие результаты показали ручное смешение и формирование липоплексов. При усложнении системы и введении дополнительных липидов (холестерина и липида, конъюгированного с полиэтиленгликолем) стало возможным получение частиц методом гидратации пленки. Введение в двухкомпонентную липидную смесь (ДОФХ и ДСДМАБ) холестерина привело к увеличению эффективности инкапсуляции до 40%. Введение в систему С14-ПЭГ не только повысило агрегативную устойчивость частиц, но и позволило повысить эффективность инкапсуляции до 60%.

Полученные результаты позволяют уточнить механизм сборки липидных наночастиц в присутствии молекул ДНК и могут быть использованы для дальнейшего изучения и получения систем доставки нуклеиновых кислот с заданными характеристиками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evers M.J.W. et al. State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery // *Small Methods*. 2018. Vol. 2. N 9. P. 1700375 (10.1002/smt.201700375).
2. Aldosari B.N. et al. Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-based Vaccines // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13. N 2. P. 206 (10.3390/pharmaceutics13020206).
3. Kulkarni J.A. et al. Lipid Nanoparticle Technology for Clinical Translation of siRNA Therapeutics // *Accounts of Chemical Research*, 2019. Vol. 52. N 9, P. 2435 (10.1021/acs.accounts.9b00368).
4. Kulkarni J.A. et al. On the Role of Helper Lipids in Lipid Nanoparticle Formulations of siRNA // *Nanoscale*, 2019. Vol. 11. N 45, P. 21733 (10.1039/C9NR09347H).
5. Albertsen C.H. et al. The Role of Lipid Components in Lipid Nanoparticles for Vaccines and Gene Therapy // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022. Vol. 188. P. 114416 (10.1016/j.addr.2022.114416).
6. Liu J.Q. et al. Intratumoral Delivery of IL-12 and IL-27 mRNA Using Lipid Nanoparticles for Cancer Immunotherapy // *Journal of Controlled Release*. 2022. Vol. 345. P. 306 (<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.021>).
7. Hajj K. A. et al. Branched-Tail Lipid Nanoparticles Potently Deliver mRNA In Vivo due to Enhanced Ionization at Endosomal pH // *Small*, 2019. Vol. 15. № 6. P. e1805097 (10.1002/smll.201805097).
8. LoPresti S.T. et al. The Replacement of Helper Lipids with Charged Alternatives in Lipid Nanoparticles Facilitates Targeted mRNA Delivery to the Spleen and Lungs // *Journal of Controlled Release*, 2022. Vol. 345. P. 819 (10.1016/j.jconrel.2022.03.046).
9. Zaborova O.V. et al. Solid Lipid Nanoparticles for the Nucleic Acid Encapsulation // *Reviews and Advances in Chemistry*. 2021. Vol. 11. P. 178 (10.1134/S2079978021030055).
10. Yu H. et al. Ionizable Lipid Nanoparticles for mRNA Delivery: Internal Self-Assembled Inverse Mesophase Structure and Endosomal Escape // *Accounts of Chemical Research*, 2025. Vol. 58. N 20. P. 3210 (10.1021/acs.accounts.5c00522).
11. Vasileva O. et al. Composition of Lipid Nanoparticles for Targeted Delivery: Application to mRNA Therapeutics // *Frontiers in Pharmacology*. 2024. Vol. 15. P. 1466337 (10.3389/fphar.2024.1466337).
12. Kulkarni J.A. et al. On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA: research-article // *ACS Nano*, 2018. Vol. 12. N 5. P. 4787 (10.1021/acs.nano.8b01516).
13. Zhang Z. et al. Molecular Dynamics Simulation of Lipid Nanoparticles Encapsulating mRNA // *Molecules*. 2024. Vol. 29. N 18. P. 4409 (10.3390/molecules29184409).
14. Kulkarni J.A. et al. Fusion-Dependent Formation of Lipid Nanoparticles Containing Macromolecular Payloads // *Nanoscale*. 2019. Vol. 11. N 18. P. 9023 (10.1039/c9nr02004g).
15. Eygeris Y. et al. Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery // *Acc Chem Res*. 2022. Vol. 55. N 1. P. 2 (10.1021/acs.accounts.1c00544).
16. Pink D.L. et al. On the Structure of Solid Lipid Nanoparticles // *Small*, 2019. Vol. 15. N 45. P. e1903156 (10.1002/smll.201903156).
17. Maeki M. et al. Understanding the Formation Mechanism of Lipid Nanoparticles in Microfluidic Devices with Chaotic Micromixers // *PLoS One. Public Library of Science*, 2017. Vol. 12. N 11, P. e0187962 (10.1371/journal.pone.0187962).
18. Leung A.K.K. et al. Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core // *Journal of Physical Chemistry C*, 2012. Vol. 116. N 34, P. 18440 (10.1021/jp303267y).
19. Gindy M.E. et al. Mechanism of Macromolecular Structure Evolution in Self-Assembled Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery // *Langmuir*. 2014. Vol. 30. N 16, P. 4613 (10.1021/la500630h).
20. Zaborova O.V. et al., Liposomes as Nanoreactors for Copper Nanoparticles Synthesis // *Mendelev Communication*, 2023. Vol. 33. N 3. P. 337 (10.1016/j.mencom.2023.04.013).
21. Heller W. et al. Theoretical Investigations on the Light Scattering of Spheres. XIII. The «Wavelength Exponent» of Differential Turbidity Spectra // *The Journal of Chemical Physics*, 1962. Vol. 36. N 5. P. 1163 (10.1063/1.1732710).
22. Liu J. et al. Effects of Derinat on Ischemia-Reperfusion-Induced Pressure Ulcer Mouse Model // *Journal of Pharmacological Sciences*, 2018. Vol. 138. N 2. P. 123 (10.1016/j.jphs.2018.08.013).
23. Mel'nikov S.M. et al. Folding of Long DNA Chains in the Presence of Distearyltrimethylammonium Bromide and Unfolding Induced by Neutral Liposomes // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 1997. Vol. 93. N 2. P. 283 (10.1039/A603753D).
24. Сергеев В.Г. и др. Комплексы ДНК-Поверхностно-Активное Вещество, Растворимые в Малополярных Органических Жидкостях // *Высокомолекулярные Соединения серия А*, 1997. Т. 39. № 1, С. 17.
25. Braun C.S. et al. The Structure of DNA within Cationic Lipid/DNA Complexes // *Biophysical Journal*. 2003. Vol. 84. N 2. P. 1114 (10.1016/S0006-3495(03)74927-3).
26. Pedroso De Lima M.C. et al. Cationic Lipid-DNA Complexes in Gene Delivery: from Biophysics to Biological Applications // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. Vol. 47. P. 277 (10.1016/s0169-409x(01)00110-7).
27. Lombardo D. et al. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14. N 3. P. 543 (10.3390/pharmaceutics14030543).
28. Yang L. et al. Recent Advances in Lipid Nanoparticles for Delivery of mRNA // *Pharmaceutics*, 2022. Vol. 14. N 12. P. 2682 (10.3390/pharmaceutics14122682).

29. Wang Y. et al. Ethanol Induces Condensation of Single DNA Molecules // *Soft Matter*, 2011. Vol. 7. N 9. P. 4425 (10.1039/C0SM01251C).
30. Roy K.B. et al. Ethanol-Induced Condensation of Calf Thymus DNA Studied by Laser Light Scattering // *Journal of Physical Chemistry B*, 1999. Vol. 103. N 24. P. 5117 (10.1021/jp983306p).
31. Сергеев В.Г. и др. Механизм Взаимодействия ДНК с Катионными Поверхностно-Активными Веществами в Водно-Спиртовой Среде и Структура Образующихся Комплексов // *Высокомолекулярные Соединения серия А*. 2003. Т. 45. № 5. С. 814.
32. Koltover I. et al. Phase Diagram, Stability, and Overcharging of Lamellar Cationic Lipid- DNA Self-Assembled Complexes // *Biophysical Journal*. 1999. Vol. 77. N 2. P. 915 (10.1016/S0006-3495(99)76942-0).
33. Elouahabi A. et al. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes // *Molecular Therapy*, 2005. Vol. 11. N 3. P. 336 (10.1016/j.ymthe.2004.12.006).
34. Brito R.O. et al. Neat DODAB Vesicles: Effect of Sonication Time on the Phase Transition Thermodynamic Parameters and its Relation with Incomplete Chain Freezing // *Chemistry and Physics of Lipids*, 2005. Vol. 137. N 1–2. P. 18 (10.1016/j.chemphyslip.2005.05.001).
35. Davis P.J. et al. Differential Scanning Calorimetric Studies of Aqueous Dispersions of Mixtures of Cholesterol with Some Mixed-Acid and Single-Acid Phosphatidylcholines // *Biochemistry*, 1983. Vol. 22. N 26. P. 6334 (10.1021/bi00295a045).
36. Enoki T.A. et al. Experimentally Determined Leaflet–Leaflet Phase Diagram of an Asymmetric Lipid Bilayer // *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 2023. Vol. 120. N 46. P. e2308723120 (10.1073/pnas.2308723120).
37. Domenici F. et al. Temperature-Dependent Structural Changes on DDAB Surfactant Assemblies Evidenced by Energy Dispersive X-ray Diffraction and Dynamic Light Scattering // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012. Vol. 95. P. 170 (10.1016/j.colsurfb.2012.02.037).
38. Filippov A. et al. The Effect of Cholesterol on the Lateral Diffusion of Phospholipids in Oriented Bilayers // *Biophysical Journal*, 2003. Vol. 84. N 5. P. 3079 (10.1016/S0006-3495(03)70033-2).
39. Chakraborty S. et al. How Cholesterol Stiffens Unsaturated Lipid Membranes // *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 2020. Vol. 117. N 36. P. 21896 (10.1073/pnas.200480711).
40. Patel M.N. et al. Preparation and Characterization of Lipid Nanoparticles Co-loaded With DNA and Nitro-Oleic Acid // *Bio-protocol Journal*, 2025. Vol. 15. N 18, P. e5450 (10.21769/BioProtoc.5450).
41. Sakurai Y. et al. pH-Responsive Lipid Nanoparticles Achieve Efficient mRNA Transfection in Brain Capillary Endothelial Cells // *Pharmaceutics*, 2022. Vol. 14. N 8. P. 1560 (10.3390/pharmaceutics14081560).

Информация об авторах

Богдан Донатович Шмыков – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (bogdanshmykov@mail.ru);

Ольга Владимировна Заборова – ст. науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, (zaborovaov@my.msu.ru);

Вадим Александрович Тимошенко – науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, (vat2b2@gmail.com);

Владимир Глебович Сергеев – зав. кафедрой коллоидной химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, (sergeyevvg@gmail.com);

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 10.03.2026;
одобрена после рецензирования 16.03.2026;
принята к публикации 25.03.2026.