

ХАРАКТЕРИСТИКА И ТРАНСФЕКЦИОННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ БИОКОМПОЗИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Самими М.¹, Алимова Ф.К.¹, Абтахи Б.², Валидов Ш.З.¹

¹Институт Фундаментальной Медицины и Биологии, ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия, e-mail: m.samimi@hotmail.com;

²Университет Шахид Бехешти, Тегеран, Иран

Наночастицы, инкапсулированные плазмидной ДНК, состоящие из хитозана, хитозана и альгината, и частицы состава хитозан/альгинат/декстран сульфат, были приготовлены с помощью ионотропного гелеобразования и комплексной коацервации. Размеры всех трех типов наночастиц вариировали в пределах от 174,3 до 196,3 нм. Измерение размеров частиц показало низкие значения индекса полидисперсности (<0,2), что свидетельствует о незначительном разбросе в размерах наночастиц в образцах. Зета-потенциал наночастиц был позитивным от 26.8 до 36.1. Нами не выявлено цитотоксичное влияние наночастиц на клетки линии HEK298. Наночастицы были эффективны в трансфекции плазмидной ДНК: 38.49%, 35.04% и 16.67% клеток экспрессировали GFP при использовании наночастиц состава хитозан/альгинат-декстран сульфат, хитозан/альгинат и хитозан соответственно. Высокая трансфекционная эффективность позволяют предложить данные частицы в качестве носителей ДНК для трансфекции клеток *in vitro*, кроме того отсутствие цитотоксичности свидетельствует о биосовместимости данных частиц и указывает на возможность их использования *in vivo*.

Ключевые слова: биокomпозитные наночастицы, трансфекция, цитотоксичность, носители ДНК, хитозан, альгинат, декстран сульфат.

CHARACTERISTICS AND TRANSFECTION EFFICACY OF DNA-LOADED BIOCOSMPOSITE NANOPARTICLES

Samimi M.¹, Alimova F.K.¹, Abtahi B.², Validov S.Z.¹

¹Institute of Basic Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia, e-mail: m.samimi@hotmail.com

²Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

DNA encapsulated nanoparticles comprising of chitosan, chitosan-alginate, and chitosan- alginate-dextran sulfate were prepared using ionotropic gelation and complex coacervation methods. Particle size in all three preparations varied from 174.3 to 196.3 nm with polydispersity index lower than 0.2, which is an indication for the low size variation of the particles within the samples. Zeta potential of the nanoparticles was positive and varied within the range from 26.8 to 36.1. No cytotoxic influence was revealed when nanoparticles of all three types were incubated with cells of HEK298 line. In the same time 38.49%, 35.04% and 16.67% of cells were expressing GFP when nanoparticles comprised of chitosan-alginate, and chitosan-alginate-dextran sulfate were used for transfection. Appropriate transfection efficacy and absence of cytotoxicity allow to recommend the nanoparticles studied for design of gene carriers to use *in vivo*.

Keywords: biocomposite nanoparticles, transfection, cytotoxicity, DNA carrier, chitosan, alginate, dextran sulfate.

Генная терапия является многообещающим направлением медицины, которое предлагает лечение ряда наследственных и приобретенных заболеваний. Поскольку введение терапевтических генов в виде нативной ДНК не эффективно из-за действия нуклеаз, низкой частоты трансфекции и отсутствия адресности доставки, разработка носителей ДНК на основе наночастиц из нетоксичных полимеров может быть эффективным решением проблемы доставки ДНК *in vitro*, так и *in vivo* [3, 9, 17].

Хитозан [α (1-4) 2-амино 2-деокси β -D глюкоза] является естественным линейным полисахаридом с гидрофильными свойствами, который получают из хитина. Хитин является основой экзоскелета членистоногих, но также обнаруживается у грибов [16]. Благодаря

своим биологическим свойствам, таким как возможность биоразложения, актимикробная активность, инертность, высокая прочность, хитозан активно изучается для биомедицинского применения [13, 18, 19].

Катионные полимеры, содержащие несколько аминогрупп в своем скелете, могут быть использованы в качестве носителей ДНК для невирусной доставки генов: фосфатный скелет ДНК взаимодействует с аминогруппами хитозана при низких значениях pH что ведет к образованию комплекса ДНК-хитозан, в данном комплексе ДНК защищена от деградации нуклеазами и показывает большую эффективность трансфекции, чем нативная ДНК [7].

Альгинат является анионным полисахаридом с линейными цепями, которые состоят из α -L-глюкоуроновой и β -D-маннуриновой кислот. Важной особенностью альгината является способность к ионотропному гелеобразованию, которое позволяет инкапсулировать биоагенты, такие как белковые комплексы и клетки [14]. Легкая деградация, отсутствие токсичности, сорбционные способности делают альгинат удобным биополимером для приготовления наночастиц [11].

Альгинат-хитозановые полиионные комплексы образуются благодаря ионотропному гелеобразованию благодаря взаимодействию между карбоксильными группами альгината и аминогруппами хитозана. Получающийся комплекс биосовместим и легко подвергается биодegradации, а также защищает инкапсулированное вещество [24].

Декстран, как биосовместимый и легко разлагающийся полиионный полимер часто используется в качестве средства доставки лекарств [15]. Декстран-хитозановые наночастицы образуются за счет электростатического взаимодействия остовов хитозана и декстран сульфата [1]. Кроме того, сочетание декстран сульфата и хитозана в оптимальных соотношениях, для формулирования, может действовать синергически для включения, защиты и высвобождения терапевтических молекул [21].

Целью настоящей работы является разработка носителей ДНК на основе наночастиц, состоящих из хитозана, альгината и декстран сульфата, сравнение их физикохимических свойств, эффективности инкапсулирования ДНК, оценка цитотоксичности и эффективности трансфекции этих наночастиц. В данной работе впервые сообщается об использовании в качестве носителей ДНК наночастиц, содержащих хитозан, альгинат и декстран сульфат.

Материалы и методы

Материалы, штаммы бактерий, ДНК, культуры клеток использованные в данной работе и условия их культивирования.

Хитозан с низкой молекулярной массой ($M_w=50$ kDa, DD> 75%), натриевая соль декстран сульфата с молекулярной массой >500 kDa, альгинат натрия, 3-(4,5-диметилтиазол-

2-)-2,5 – дифенил тетразолиум бромид (МТТ) и хлорид кальция были произведены Sigma-Aldrich (США).

Штамм *Escherichia coli* Nova Blue (Novagen, США), содержащий вектор pEGFP-N2 (Invitrogen, США) выращивали в среде LB (Sigma-Aldrich, США), содержащей 100 мкг/мл ампицилина (ПанЭко, РФ) при 37°C и интенсивной аэрации. Для приготовления всех трех типов наночастиц использовалась ДНК pEGFP-N2.

Трансфецирующий агент липофектамин – Lipofectamine™ 2000 был приобретен в компании Invitrogen Inc. (США).

Для разведения наночастиц и липофектамина была использована среда DMEM (ПанЭко, РФ).

Линия эмбриональных клеток почек (НЕК293) была получена из Altogen (США). Клетки НЕК293 культивировали в свежей полноценной среде, которую готовили на основе DMEM с добавлением 10% об/об эмбриональной телячей сыворотки, 2mM L-глутамин, пенициллина (50 ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (Life technologies Inc., Великобритания) при 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием углекислого газа 5 % в инкубаторе Esco CelCulture CO2 incubater (Scimetrics Inc., США).

Клетки выращивали до конфлюента, после чего обрабатывали 0,25% раствором трипсина (Gibco, Великобритания) при 37°C в течение 5 минут (трипсинизация).

Выделение плазмидной ДНК

Для выделения ДНК использовали штамм *Escherichia coli* NovaBlue (Novagen, Германия) содержащий вектор pEGFP-N2. Выделение и очистку ДНК производили методом щелочного лизиса. Качество выделенной ДНК и степень очистки определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в буфере TBE. Количество ДНК и степень очистки препарата pEGFP-N2 определяли спектрофотометрически с помощью NanoDrop UV-Vis (Thermo Scientific, США).

Приготовление наночастиц с инкапсулированной ДНК

Для приготовления ДНК-содержащих наночастиц на основе альгината и хитозана использовали ДНК вектора pEGFP-N2. Оптимальными условиями были соотношение альгината к хитозану 1:1. Соотношение CaCl₂/альгинат было 0.2% и соотношение N/P равнялось 5 при pH 5.3. [2]. Биополимерные наночастицы готовили, комбинируя процесс ионотропного гелеобразования и осаждения за счет взаимодействия между карбоксильными группами альгината и аминогруппами хитозана. Двухступенчатый процесс включает сшивку альгината натрия в присутствии хлорида кальция, затем альгинатная частица покрывается хитозаном для стабилизации. Для этого со скоростью 30 мл/ч 1мл разведенного раствора CaCl₂ (0.00006%) добавляли по каплям через инсулиновую иглу к 3 мл альгината натрия,

после чего была добавлена плазмидная ДНК также по каплям при постоянном перемешивании. В соответствии с соотношением компонентов 4 мл раствора хитозана были добавлены к смеси альгината, хлорида кальция и ДНК. Смесь перемешивали в течение 30 минут для окончания формирования наночастиц. После чего наночастицы были отделены от раствора центрифугированием при 20 000 об/мин в течение 20 минут. Процедура приготовления наночастиц с добавлением декстран сульфата была проведена в тех же условиях что и описанный выше процесс, различие заключалось в добавлении декстран сульфата до конечной концентрации 0.001% вес/объем в раствор альгината натрия. Хитозановые наночастицы с инкапсулированной ДНК были приготовлены методом комплексной коацервации [13].

Размер частиц, индекс полидисперсности и зета-потенциал

Определение размеров наночастиц было произведено с помощью динамического рассеяния света (ДРС) Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Великобритания). Индекс полидисперсности (ИП) измеряли для каждого образца как индикатор разброса размеров частиц. Зета потенциал был определен с помощью Zetasizer Nano ZS по модели Смолуховского.

Оценка эффективности инкапсуляции ДНК

Эффективность инкапсуляции определяли как разницу между количеством ДНК, использованной для приготовления частиц и количеством ДНК оставшейся в супернатанте после осаждения наночастиц [13].

Оценка цитотоксического влияния наночастиц

Цитотоксичность наночастиц с инкапсулированной ДНК оценивали с помощью МТТ теста на цитотоксичность, согласно [5]. Относительную жизнеспособность (%) высчитывали на основе измерений при 555 нм и 700 нм в лунках планшета с помощью TECAN infinite® M200-PRO (Швейцария).

Жизнеспособность клеток в контрольном варианте опыта (клетки инкубированные в полноценной среде) принимали за 100%. Относительная жизнеспособность клеток высчитывали по формуле $\frac{[\text{жизнеспособные клетки}]}{[\text{жизнеспособные клетки}]} \times 100$. Эксперимент был проделан в трех повторях.

Транфекция *in-vitro*

Для проведения трансфекции клетки НЕК293 инокулировали в 500 мкл свежей полноценной среды в 24-луночный планшет (Nunclon™, Дания) при плотности 5×10^4 кл/лунку и выращивали в течение 24 часов при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. После достижения 80% конфлюэнта клетки считали готовыми для трансфекции. После разведения наночастиц в DMEM наночастицы с содержанием ДНК 1 мкг вносили к клеткам

и инкубировали еще 48 часов в тех же условиях. Клетки без добавления каких-либо веществ и клетки с добавлением чистой плазмидной ДНК (отрицательные контроли), так же комплекс Lipofectamine/ДНК (положительный контроль) инкубировали в тех же условиях, как и образцы с наночастицами.

Экспрессия EGFP была визуализирована с помощью флюоресцентного микроскопа Axio Observer S 100 (Zeiss, Германия). Все эксперименты были повторены трижды.

Результаты и обсуждение

Размер частиц, индекс полидисперсности и зета-потенциал

Средний размер частиц, распределение размеров частиц, ИП, зета потенциал и эффективность инкапсуляции для созданных наночастиц приведены в табл. 1. Данные приведены в виде средних значений (\pm стандартное отклонение) по результатам трех экспериментов.

Размер наночастиц является одна из важных характеристик, которая может влиять на эффективность трансфекции. Согласно данным, приведенным в табл. 1 средний гидродинамический диаметр для этих трех различных наночастиц составил от 147.3 нм до 196.3 нм. Наиболее компактными были наночастицы, состоящие из хитозана и альгината. Частицы, состоящие из альгината, декстран сульфата и хитозана были наиболее крупными. Введение альгината и декстран сульфата не обязательно приводит к увеличению размеров частиц, вероятно на размер больше влияет способ и условия приготовления частиц: ионотропное гелеобразование или комплексная коацервация.

Таблица 1

Размер частиц, распределение размеров, индекс полидисперсности (ИП), зета потенциал и эффективность инкапсуляции плазмидной ДНК в наночастицы разного состава

Образец	Средний ИП	Средний размер частиц (нм) $\pm s$	Средний зета потенциал (mV) $\pm s$	Средняя эффективность инкапсуляции (%) $\pm s$	Распределение размеров наночастиц по интенсивности (нм) $\pm s$ (100% наночастиц)	Распределение размеров наночастиц по объему интенсивности (нм) $\pm s$ (100% наночастиц)	Распределение размеров наночастиц по количеству (нм) $\pm s$ (100% наночастиц)
Хитозан	0.135 \pm 0.001	182.7 \pm 9.48	36.1 \pm 1.82	83.07 \pm 2.34	203.4 \pm 6.102	222 \pm 6.66	127 \pm 3.81
Хитозан/альгинат	0.161 \pm 0.005	147.3 \pm 6.22	28.9 \pm 1.24	91.33 \pm 1.63	187.1 \pm 14.96	196 \pm 15.68	108 \pm 8.64
Хитозан/альгинат/декстран сульфат	0.146 \pm 0.002	196.3 \pm 11.29	26.8 \pm 1.04	94.71 \pm 2.03	224.9 \pm 13.23	234.1 \pm 15.11	154.7 \pm 8.60

При этом размер наночастиц состава ДНК/хитозан/альгинат был меньше чем таковой у частиц ДНК/хитозан. Разница в размерах частиц объясняется образованием сшивок между

ДНК и альгинатом с участием поливалентных катионов, таких как Ca^{2+} , что приводит к образованию частиц меньшего размера, чем наночастицы состоящие из хитозана и ДНК [4]. В присутствии декстран сульфата средний размер частиц увеличивался, аналогично тому как сообщалось ранее [8]. Распределение размеров частиц характеризуется ИП, который является мерой гомогенности в дисперсной системе и может изменяться в интервале от 0 до 1. Гомогенность частиц в образце характеризуется значениями ИП близкими к нулю, тогда как ИП более 0,3 указывает на гетерогенность образца [27]. Как это видно из табл. 1 приготовленные наночастицы имели ИП меньше чем 0.2.

Зета потенциал наночастиц с инкапсулированной ДНК вариировал в пределах от 26.8 до 36.1 мВ (при рН 5.3). Позитивно заряженные частицы могут облегчить адгезию к клеточной мембране, индуцировать и увеличивать поглощение частиц клетками [5]. Кроме того, положительно заряженные частицы указывают, что в них ДНК полностью связана с хитозаном [10]. Было показано, что стабильность частиц выше, если зета-потенциал либо высоко негативен (<-30 mV) либо высоко позитивен ($>+30$ mV) [12], из чего можно сделать вывод, что стабильность наночастиц хитозан/ДНК была выше чем у наночастиц с включением других биополимеров. На это указывает, также, большая склонность наночастиц хитозан/альгинат и хитозан/альгинат-декстран сульфат к агрегированию, чем это было отмечено для наночастиц, состоящих исключительно из хитозана.

Эффективность инкапсуляции (ЭИ)

Согласно табл. 1 ЭИ составляла от 83.07 до 94.71%. Присутствие декстран сульфата значительно увеличивало ЭИ. Увеличение ЭИ может происходить из-за усиления матрицы наночастицы по сравнению с частицами из хитозана или хитозана и альгината [20].

Цитотоксичность

Цитотоксичность наночастиц была определена с помощью МТТ теста. Нативная ДНК, ДНК с липофектаминоном были использованы в качестве контролей. Как видно из табл. 2, ни один из препаратов наночастиц не проявлял цитотоксичные свойства, тогда как только 60 % клеток выживали при обработке смесью липофектамин/ДНК. Более того, наночастицы увеличивали жизнеспособность клеток по сравнению с отрицательным контролем, где к клеткам была добавлена нативная векторная ДНК. Аналогичное повышение жизнеспособности наблюдалось при использовании наночастиц с альгинатом [20]. Частицы с декстраном показывали наибольшее увеличение жизнеспособности и это отличие было статистически достоверным.

Таблица 2

Жизнеспособность клеток и эффективность трансфекции

Образцы	Жизнеспособность клеток (% от контроля \pm s)	Эффективность трансфекции ($\% \pm$ s)
Хитозан	113.45 \pm 2.3	16.67 \pm 0.73
Хитозан/альгинат	124.21 \pm 1.7	35.04 \pm 1.62
Хитозан/альгинат/декстран	143.21 \pm 3.73	38.49 \pm 1.43
ДНК/липофектамин	59.87 \pm 4.7	55.39 \pm 2.11
Плазмидная ДНК (контроль)	101.32 \pm 1.5	0.23 \pm 0.01

Трансфекция *in-vitro*

Для определения эффективности трансфекции частицы с инкапсулированной ДНК вектора pEGFP-N2 были инкубированы с клетками линии НЕК 293 в качестве положительного контроля использовали векторную ДНК смешанную с липофектамино, который является эффективным препаратом для трансформации культур клеток для исследовательских целей.

Анализ флуоресценции трансфецированных клеток с помощью проточной цитофлуорометрии выявил, 55.39%, 38.49%, 35.04% и 16.67% клеток экспрессировали GFP при использовании липофектамина, наночастиц состава хитозан/альгинат-декстран сульфат, хитозан/альгинат и хитозан соответственно. Липофектамин, использованный в данном эксперименте в качестве положительного контроля.

Наиболее эффективными в трансформации были частицы размером 196.3 нм. Частицы, состоящие из хитозана размером 182 нм были наименее эффективны. Согласно ранее проведенным исследованиям частицы размером более 250 нм не отличаются по эффективности трансфекции [25]. Для частиц размером менее 250 нм было показано, что наночастицы с меньшим размером более эффективны для трансфекции ДНК [20, 23].

. Вероятно, причина отсутствия данного тренда в наших исследованиях может быть объяснена разным составом наночастиц.

Частицы без добавления альгината или декстран сульфата были наименее эффективны в трансфекции. Большую эффективность наночастиц с применением альгината может объяснить увеличение эндосомального высвобождения: альгинат действует как протонная губка при разрушении [26]. Кроме того, гидрофильная природа хитозана препятствует высвобождению ДНК внутри клеток [6]. Большая трансфекционная эффективность наночастиц, содержащих декстран сульфат, может объясняться большим набуханием частиц [22], что ведет к более эффективному высвобождению плазмидной ДНК в клетках по сравнению с наночастицами состоящими из альгината и хитозана [20]. Кроме того, альгинат и декстран сульфат могут уменьшить электростатическое взаимодействие

между хитозаном и ДНК, что также может способствовать высвобождению векторной молекулы.

Заключение

Наши исследования показали, что наночастицы на основе хитозана, альгината и декстран сульфата являются наиболее эффективными носителями для трансфекции ДНК. Кроме того в отличие от Липофектамина данные частицы не токсичны и даже усиливают пролиферацию и размножение клеток после трансформации. Полученные результаты позволяют рекомендовать данные композитные наночастицы в качестве носителей для трансфекции ДНК *in vivo*.

Список литературы

1. Chen Y. Designing chitosan-dextran sulfate nanoparticles using charge ratios / Y. Chen, VJ. Mohanraj, F. Wang // AAPS Pharmscitech. – 2007. – Vol. 8, № 4. – P. 131-139.
2. Gazori T. Evaluation of alginate/chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: formulation, optimization and in vitro characterization / T. Gazori, MR. khoshayand, E. Azizi // Carbohydrate Polymers. – 2009 – Vol. 77, № 3 – P. 599-606.
3. George M. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review/ M. George, TE. Abraham // J. Cont. Rel. – 2006. – Vol. 114, № 1 – P. 1-14.
4. Guo R. Novel alginate coated hydrophobically modified chitosan polyelectrolyte complex for the delivery of BSA / R. Guo, L. Chen, S. Cai // J Mater Sci Mater Med. 2013 – Vol. 24, № 9 – P. 2093-2100.
5. Hallaj-Nezhadi S. Preparation of Chitosan-Plasmid DNA Nanoparticles Encoding interleukin-12 and their Expression in CT-26 Colon Carcinoma Cells / S. Hallaj-Nezhadi, Hadi Valizadeh, Siavoush Dastmalchi // J Pharm Pharmaceut Sci. – 2011 – Vol. 14, № 2 – P. 181 – 195.
6. Ishii T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes / T. Ishii, Y. Okahata, T. Sato // Biochim Biophys Acta. – 2001 – Vol. 1514, №1 – P. 51-64.
7. Jayakumar, R. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy / R. Jayakumar, K. P. Chennazhi, R.A. Muzzarelli // Carbohydrate Polymers. – 2010. – Vol. 79 – P. 1–8.
8. Khorram M. Electrospray Preparation of Propranolol-Loaded Alginate Beads: Effect of Matrix Reinforcement on Loading and Release Profile / M. Khorram, Mohsen Samimi, Abdolreza Samimi // J. Appl. Polym. Sci. 2014 - DOI: 10.1002/APP.41334.
9. Kim T. Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo/ T. Kim, H. Jiang, D. Jere, I. Park, M. Cho, J. Nah, Y. Choi, T. Akaike, C. Cho// Prog. Polym. Sci. – 2007. – Vol. 32. – P.726–753.

10. Kim T. H. Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier / T. H. Kim, I. K. Park, J. W. Nah // *Biomaterials*. 2004 – Vol. 25. – P. 3783–3792.
11. Krebs MD. Calcium phosphate-DNA nanoparticle gene delivery from alginate hydrogels induces in vivo osteogenesis / MD. Krebs, E. Salter, E. Chen // *J Biomed Mater Res A*. – 2010. – Vol. 92, № 3 – P. 1131-1138.
12. MacLaughlin, F. C. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery / F. C. MacLaughlin, R. J. Mumper, J. Wang // *Journal of Controlled Release*. – 1998. – Vol. 56 – P. 259–272.
13. Mao H-Q. Chitosan–DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis characterization and transfection efficiency / H-Q. Mao, K. Roy, V.L. Troung-Le // *Journal of Controlled Release*. – 2001. Vol. 70 – P. 399–421.
14. Mi, F.-L. Drug release from chitosan–alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent / F.-L. Mi, W. Sung, S. S. Shyu // *Carbohydrate Polymers*. – 2002. – Vol. 7. – P. 48- 61.
15. Mitra, S. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier / S. Mitra, U. Gaur, P. C. Ghosh // *Journal of Controlled Release*. – 2001. – Vol. 74. – P. 317–323.
16. Muzzarelli R. A. A. Current views of fungal chitin/chitosan, human chitinases food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial / R. A. A. Muzzarelli, J. Boudrant, D. Meyer // *Carbohydrate Polymers* – 2012. – Vol. 87. – P. 995–1012.
17. Nonviral, S. Li. gene therapy: promises and challenges/ S. Li, Nonviral, L. Huang // *Gene Ther*. – 2000. – Vol. 7. – P. 31–34.
18. Patil SB. Chitosan microspheres as a delivery system for nasal insufflation / SB. Patil, KK. Sawant// *Colloid Surf B: Biointerfaces* – 2011. – Vol. 84 – P. 384-389.
19. Prego C. Chitosan–PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery –effect of chitosan pegylation degree / C. Prego, D. Torres, E. Fernandez-Megia // *Journal of Controlled Release*. – 2006. – Vol. 111. – P. 299–308.
20. Rafiee A. Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection / A. Rafiee, M. H. A. TaranehGazori, F. Riazi-rad // *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. – 2014. – Vol. 4, № 5. – P. 372-377.

21. Sharma S. Enhanced immune response against pertussis toxoid by IgA-loaded chitosan-dextran sulfate nanoparticles / S. Sharma, TK. Mukkur, H. Benson // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012 – Vol. 101, № 1. – P. 233-244.
22. Sonawane ND. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes / ND. Sonawane, FC Jr. Szoka, AS. Verkman // *J Biol Chem*. – 2003 – Vol. 278, № 45 – P. 44826-44831.
23. Swayam P. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles / Swayam P., Wen-Zhong Zhou, Jayanth Panyam // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2002 – Vol. 244 – P. 105–115.
24. Yan, X. L. Chitosan–alginate films prepared with chitosans of different molecular weights / X. L. Yan, E. Khor, L. Y. Lim // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2001 – P. 58-358.
25. Yang XR. Chitosan nanoparticles as gene vector: effect of particle size on transfection efficiency / XR. Yang, L. Zong // *Yao Xue Xue Bao*. – 2007 – Vol. 42, № 7 – P. 774-779.
26. You JO. Calcium-alginate nanoparticles formed by reverse microemulsion as gene carrier / JO. You, CA. Peng // *Macromol Symp*. – 2005 – Vol. 219, №1 – P. 147-153.
27. Zhang L. delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants / L. Zhang, SL. Kosaraju // *Biopolymeric Eur Polym J*. – 2007 – Vol. 43 – P. 2956-2966.

Рецензенты:

Багаева Т.В., д.б.н., заведующий кафедрой биотехнологии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань;

Гоголев Ю.В., д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биологии, ФГБУН "Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра" Российской академии наук, г. Казань.