

## УТВОРЕННЯ ПОЛІПЛЕКСІВ НОВИМИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИМИ ГРЕБЕНЕПОДІБНИМИ ПОЛІАМФОЛІТАМИ І ПЛАЗМІДНОЮ ДНК

Н. С. Фінюк<sup>1,3</sup>

Т. Я. Вітак<sup>3</sup>

Н. Є. Міміна<sup>2</sup>

Є. З. Філяк<sup>1</sup>

О. С. Заїченко<sup>2</sup>

Р. С. Стойка<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України, Львів

<sup>2</sup>Національний університет «Львівська політехніка»

<sup>3</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка

*E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua*

Отримано 31.08.2012

Досліджено утворення інтерполіелектролітних комплексів (поліплексів) плазмідної ДНК з новими поверхнево-активними гребенеподібними поліамфолітними носіями із застосуванням методу визначення затримки ДНК під час електрофорезу в гелі агарози. Встановлено оптимальні умови для утворення таких поліплексів: концентрація поліамфолітних носіїв 0,1–0,003%, рН 7,4, 20 хв, 24 °С. Показано, що поліамфоліт із кватернізованими аміновмісними бічними ланцюгами утворює найбільш стабільні поліплекси з плазмідною ДНК. Асоціація та вивільнення ДНК із комплексу з поліамфолітними носіями не спричинює її структурних змін, натомість ці носії захищають ДНК від розщеплення нуклеазами. Отже, нові поверхнево-активні гребенеподібні поліамфоліти є перспективними носіями для доставлення ДНК у реципієнтні клітини.

**Ключові слова:** плазмідна ДНК, поліамфолітні носії, стабільність поліплексів, електрофорез ДНК.

До систем доставлення нуклеїнових кислот, використовуваних у генній терапії, існує низка вимог, зокрема вони мають проникати через плазматичну мембрану реципієнтних клітин, зберігати свої структурно-функціональні властивості всередині клітини після ендоцитозу, а також потрапляти в ядро, де нуклеїнова кислота повинна інтегруватись у хроматин і транскрибуватись в інформаційну РНК [1]. Описано кілька таких систем, зокрема поліетиленімін [2–4], полі-L-лізин [5, 6], дендримери [7], хітозан [8], ліпосоми [9], металовмісні наноматеріали [10]. Встановлено, що нанорозмірні полімерні носії мають суттєві переваги під час здійснення генетичної трансформації, а саме: підвищення ефективності доставлення нуклеїнової кислоти в реципієнтні клітини, захист її від розщеплення позаклітинними і внутрішньоклітинними нуклеазами, а також можливість здійснення адресного доставлення генетичного матеріалу до клітин. Особливо перспективними у цьому сенсі для потреб сучасної біотехнології та фармакології є поліелектролітні носії, здатні утворювати нанорозмірні поліплекси, стабільні у водних розчинах [5].

Метою роботи було дослідити утворення комплексів новими поліамфолітними гребенеподібними носіями з плазмідною ДНК і вивчити деякі властивості утворених нанорозмірних поліплексів як зручних векторів для доставлення генів у реципієнтні клітини.

### Матеріали і методи

У роботі використано нові поверхнево-активні поліамфолітні носії (ПН) гребенеподібної будови, синтезовані на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» за описаною методикою [11]. Ці ПН складаються з аніонного карбоксилвмісного основного ланцюга з молекулярною масою 2000 г/моль та прищеплених до нього 1–3 аміновмісних бічних ланцюгів (рис. 1).

Основний ланцюг — олігопероксидний металокомплекс (ОМК), до якого прищеплені ланцюги кополімеру диметиламіноетилметакрилату (ДМАЕМ) та 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-іну (ВЕР). Характеристику синтезованих кополімерів наведено в таблиці.

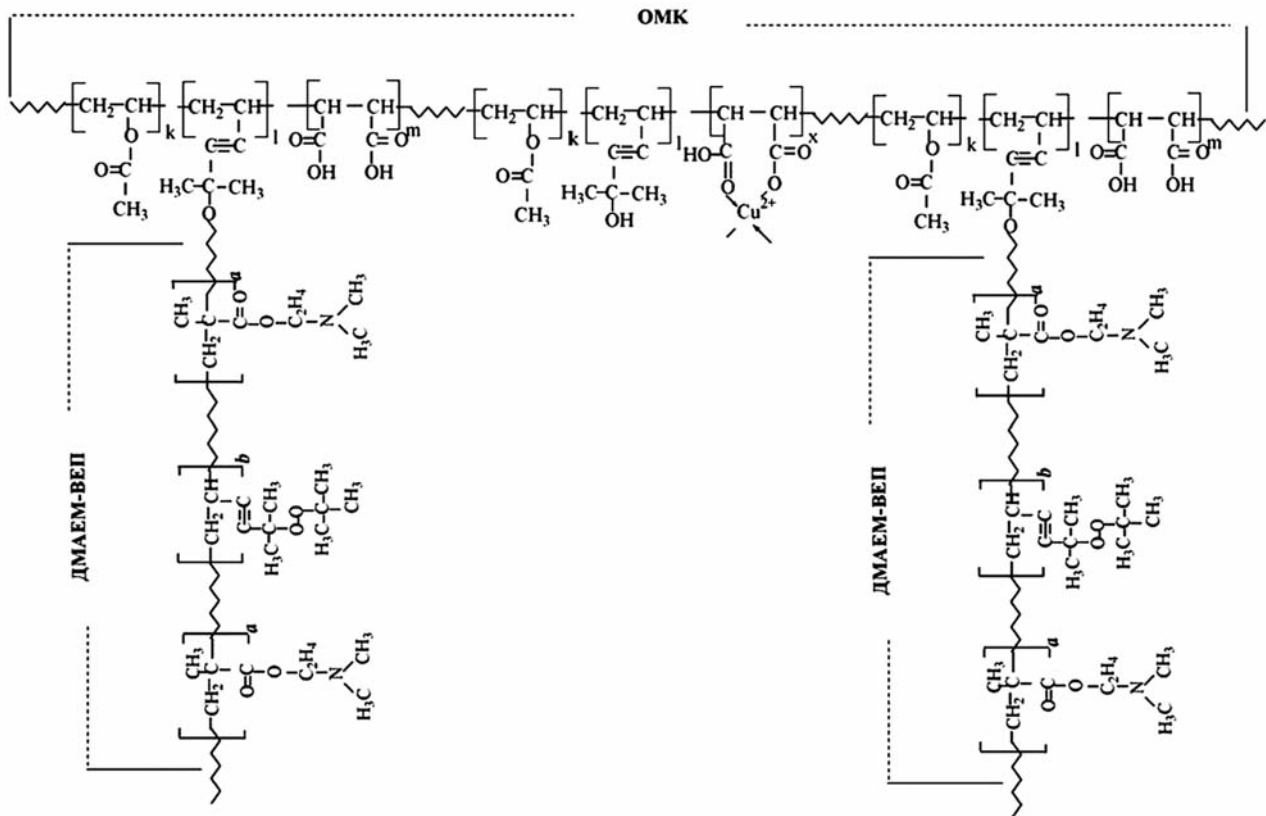


Рис. 1. Схематичне зображення структури гребенеподібного поліамфолітного носія

**Характеристика синтезованих поліамфолітних носіїв  
(процентне співвідношення основного та прищеплених ланцюгів 5:95)**

#	Основний ланцюг							[Cu <sup>2+</sup> ], % на основ- ний ланцюг	Прищеплені ланцюги					M <sub>n</sub> , г/моль	σ, мН/ м (1% р-н)
	Вміст мономер- них ланок в ПН, %			Характеристика мікроструктури*					Вміст мономер- них ланок в ПН, %		Характеристика мікроструктури				
	ВА k	ВЕР l	МА m	l <sub>ВА</sub>	l <sub>ВЕР</sub>	l <sub>МА</sub>	R		ВЕР b	DMAEM a	l <sub>ВЕР</sub>	l <sub>DMAEM</sub>	R		
БГ-2	22,0	34,0	44,0	1,0	1,0	1,0	99,5	1,1	7,5	92,5	1,02	14,8	7,5	3100	43,0
БГ- 2кв**	22,0	34,0	44,0	1,0	1,0	1,0	99,5	1,1	7,5	92,5	1,02	14,8	7,5	3100	52,3
БГ-3	22,0	34,0	44,0	1,0	1,0	1,0	99,5	1,1	15,6	84,4	1,07	4,94	14,6	2300	44,3
БГ-4	22,0	34,0	44,0	1,0	1,0	1,0	99,5	1,1	34,0	66,0	1,22	2,30	27,8	2100	37,3

Примітка: # — скорочена назва поліамфолітного носія, \* l — середня довжина блоків із ланок комомера; R — кількість блоків з однакових ланок на 100 ланок кополімеру; \*\* — кополімер із кватернізованими аміногрупами, одержаний у результаті оброблення йодистим метилом (СНЗІ); M<sub>n</sub> — середньочисельна молекулярна маса, σ — поверхневий натяг.

ПН розчинні у широкому діапазоні рН і здатні утворювати міжмолекулярні комплекси сольового типу між позитивно зарядженими бічними ланцюгами і негативно зарядженою молекулою ДНК. Наявність у структурі поліамфоліту гідрофобних фрагментів не лише забезпечує їхню поверхневу

активність, але й сприяє взаємодії комплексу ПН/ДНК із плазматичною мембраною реципієнтних клітин.

У роботі використовували плазмиду рGLG578 завдовжки 6,5 тис. пар нуклеотидів [12, 13]. Плазмідну ДНК із трансформованої бактеріальної культури *E. coli* штаму

ДН5 виділяли за класичною методикою [14]. Ізольовану плазмідну ДНК зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . Робоча концентрація ДНК становила 1 мкг/мкл.

**Утворення комплексів ДНК із ПН** досліджували за допомогою електрофорезу в гелі агарози. До розчинів з різною концентрацією ПН додавали 1 мкг плазмідної ДНК в об'ємі 9 мкл трис-НСІ (Medicago АВ, Швеція), 20 мМ, рН 7,4. Отриману суміш інкубували протягом 20 хв за кімнатної температури для утворення комплексу ПН/ДНК [15]. Реакційну суміш переносили в лунки 1%-го гелю агарози (LACHEMA, Чехія) і піддавали електрофорезу в буфері ТАЕ (40 мМ трис-НСІ, 40 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА, рН 8,5; Medicago АВ) протягом 40–50 хв при 75 В. ДНК в гелі детектували, застосовуючи транслюмінатор (MascoVue UV-20, Hoeffer) і фотографували цифровою камерою фірми Canon.

#### **ДНК-протекторні властивості поліамфолітних носіїв**

Комплекси ПН/ДНК готували у 20 мМ трис-НСІ, рН 7,4, із використанням 1 мкг плазмідної ДНК та 1 мкл ПН відповідної концентрації. Аліквоти інкубували за кімнатної температури упродовж 20 хв і піддавали дії ДНКази I (Fermentas, Німеччина) у буфері (10 мМ трис-НСІ, рН 7,6, і 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ ) протягом 30 хв при  $37^{\circ}\text{C}$ . ДНК (1 мкг) інкубували з ДНКазою I у різних концентраціях: 0,05 U/мкг ДНК, 0,1 U/мкг ДНК і 0,5 U/мкг ДНК. Щоб зупинити дію ДНКази, додавали 5 мкл 0,5 М ЕДТА (Fermentas, Німеччина), рН 8,0 [16]. Одержані суміші піддавали електрофорезу при 75 В протягом 40–50 хв. ДНК в гелі детектували, як зазначено вище.

#### **Вивільнення ДНК з комплексу ПН/ДНК.**

До комплексу ПН/ДНК, приготованому, як описано вище, додавали гепарин (5000 МО/мл) (РУП «Белмедпрепарати», Республіка Білорусь) до кінцевої концентрації 0,1%, 1%, 2%, 5%, 10% [17, 18]. Одержану суміш інкубували протягом 3 год при  $37^{\circ}\text{C}$ . Конформаційний стан ДНК (релаксована чи суперспіралізована) досліджували за допомогою електрофорезу в 1%-му гелі агарози, як описано вище.

### **Результати та обговорення**

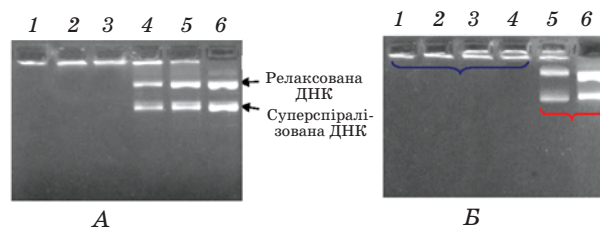
Щоб підтвердити утворення комплексу ПН/ДНК і його дисоціацію, визначити співвідношення компонентів (ПН і ДНК) у цьому комплексі, а також перевірити протекторні властивості (захист від нуклеаз) ПН щодо плазмідної ДНК, нами було проведено електрофоретичне дослідження в гелі агаро-

зи. При цьому затримка електрофоретичної рухливості плазмідної ДНК може свідчити про утворення комплексу її з ПН і зменшення сумарного негативного заряду, тоді як поява дифузної плями на електрофореграмі вказує на фрагментацію плазмідної ДНК.

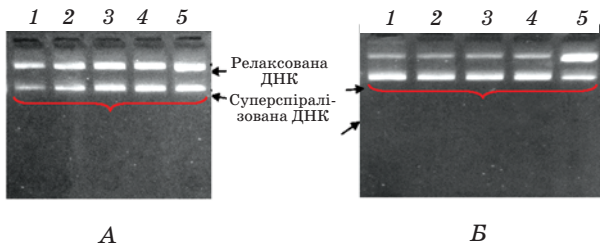
#### **ДНК-зв'язувальні властивості поліамфолітних носіїв**

Результати, наведені на рис. 2, демонструють наявність на електрофореграмі двох типів смуг ДНК, причому одна із цих смуг майже не мігрує під час електрофорезу, що свідчить про утворення міжмолекулярного комплексу ПН із плазмідною ДНК. Очевидно, саме зменшення негативного заряду ДНК в результаті утворення поліплексу призводить до затримки її міграції в електричному полі. Водночас дві смуги другого типу належать вільній плазмідній ДНК (релаксована і суперспіралізована форми), що не увійшла до комплексу з ПН і тому добре мігрує під час електрофорезу. Слід зазначити, що кватернізований ПН (БГ-2q), якому притаманний більш позитивний заряд, утворює комплекс із плазмідною ДНК у нижчій концентрації (0,003%), ніж некватернізований ПН (БГ-2), що забезпечує таке комплексоутворення за втричі вищої концентрації (0,01%). Утім, деяка кількість комплексованої ДНК виявляється й за нижчої концентрації ПН (0,003% і 0,001% у разі використання БГ-2 і 0,001% — БГ-2q).

Висновок, зроблений щодо залежності ефективності комплексоутворення між ПН і плазмідною ДНК від рівня позитивного заряду ПН, узгоджується з результатами, поданими на рис. 3. У цьому досліді для комплексоутворення використовували два інші синтезовані ПН — БГ-3 і БГ-4. За одна-



**Рис. 2. Електрофореграма зразків ДНК плазмиди pGLG578 та її комплексів із поліамфолітними носіями БГ-2 (А) і БГ-2q (Б):** до 1 мкг плазмідної ДНК додавали 1 мкл полімеру відповідної концентрації в об'ємі 9 мкл трис-НСІ, 20 мМ, рН 7,4. Доріжка 1 — 0,1% полімеру, 2 — 0,03%, 3 — 0,01%, 4 — 0,003%, 5 — 0,001%, 6 — вільна плазмідна ДНК;   
 — комплекс поліамфолітний носій/ДНК;   
 — ДНК, що не зв'язалася з полімером



**Рис. 3. Електрофореграма зразків ДНК плазмиди рGLG578 за присутності поліамфолітних носіїв БГ-3 (А) і БГ-4 (Б):** до 1 мкг плазмідної ДНК додавали 1 мкл полімеру відповідної концентрації в об'ємі 9 мкл трис-НСl, 20 мМ, рН 7,4. Доріжка 1 — 0,1% полімеру, 2 — 0,03%, 3 — 0,01%, 4 — 0,003%, 5 — вільна плазмідна ДНК; ⌋ ДНК, що не зв'язалася з носієм

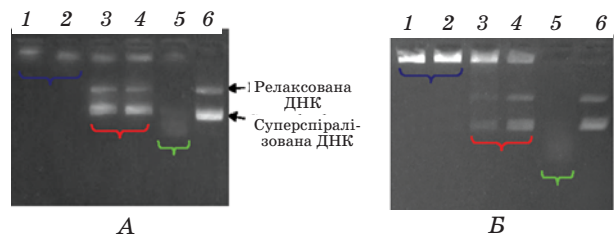
кової довжини основного ланцюга ОМК у них скорочено довжину бічних аміновмісних ланцюгів (із 14,8 ланок у БГ-2 до 4,94 у БГ-3 і 2,30 ланок у БГ-4), що містять ланки ДМАЕМ із позитивним зарядом, а також зменшено вміст цих ланок у бічних ланцюгах (із 92,5% у БГ-2 до 84,4% у БГ-3 і 66,0% у БГ-4) (таблиця). Тому є підстави вважати, що позитивний заряд БГ-3 і БГ-4 є недостатнім для утворення стійких комплексів із ДНК порівняно з таким зарядом БГ-2.

Як видно із цього рисунка, за використаних концентрацій (0,003%, 0,01%, 0,03% і 0,1%) ПН БГ-3 і БГ-4 не утворюють комплексів із плазмідною ДНК, оскільки відсутня затримка міграції цієї ДНК під час електрофорезу.

Отже, серед чотирьох досліджуваних поліамфолітних аміновмісних носіїв — БГ-2, БГ-2q, БГ-3 і БГ-4 — лише два перші ПН здатні добре зв'язувати плазмідну ДНК, причому БГ-2q із потенційно вищим значенням позитивного заряду молекули перевершує за своєю ДНК-зв'язувальною здатністю БГ-2, який має дещо менший позитивний заряд.

**Вивільнення ДНК з комплексу з поліамфолітним носієм**

Наступним кроком нашого дослідження була перевірка цілісності ДНК після її вивільнення з комплексу ПН/ДНК. Для цього використали здатність гепарину спричинювати дисоціацію плазмідної ДНК з її комплексів із ПН [2]. Як видно з рис. 4 (доріжки 3 і 4), плазмідна ДНК, вивільнена з комплексу ПН/ДНК під впливом гепарину в кінцевій концентрації 1% і 2%, перебуває в двох формах — релаксованій і суперспіралізованій. Нижча концентрація гепарину



**Рис. 4. Електрофореграма ДНК плазмиди рGLG578, вивільненої з комплексу з БГ-2 (А) і БГ-2q (Б):**

до 1 мкг плазмідної ДНК додавали 1 мкл 0,1%-го розчину відповідного ПН в об'ємі 9 мкл трис-НСl, 20 мМ, рН 7,4. До утвореного комплексу ДНК із ПН додавали гепарин у різній кінцевій концентрації: доріжка 1 — 0%, 2 — 0,5%, 3 — 1%, 4 — 2%, 5 — 5%, 6 — вільна плазмідна ДНК;

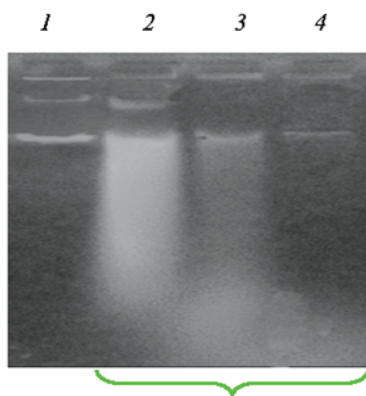
- ⌋ комплекс ПН/ДНК;
- ⌋ плазмідна ДНК, вивільнена з комплексу ПН/ДНК;
- ⌋ розщеплена ДНК

(0,5%) не забезпечує вивільнення ДНК з такого комплексу (доріжка 2). Підвищення його концентрації до 5% призводить до порушення цілісності ДНК (доріжка 5), що узгоджується з даними інших дослідників [16, 17]. Тому саме 1% -ну концентрацію гепарину було вибрано для подальшого дослідження вивільнення ДНК із комплексів із ПН.

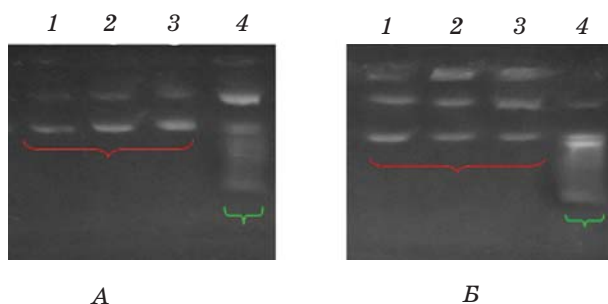
Наведені результати дають підстави стверджувати, що поліамфолітні носії БГ-2 і БГ-2q не лише найкраще зв'язують плазмідну ДНК, але й ефективно захищають її від деградації у разі вивільнення з комплексу ПН/ДНК, не впливаючи на структуру цієї ДНК.

**ДНК-протекторні властивості поліамфолітного носія БГ-2**

Конформація ДНК є визначальною у забезпеченні її стійкості до розщеплення нуклеазами [10]. Відомо, що дезоксирибонуклеаза I (ДНКаза I) відіграє основну роль у розщепленні ДНК [1, 19]. Здатність поліамфолітних носіїв захищати ДНК від дії нуклеаз має першорядне значення у підвищенні ефективності експресії доставлених генів [16]. Ми дослідили, чи захищає поліамфолітний носій БГ-2 плазмідну ДНК від її розщеплення ДНКазою I. Для цього утворені комплекси ПН/ДНК обробляли цією нуклеазою у різній концентрації. Як впливає з рис. 5, вільна плазмідна ДНК суттєво ушкоджується ДНКазою I вже в концентрації 0,05 У/мкг ДНК, а подальше підвищення концентрації ДНКази I до 0,1 і 0,5 У/мкг



**Рис. 5. Електрофореграма ДНК плазмиди рGLG578, розщепленої ДНКазою I:**  
 1 — нативна ДНК;  
 2 — ДНК після оброблення ДНКазою I у концентрації 0,05 U/мкг ДНК;  
 3 — ДНК після оброблення ДНКазою I у концентрації 0,1 U/мкг ДНК;  
 4 — ДНК після оброблення ДНКазою I у концентрації 0,5 U/мкг ДНК;  
 доріжки із розщепленою ДНК



**Рис. 6. Електрофоретична оцінка ДНК-протекторної здатності поліамфолітних носіїв BG-2 (А) і BG-2q (Б):**  
 до 1 мкг плазмідної ДНК рGLG578 додавали 1 мкл 0,1% -го розчину ПН в об'ємі 9 мкл трис-НСl, 20 мМ. Утворений комплекс піддавали впливу ДНКазу I у різних концентраціях:  
 доріжка 1 — нативна ДНК;  
 2 — комплекс ПН/ДНК, оброблений ДНКазою I в концентрації 0,05 U/мкг ДНК;  
 3 — комплекс ПН/ДНК, оброблений ДНКазою I в концентрації 0,1 U/мкг ДНК;  
 4 — комплекс ПН/ДНК, оброблений ДНКазою I в концентрації 0,5 U/мкг ДНК;  
 плазмідна ДНК, вивільнена з комплексу ПН/ДНК;  
 розщеплена плазмідна ДНК

ДНК призводить до ще суттєвішої деградації плазмідної ДНК.

Враховуючи наведені вище дані про захист поліамфолітним носієм BG-2 плазмідної ДНК від руйнування, що відбувається за присутності гепарину (рис. 4), ми дослідили протекторні властивості BG-2 щодо плазмідної ДНК, на яку діяли ДНКазою I. Як видно з рис. 6 (доріжки 2 і 3) плазмідна ДНК, що перебуває у комплексі з ПН, нечутлива до цього ензиму в концентрації 0,05 і 0,1 U/1 мкг ДНК. При цьому зберігаються без помітних змін як релаксована, так і суперспіралізована форми плазмідної ДНК. Лише за дії ДНКазу I у високій концентрації (0,5 U/1 мкг ДНК) виявлено часткове руйнування плазмідної ДНК (рис. 6, доріжка 4).

Отже, результати наших досліджень свідчать про те, що поліамфолітні носії типу BG-2 захищають плазмідну ДНК від руйнування ДНКазою I, що є важливим під час доставлення генів у реципієнтні клітини *in vitro* та *in vivo*.

Механізми захисної дії поліамфолітних носіїв від нуклеазного (ДНКазу I) розщеплення асоційованої з ними плазмідної ДНК до кінця не з'ясовано. Вважають, що аміногрупи відштовхують катіони  $Mg^{2+}$ , необхідні для активності цього ензиму, або можуть просторово перешкоджати його доступу до ДНК, іммобілізованої в комплексі [20]. Тому поліамфолітні носії ДНК можна розглядати як своєрідні інгібітори активності ДНКазу I [21].

Таким чином, продемонстровано ефективну іммобілізацію плазмідної ДНК новими поліамфолітними аміновмісними носіями типу BG-2. Як асоціація, так і вивільнення ДНК з комплексу із цими носіями не спричинює структурних змін ДНК. Виявлено здатність носіїв BG-2 захищати плазмідну ДНК від розщеплення ДНКазою I. Охарактеризовані носії є перспективними для доставлення генів ДНК у реципієнтні клітини.

Роботу виконано за фінансової підтримки гранту, наданого Є. З. Філяку і Н. С. Фінюк Західно-Українським біомедичним дослідницьким центром (2011–2012 рр.), а також проекту за договором № 46 цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій». Автори вдячні к. б. н. Стасику О. В. за надання плазмиду рGLG578.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Barry M. E., Pinto-Gonzalez D., Orson F. M., McKenzie G. J. Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection // *Hum. Gene Ther.* — 1999. — V. 10. — P. 2461–2480.
2. Lungwitz U., Breunig M., Blunk T., Göpferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems // *Europ. J. Pharmac. Biopharmac.* — 2005. — V. 60, N 2. — P. 247–266.
3. Rudolph C., Ortiz A., Schillinger U. et al. Methodological optimization of polyethylenimine (PEI)-based gene delivery to the lungs of mice via aerosol application // *J. Gene Med.* — 2005. — V. 7, N 1. — P. 59–66.
4. Wang Y., Chen P., Shen J. The development and characterization of a glutathione-sensitive cross-linked polyethylenimine gene vector // *Biomaterials.* — 2006. — V. 27, N 30. — P. 5292–5298.
5. Liu G., Swierczewska M., Lee S., Chen X. Functional nanoparticles for molecular imaging guided gene delivery // *Nano Today.* — 2010. — V. 5. — P. 524–539.
6. Sun X., Zhang N. Cationic polymer optimization for efficient gene delivery // *Mini Rev. Med. Chem.* — 2010. — V. 10, N 2. — P. 108–125.
7. Marvaniya H. M., Parikh P. K., Patel V. R. et al. Dendrimer nanocarriers as versatile vectors in gene delivery // *J. Chem. Pharm. Res.* — 2010. — V. 2, N 3. — P. 97–108.
8. Strand S. P., Lelu S., Reitan N. K. et al. Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking // *Biomaterials.* — 2010. — V. 31, N 5. — P. 975–987.
9. Tros de Larduya C., Sun Y., Düzgüns N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes // *Eur. J. Pharm. Sci.* — 2010. — V. 40, N 3. — P. 159–170.
10. Hu J., Kovtun A., Tomaszewski A. et al. A new tool for the transfection of corneal endothelial cells: Calcium phosphate nanoparticles // *Acta Biomaterialia.* — 2012. — V. 8. — P. 1156–1163.
11. Zaichenko A. S., Voronov S. A., Shevchuk O. M. et al. Kinetic features and molecular weight characteristics of terpolymerization products of the systems based on vinyl acetate and 5-tert-butyl-peroxy-5-methyl-1-hexene-3-yne // *J. Appl. Polymer Science.* — 1997. — V. 67. — P. 1061–1066.
12. Sohn J. H., Choi E. S., Kang H. A. et al. A dominant selection system designed for copy-number-controlled gene integration in *Hansenula polymorpha* DL-1 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1999. — V. 51. — P. 800–807.
13. Stasyk O. G., Maidan M. M., Stasyk O. V. et al. Identification of hexose transporter-like sensor HXS1 and functional hexose transporter HXT1 in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *Eucar. Cell.* — 2008. — V. 7, N 4. — P. 735–746.
14. Lee S. Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // *Biotechniques.* — 1990. — V. 9, N 6. — P. 676–679.
15. Zou W., Liu C., Chen Z., Zhang N. Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA // *Nanoscale Res. Lett.* — 2009. — V. 4, N 9. — P. 982–992.
16. Fu C., Sun X., Liu D. et al. Biodegradable triblock copolymer poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine)(PLA-PEG-PLL) as a non-viral vector to enhance gene transfection // *Int. J. Mol. Sci.* — 2011. — V. 12, N 2. — P. 1371–1388.
17. Oster C. G., Wittmar M., Bakowsky U., Kissel T. DNA nano-carriers from biodegradable cationic branched polyesters are formed by a modified solvent displacement method // *J. Contr. Release.* — 2006. — V. 111. — P. 371–381.
18. Park M. R., Han K. O., Han I. K. et al. Degradable polyethylenimine-alt-poly(ethylene glycol) copolymers as novel gene carriers // *Ibid.* — 2005. — V. 105. — P. 367–380.
19. Pollard H., Toumaniantz G., Amos J. L. et al. Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids // *J. Gene Med.* — 2001. — V. 3. — P. 153–164.
20. He X. X., Wang K., Tan W. et al. Bioconjugated nanoparticles for DNA protection from cleavage // *J. Am. Chem. Soc.* — 2003. — V. 125, N 24. — P. 7168–7169.
21. Roy I., Ohulchanskyy T. Y., Bharali D. J. et al. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — V. 102, N 2. — P. 279–284.

**ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛИПЛЕКСОВ  
НОВЫМИ ПОВЕРХНОСТНО-  
АКТИВНЫМИ ГРЕБНЕПОДОБНЫМИ  
ПОЛИАМФОЛИТАМИ  
И ПЛАЗМИДНОЙ ДНК**

*Н. С. Финюк<sup>1,3</sup>  
Т. Я. Витак<sup>3</sup>  
Н. Е. Митина<sup>2</sup>  
Е. З. Пиляк<sup>1</sup>  
О. С. Заиченко<sup>2</sup>  
Р. С. Стойка<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Институт биологии клетки НАН Украины,  
Львов

<sup>2</sup>Национальный университет  
«Львовская политехника»

<sup>3</sup>Львовский национальный университет  
имени Ивана Франко

*E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua*

Исучено образование интерполиэлектролитных комплексов (полиплексов) плазмидной ДНК с новыми поверхностно-активными гребнеподобными полиамфолитными носителями с использованием метода определения задержки движения ДНК во время электрофореза в геле агарозы. Установлены оптимальные условия для образования полиплексов, а именно: концентрация полиамфолитных носителей 0,01–0,003%, pH 7,4, 20 мин и 24 °C. Показано, что полиамфолит с кватернизованными боковыми аминокислотными цепями образует наиболее стабильные полиплексы с плазмидной ДНК. Ассоциация и высвобождение ДНК из комплекса с полиамфолитными носителями не вызывает ее структурных изменений, более того, эти носители защищают ДНК от расщепления нуклеазами. Следовательно, новые поверхностно-активные гребнеподобные полиамфолиты могут быть перспективными носителями для доставки ДНК в реципиентные клетки.

**Ключевые слова:** плазмидная ДНК, полиамфолитные носители, стабильность полиплексов, электрофорез ДНК.

**POLYPLEX FORMATION BY NOVEL  
SURFACE ACTIVE COMB-LIKE  
POLYAMFOLYTES AND PLASMID DNA**

*N. S. Finiuk<sup>1,3</sup>  
T. Y. Vitak<sup>3</sup>  
N. Y. Mitina<sup>2</sup>  
Y. Z. Filyak<sup>3</sup>  
O. S. Zaichenko<sup>2</sup>  
R. S. Stoika<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology of National Academy  
of Sciences of Ukraine, Lviv

<sup>2</sup>Lviv National Polytechnic University

<sup>3</sup>Ivan Franko National University of Lviv

*E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua*

Formation of the interpolyelectrolytic complexes (polyplexes) of plasmid DNA and novel surface active comb-like polyampholytic carriers was studied. To do that, the method of determining DNA retardation during its electrophoresis in the agarose gel was used. Optimal conditions for the formation of such polyplexes were defined: PC concentration 0.1–0.003 %, pH 7.4, 20 min, 24 °C. It was found that polyampholyte possessing quaternized amino-containing side chains is capable to form the most stable polyplexes with plasmid DNA. The association of DNA with polyampholytic carriers and its release from such complex do not cause changes in DNA structure. Therefore, the polyampholytic carriers under study protected DNA from its nuclease cleavage. Thus, novel surface active comb-like polyampholytes are perspective carriers for delivering DNA to the recipient cells.

**Key words:** plasmid DNA, polyampholytic carriers, stability of polyplexes, DNA electrophoresis.