

CHARAKTERYSTYKA NANOSTRUKTURALNA MATERIAŁU GENETYCZNEGO DO ZASTOSOWANIA W TERAPII GENOWEJ

NANOSTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF GENETIC MATERIAL FOR GENE THERAPY APPLICATION

Maciej Duda¹, Kaja Frączkowska¹, Magdalena Przybyło¹, Marta Kopaczyńska^{1*}

¹ Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Katedra Inżynierii Biomedycznej, 50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27

* e-mail: marta.kopaczynska@pwr.edu.pl

STRESZCZENIE

Terapia genowa jest obecnie bardzo dynamicznie rozwijającą się techniką biomedyczną, która może znaleźć zastosowanie w medycynie w leczeniu chorób przewlekłych i dziedzicznych. Badania skupiają się na opracowywaniu nowych strategii dotyczących procesów kondensacji i ochrony materiału genetycznego (DNA) wprowadzanego do komórki docelowej. Struktura i stopień upakowania dostarczanego DNA wpływają na kluczowe właściwości fizykochemiczne, determinujące czy wprowadzony wektor rekombinowany ulegnie ekspresji, czy też degradacji. Związki chemiczne, zwane czynnikami kondensującymi, to substancje powodujące zwinięcie DNA, a stopień kondensacji materiału genetycznego zależy bezpośrednio od rodzaju i stężenia użytego czynnika kondensującego. Do cząsteczek wykazujących właściwości kondensujące należą poliaminy, w opisywanym eksperymencie zastosowano poliaminę – spermidynę. Przeprowadzone badania miały na celu charakterystykę nanostrukturalną materiału genetycznego pod wpływem działania czynnika kondensującego. W wyniku analizy wykonanej za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) wykazano, że plazmid DNA ulega kondensacji pod wpływem spermidyny, formując struktury rozetowe.

Słowa kluczowe: kondensacja DNA, spermidyna, terapia genowa, mikroskopia sił atomowych

ABSTRACT

Gene therapy is a new promising method that may find many applications in modern biomedicine. Especially, it may be a powerful tool in chronic and hereditary diseases treatment. Current studies focus on development of novel strategies concerning genetic material (DNA) condensation and protection, whilst it is introduced into the cellular nucleus. Once the DNA enters the cell, it's either passed on and expressed in the nucleus or degraded by intracellular nucleases. The structure and the degree of compaction influence physicochemical properties that determine what will happen to delivered genetic material. DNA coiling can be caused by chemical compounds called compaction agents, such as polyamines like spermidine used in this study. The aim of this research was to examine the nanostructural characteristics of genetic material exposed to compaction agent. The measurements and analysis performed by atomic force microscopy (AFM) indicate that DNA plasmid undergoes condensation and forms rosette-like structures once subjected to spermidine.

Keywords: DNA condensation, spermidine, gene therapy, atomic force microscopy

1. Wstęp

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) pełni rolę nośnika informacji genetycznej organizmów żywych. Związek ten należy do liniowych, wielcząsteczkowych biopolimerów. Ludzkie genomowe DNA po rozwinięciu osiąga długość rzędu 2 metrów, dlatego musi być skondensowane, aby zmieściło się w jądrze komórkowym, którego średnica wynosi kilka mikrometrów. Niemniej jednak, cząsteczka DNA musi być łatwo dostępna dla aktywnych cząsteczek biologicznych i enzymów, przeprowadzających procesy komórkowe, takie jak replikacja czy ekspresja genów. Kwasy nukleinowe w roztworach wodnych przyjmują postać polianionów. Wysoki ładunek elektryczny cząsteczki DNA w środowisku komórkowym istotnie komplikuje kondensację tego związku w wyniku odpychania pomiędzy niciami. W komórkach ludzkich genomowe DNA nawinięte jest na dodatnio naładowane białka – oktamerzy histonowe – i upakowane w struktury zwane chromosomami [1, 2].

Od roku 1953, kiedy struktura DNA została poznana i przedstawiona przez zespół Watsona i Cricka [3], przeprowadzono wiele badań i eksperymentów mających na celu lepsze poznanie mechanizmów kierujących cyklem życiowym komórki. Szczególną uwagę poświęcono charakterystyce procesu kondensacji DNA, ze względu na jego fundamentalne znaczenie w fizjologii komórki, a także w patogenezie i przebiegu niektórych chorób genetycznych i nowotworowych [4, 5]. Jednostką chorobową, w której kondensacja DNA odgrywa ważną rolę, jest mukowiscydoza. U chorych na tę chorobę w warstwie śluzu zalegającego w drogach oddechowych wykryto kompleksy DNA z antybiotykami aminoglikozydowymi. Zjawisko to istotnie obniża skuteczność leczenia infekcji bakteryjnych występujących u chorych na mukowiscydozę, niejednokrotnie prowadzących do śmierci pacjentów [6]. Kondensacja DNA została zaobserwowana również w warunkach *in vitro*, najczęściej jako wynik neutralizacji ujemnego ładunku cząsteczki, co skutkuje zmniejszeniem odpychania między niciami [4, 5, 7]. Dokładne zrozumienie tych procesów doprowadziło do powstania nowej strategii w leczeniu chorób genetycznych i dziedzicznych – terapii genowej. Strategia ta polega na transfekcji kwasów nukleinowych do ludzkich komórek i tkanek za pomocą specjalnie zaprojektowanych nośników, nazywanych wektorami [5, 8]. Następnie dochodzi do substytucji wadliwego genu lub zakłócenia jego ekspresji na poziomie transkrypcji lub translacji. W tym celu najczęściej używane są tripleksy DNA, plazmidy, małe interferencyjne RNA (siRNA) lub oligonukleotydy antysensowne (asON) [9].

Ostatnie doniesienia naukowe z zakresu terapii genowej wykazują, że w przeciągu ostatnich dwóch dekad doszło do znaczącego rozwoju w dziedzinie inżynierii genetycznej zajmującej się projektowaniem wektorów wirusowych oraz nowych systemów nośnikowych dla materiału genetycznego [10, 11, 12]. Jednak w dalszym ciągu toksyczność ostra, humoralna odpowiedź immunologiczna czy mutageneza insercyjna pozostają kluczowymi problemami. Częściową odpowiedzią na wymienione trudności są prace prowadzone nad projektowaniem wektorów niewirusowych. Cząsteczki te są w stanie dostarczać różnego rodzaju czynniki przeciwnowotworowe, takie jak przeciwciała, syntetyczne oligonukleotydy i interferujące RNA (siRNA) z dużo mniejszą ilością niepożądanych efektów niż wektory wirusowe, lecz również z dużo mniejszą wydajnością i efektywnością ekspresji [13, 14, 15].

Procesy kondensacji i dekonensacji materiału genetycznego są kluczowymi zagadnieniami w odniesieniu do poprawnego i wydajnego procesu dostarczenia genu do konkretnej komórki. Pierwszym etapem jest przejście DNA przez błonę komórkową. Musi być ono pozbawione ładunku i ściśle upakowane, w celu minimalizacji rozmiaru cząsteczki. Po przejściu przez błonę materiał genetyczny w formie skondensowanej musi być chroniony przed działaniem enzymów restrykcyjnych, zwanych nukleazami, aż do momentu gdy zostanie dostarczony do jądra komórkowego. Po dotarciu do celu, DNA powinno być dostępne dla enzymów obecnych w jądrze. Taka możliwość istnieje tylko wtedy, gdy materiał genetyczny ulegnie dekonensacji w stopniu umożliwiającym jego rozpoznanie przez białka docelowe. Dlatego stopień kondensacji DNA jest bardzo ważną właściwością w terapii genowej [16]. Zostało to udowodnione w badaniach nad transportem kompleksów DNA-lipid oraz DNA-poli-L-lizyna przez dwuwarstwą lipidową [17, 18].

W związku z ogromnym znaczeniem stopnia kondensacji materiału genetycznego w terapii genowej, opracowano wiele różnych strategii dotyczących stopnia upakowania DNA, który był badany za pomocą odpowiednich czynników kondensujących. Są to związki, które wywołują związanie się DNA poprzez przyciąganie się poszczególnych monomerów w szkielecie polimerowym [19]. Do pierwszej, najprostszej grupy czynników kondensujących należą polikationy o ładunku równym lub większym niż +3, znajdujące się w roztworze z materiałem genetycznym [20]. Innymi czynnikami powodującymi kondensację DNA są poliamidy [21], protaminy [22], jony metali [23], polipeptydy, proteiny [24], lipidy, liposomy [25] i transpozony [26]. Kolejny zbiór związków tworzą surfaktanty, czyli amfifilowe cząsteczki zdolne do samoorganizacji. Ich wykorzystanie w kondensacji DNA zostało opisane w badaniach z wykorzystaniem lipospermidyny i lipoprotein [27, 28]. Do czynników kondensujących DNA zaliczane są również nanocząstki, które mogą dodatkowo działać jako systemy transportujące oraz tworzące kompleksy z DNA. Oprócz funkcji transportujących i kompleksujących, nanocząsteczki mogą także wykazywać właściwości kontrastujące w obrazowaniu medycznym [9, 29, 30]. Jest to potencjalnie bardzo ważne zastosowanie w nanomedycznej terapii i diagnostyce, dlatego też obecnie prowadzone są liczne badania na temat oddziaływań pomiędzy materiałem genetycznym a różnymi rodzajami nanocząsteczek [31, 32].

W pracy przedstawiono eksperyment z udziałem materiału genetycznego i spermidyny w celu zbadania charakterystyki nanostrukturalnej i stopnia kondensacji DNA przed i po dodaniu poliaminowego czynnika kondensującego. Badania przeprowadzono za pomocą wysokorozdzielczej techniki nanoskopowej – mikroskopii sił atomowych (AFM).

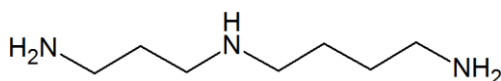
2. Materiały i metody

2.1. Materiał genetyczny

Materiał do badań stanowił plazmid kwasu deoksyrybonukleinowego DNA o długości 2500 pz. Do badań przygotowano wodny roztwór o stężeniu 20 μM .

2.2. Czynniki kondensujący

Jako czynnik kondensujący materiał genetyczny wykorzystano spermidynę (Sigma-Aldrich, Spermidine $\geq 99,0\%$) o strukturze przedstawionej na rysunku 1.



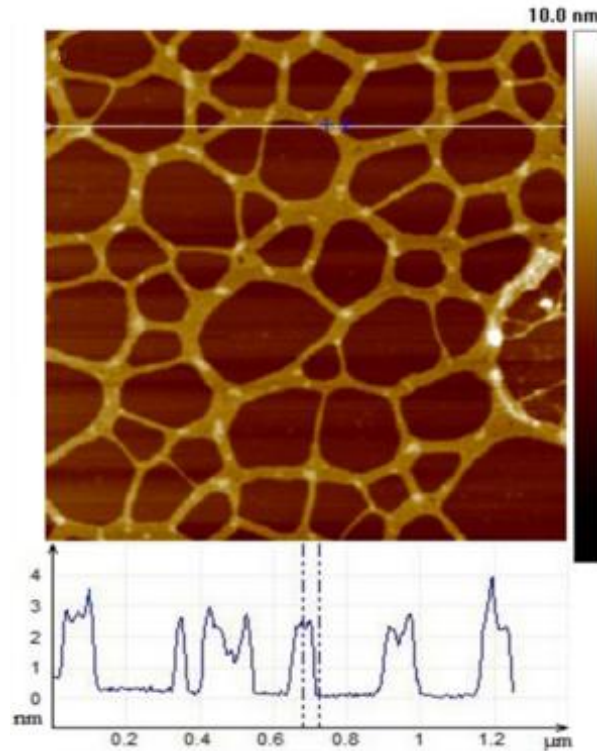
Rys. 1. Struktura chemiczna spermidyny

2.3. Mikroskopia sił atomowych

W celu przeprowadzenia nanostrukturalnej charakterystyki oddziaływania spermidyny z DNA za pomocą AFM użyto zawiesiny plazmidu DNA w wodzie. Do próbki z plazmidem dodano wodny roztwór spermidyny, tak aby stosunek molowy stężenia spermidyny do stężenia DNA wyniósł 250:1 oraz 2000:1. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina plazmidu bez dodatku spermidyny. Tak przygotowane próbki rozcieńczono sześciokrotnie w buforze zawierającym 150 mM chlorku magnezu, 150 mM chlorku potasu i 20 mM HEPES. Następnie, z każdej próbki pobrano 10 μl i naniesiono na kwadratowy fragment świeżo rozlupanej miki (Plano) o wymiarach ok. 1x1 cm. Materiał inkubowano na podłożu przez 60 s. Po tym czasie próbkę przemyto ultraczystą wodą w celu usunięcia niezwiązanych kompleksów i resztek buforu. W kolejnym etapie, w celu otrzymania pojedynczych, rozseparowanych nici DNA, wykorzystano technikę „molekularnego czesania” (ang. *molecular combing*) próbki w strumieniu azotu pod kątem 45° przez 60 s. Obrazowanie próbek przeprowadzono za pomocą mikroskopu Multi Mode Nanoscope (Bruker), w trybie kontaktu przerywanego (ang. *tapping mode*). Zastosowano silikonową dźwignię o częstotliwości rezonansowej 183–192 kHz i sztywności 43 N/m. Częstotliwość skanowania próbki wynosiła 1600 Hz. Powierzchnię obrazowano w powietrzu, w temperaturze pokojowej.

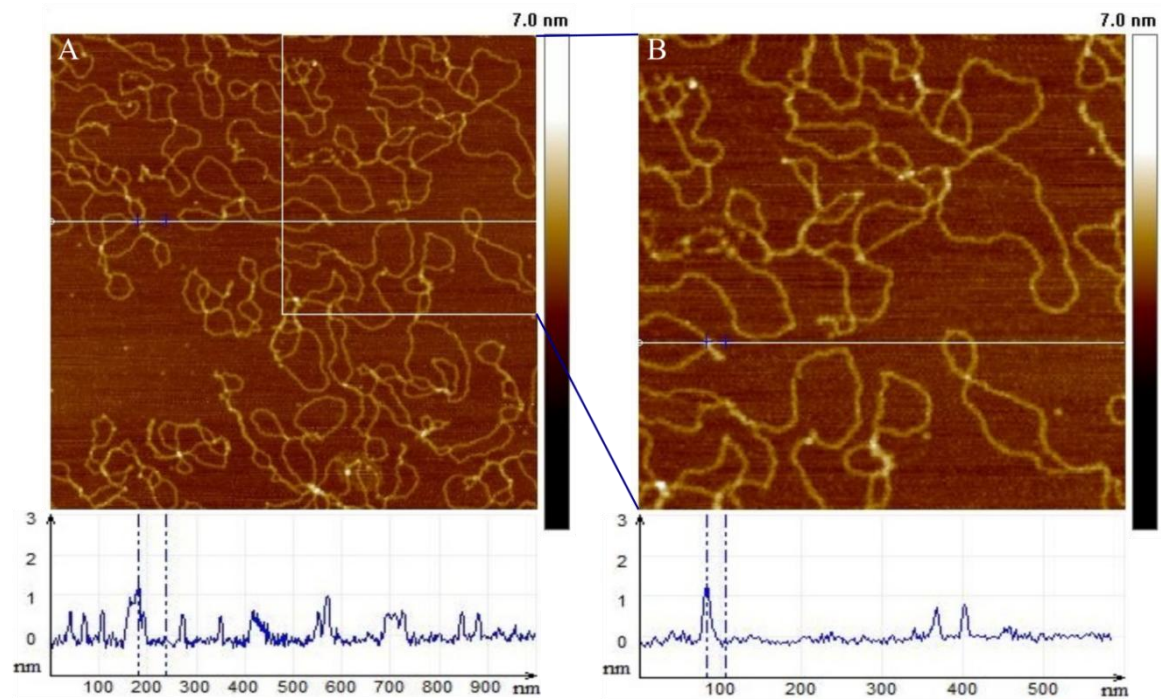
3. Wyniki badań

Rysunek 2 przedstawia obrazy AFM plazmidu DNA bez dodatku spermidyny nałożone na powierzchnię miki. Obrazy te przedstawiają silnie zagregowany i zwinięty materiał genetyczny bez wykorzystania techniki „molekularnego czesania”. Taka postać DNA uniemożliwia obserwację pojedynczych nici na powierzchni. Zmierzone wysokości zagregowanego materiału genetycznego zawierały się w przedziale 1,8–2,3 nm.



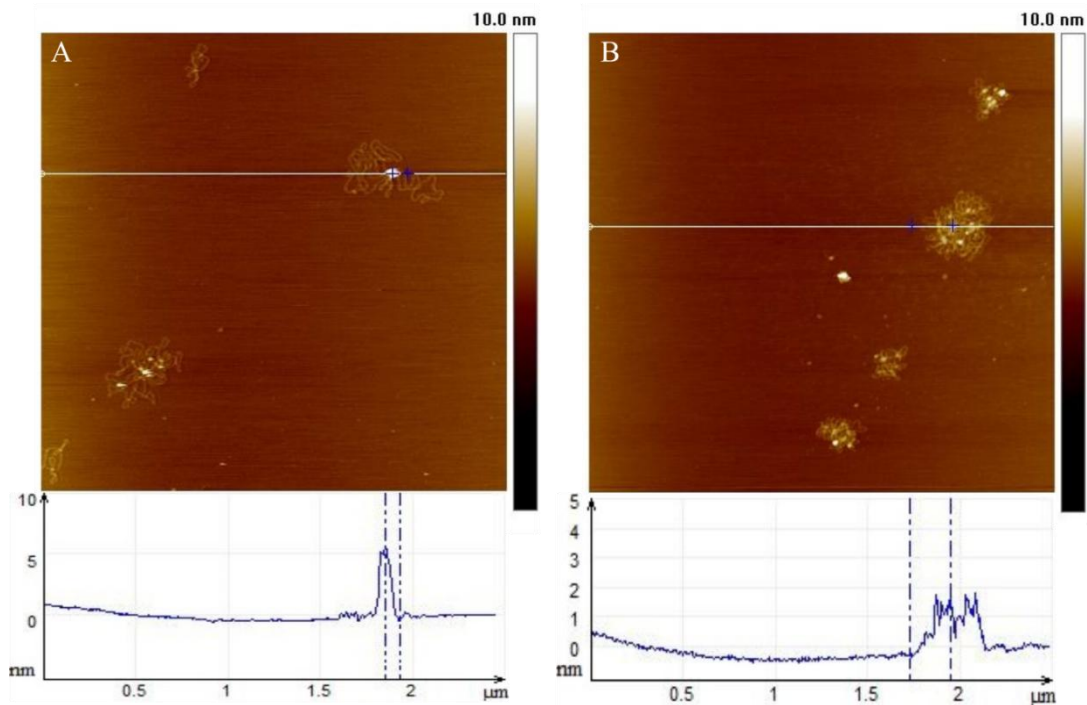
Rys. 2. Obrazy AFM zagregowanego materiału genetycznego na powierzchni miki uzyskane bez wykorzystania techniki „molekularnego czesania”.
Obraz wyskalowano na wysokość 10 nm, ponieważ zagregowane nici DNA były najlepiej widoczne dla tej wartości

Obrazy AFM plazmidu DNA z wykorzystaniem techniki „molekularnego czesania” przedstawiono na rysunku 3. Dążenie materiału genetycznego do samoagregacji jest zminimalizowane. Widoczne są pojedyncze i niezwinęte nici leżące luźno i jednolicie pokrywające powierzchnię miki. Zmierzone wysokości pojedynczych nici plazmidowego DNA zawierały się w przedziale 0,6–1,1 nm.



Rys. 3. Obrazy AFM rozseparowanych nici plazmidu DNA na powierzchni miki po wykorzystaniu techniki „molekularnego czesania”: A) Próbką badanego plazmidu o wymiarach $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ i stężeniu $20\ \mu\text{M}$; B) Powiększenie obszaru próbki A, zaznaczonego białym prostokątem, do wymiarów $0,5\ \mu\text{m} \times 0,5\ \mu\text{m}$. Obrazy wyskalowano na wysokość $7\ \text{nm}$, ponieważ materiał genetyczny w postaci pojedynczych nici był dla tej wartości najlepiej widoczny

Na rysunku 4 przedstawiono wynik obrazowania materiału genetycznego znajdującego pod wpływem działania spermidyny. Rysunki 4a i 4b pokazują znaczną tendencję DNA do formowania struktur skondensowanych. Nie zaobserwowano pojedynczych, wolnych nici plazmidu DNA. Ponadto, wraz ze wzrostem stężenia spermidyny, zwiększa się stopień kondensacji DNA, co jest widoczne przy porównaniu rysunków 4a i 4b. Taka postać plazmidu spełnia wstępne wymagania strukturalne i wykazuje potencjalne zastosowanie w terapii genowej. Wysokość zaobserwowanych struktur rozetowych mieści się w przedziale od $0,8\ \text{nm}$ dla pojedynczych nici, do $4,9\ \text{nm}$ w przypadku skondensowanych form DNA.



Rys. 4. Obrazy AFM skondensowanego materiału genetycznego na powierzchni miki pod wpływem działania spermidyny w różnych stężeniach molowych: A) stosunek stężeń molowych spermidyna:DNA 250:1; B) 2000:1

Biodegradowalne polikationy należą do obiecujących czynników kondensujących kwasy nukleinowe w terapii genowej i są tematem wielu badań naukowych dotyczących projektowania wektorów do transfekcji genów do komórek chorego [33, 34]. Spermidyna należy do polikationowych amin naturalnie występujących w komórkach organizmów żywych. Poliaminy pełnią różnorodne funkcje odpowiedzialne za proliferację i różnicowanie komórek, są zaangażowane w biosyntezę DNA, RNA oraz białek [35]. Ponadto, spermidyna stabilizuje strukturę DNA i chroni ją przed czynnikami uszkadzającymi, np. wolnymi rodnikami [36]. Za pomocą elektroforezy wykazano również obniżoną prędkość migracji kompleksów DNA-spermidyna w porównaniu do natywnego DNA, co było spowodowane neutralizacją ujemnego ładunku DNA przez dodatnio naładowaną poliaminę [37].

W naszych badaniach za pomocą techniki mikroskopii sił atomowych (AFM) zaobserwowaliśmy kondensację DNA pod wpływem działania spermidyny, co ma związek z neutralizacją ujemnego ładunku DNA i zmniejszeniem odpychania między niciami. Stopień stabilizacji i kondensacji struktury DNA rośnie wraz ze wzrostem stężenia poliaminy (p. rys. 4). Odpowiednie stężenie spermidyny może różnicować stopień kondensacji DNA, co może być zastosowane w przypadku projektowania wektorów terapii genowej. Ponadto, zastosowanie spermidyny jako czynnika kondensującego DNA, może wyeliminować większość skutków ubocznych spowodowanych wektorami wirusowymi czy syntetycznymi. Konieczne są jednak dalsze badania pozwalające na ustalenie optymalnych warunków kondensacji DNA oraz transfekcji genu do komórki.

4. Wnioski

Terapia genowa jest bardzo obiecującym narzędziem inżynierii genetycznej i medycyny, pozwalającym na potencjalnie rozwiązanie problematyki schorzeń genetycznych. Należy jednak, przed wdrożeniem tej techniki do praktyki klinicznej, wykluczyć działania niepożądane, takie jak humoralna odpowiedź immunologiczna czy też toksyczność ostra, występująca jako reakcja organizmu na przyjęcie rekombinowanego wektora. Charakter reakcji na wprowadzany wektor w dużej mierze zależy od struktury i stopnia kondensacji materiału genetycznego, na co z kolei bezpośredni wpływ mają związki chemiczne wykorzystywane do upakowywania DNA. Zaobserwowano, że spermidyna oddziałuje z materiałem genetycznym, powodując zmianę jego struktury z liniowej (p. rys. 3) na silnie upakowane rozety (p. rys. 4). Ponadto, jako związek naturalny, spermidyna nie powinna wywoływać skutków ubocznych po jej podaniu do organizmu człowieka. Związek ten może więc znaleźć

potencjalne zastosowanie w kondensacji DNA w terapii genowej. Badania pokazały także, że mikroskopia sił atomowych (AFM) jest przydatną techniką, pozwalającą na analizę charakterystyki nanostrukturalnej materiału genetycznego poddanego działaniu różnych bioczynników.

LITERATURA

- [1] M. O'Donnell, L. Langston, B. Stillman: *Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya*, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, vol. 5, 2013, s. 1–14.
- [2] T. Hirano: *Condensins and the evolution of torsion-mediated genome organization*, Trends Cell. Biology, vol. 24, 2014, s. 727–733.
- [3] J.D. Watson, F.H.C. Crick: *Molecular Structure of Nucleic Acids – a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, Nature, vol. 171, 1953, s. 737–738.
- [4] R.W. Wilson, V.A. Bloomfield: *Counterion-Induced Condensation of Deoxyribonucleic Acid. A Light-Scattering Study*, Biochemistry, vol. 18, 1979, s. 2192–2196.
- [5] A. Lee, A. Karcz, R. Akman, T. Zheng, S. Kwon, S.T. Chou, S. Sucayan, L.J. Tricoli, J.M. Hustedt, Q. Leng, J.D. Kahn, A.J. Mixson, J. Seog: *Direct observation of dynamic mechanical regulation of DNA condensation by environmental stimuli*, Angewandte Chemie International Edition in English, vol. 53, 2014, s. 10631–10635.
- [6] K.R.P. Drew, L.K. Sanders, Z.W. Culumber, O. Zribi, G.C.L. Wong: *Cationic amphiphiles increase activity of aminoglycoside antibiotic tobramycin in the presence of airway polyelectrolytes*, Journal of the American Chemical Society, vol. 131, 2009, s. 486–493.
- [7] C. Ma, V.A. Bloomfield: *Condensation of supercoiled DNA induced by MnCl₂*, Biophysical Journal, vol. 67, 1994, s. 1678–1681.
- [8] M.A. Kotterman, D.V. Schaffer: *Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy*, Nature Reviews Genetics, vol. 15, 2014, s. 445–451.
- [9] T. Zhou, A. Llizo, C. Wang, G. Xu, Y. Yang: *Nanostructure-induced DNA condensation*, Nanoscale, vol. 5, 2013, s. 8288–8306.
- [10] D. Luo, W.M. Saltzman: *Synthetic DNA delivery systems*, Nature Biotechnology, vol. 18, 2000, s. 33–37.
- [11] C.S. Hackett, A.M. Geurts, P.B. Hackett: *Predicting preferential DNA vector insertion sites: implications for functional genomics and gene therapy*, Genome Biology, vol. 8, 2007, s. 12.1–12.17.
- [12] H. Hosseinkhani, Y.R. Chen, W.J. He, P.D. Hong, D.S. Yu, A.J. Domb: *Biodegradable nanoparticles for gene therapy technology*, Journal of Nanoparticle Research, vol. 15, 2013, s. 1794–1809.
- [13] M.A. Kay, J.C. Glorioso, L. Naldini: *Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics*, Nature Medicine, vol. 7, 2001, s. 33–40.
- [14] F. Abedini, H. Hosseinkhani, M. Ismail, Y.R. Chen, A.R. Omar, P.P. Chong, A.J. Domb: *In vitro intracellular trafficking of biodegradable nanoparticles dextran-spermine in cancer cell lines*, International Journal of Nanotechnology, vol. 8, 2011, s. 712–723.
- [15] W. He, H. Hosseinkhani, R. Mohammadinejad, Z. Roveimiab, D.Y. Hueng, K.L. Ou, A.J. Domb: *Polymeric nanoparticles for therapy and imaging*, Polymers for Advanced Technologies, vol. 25, 2014, s. 1216–1225.
- [16] A. Gonzalez-Perez, R.S. Dias: *Different strategies for controlling DNA conformation: compaction and decompaction*, Frontiers in Bioscience, vol. E1, s. 228–241.
- [17] A. Ahmad, H.M. Evans, K. Ewert, C.X. George, C.E. Samuel, C.R. Safinya: *New multivalent cationic lipids reveal bell curve for transfection efficiency versus membrane charge density: lipid-DNA complexes for gene delivery*, The Journal of Gene Medicine, vol. 7, 2005, s. 739–748.
- [18] T. Kimura, T. Yamaoka, R. Iwase, A. Murakami: *Effect of physicochemical properties of polyplexes composed of chemically modified PL derivatives on transfection efficiency in vitro*, Macromolecular Bioscience, vol. 2, 2002, s. 437–446.
- [19] A. Esteves-Torres, D. Baigl: *DNA compaction: fundamentals and applications*, Soft Matter, vol. 7, 2011, s. 6746–6756.
- [20] V.A. Bloomfield: *DNA condensation by multivalent cations*, Biopolymers, vol. 44, 1997, s. 269–282.
- [21] I. Nayvelt, M.T. Hyvönen, L. Alhonen, I. Pandya, T. Thomas, A.R. Khomutov, J. Vepsäläinen, R. Patel, T.A. Keinänen, T.J. Thomas: *DNA condensation by chiral α -methylated polyamine analogues and protection of cellular DNA from oxidative damage*, Biomacromolecules, vol. 11, 2010, s. 97–105.
- [22] R. Balhorn: *The protamine family of sperm nuclear proteins*, Genome Biology, vol. 8, 2007, s. 227.1–227.8.
- [23] C. Li, H. Tian, S. Duan, X. Liu, P. Xu, R. Qiao, Y. Zhao: *Controllable DNA condensation-release induced by simple azaheterocyclic-based metal complexes*, The Journal of Physical Chemistry B, vol. 115, 2011, s. 13350–13354.
- [24] P. Saccardo, A. Villaverde, N. González-Montalbán: *Peptide-mediated DNA condensation for non-viral gene therapy*, Biotechnology Advances, vol. 27, 2009, s. 432–438.
- [25] N.M. Rao: *Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic*, Chemistry and Physics of Lipids, vol. 163, 2010, s. 245–252.
- [26] H. Hosseinkhani, F. Abedini, K.L. Ou, A.J. Domb: *Polymers in gene therapy technology*, Polymers for Advanced

- Technologies, vol. 26, 2015, s. 198–211.
- [27] J.E. Waterhouse, R.P. Harbottle, M. Keller, K. Kostarelos, C. Coutelle, M.R. Jorgensen, A.D. Miller: *Synthesis and application of integrin targeting lipopeptides in targeted gene delivery*, ChemBioChem, vol. 6, 2005, s. 1212–1223.
- [28] G. Ronsin, C. Perrin, P. Guedat, A. Kremer, P. Camilleri, A.J. Kirby: *Novel spermine-based cationic gemini surfactants for gene delivery*, Chemical Communications, vol. 21, 2001, s. 2234–2235.
- [29] V. Vijayanathan, T. Thomas, T.J. Thomas: *DNA Nanoparticles and Development of DNA Delivery Vehicles for Gene Therapy*, Biochemistry, vol. 41, 2002, s. 14085–14094.
- [30] Y.S. Choi, M.Y. Lee, A.E. David, Y.S. Park: *Nanoparticles for gene delivery: therapeutic and toxic effects*, Molecular and Cellular Toxicology, vol. 10, 2014, s. 1–8.
- [31] S. Rudiuk, K. Yoshikawa, D. Baigl: *Enhancement of DNA compaction by negatively charged nanoparticles: Effect of nanoparticle size and surfactant chain length*, Journal of Colloid and Interface Science, vol. 368, 2012, s. 372–377.
- [32] A. Zinchenko, K. Tsumoto, S. Murata, K. Yoshikawa: *Crowding by Anionic Nanoparticles Causes DNA Double-Strand Instability and Compaction*, The Journal of Physical Chemistry B, vol. 118, 2014, 1256–1262.
- [33] H. Hosseinkhani, T. Azzam, Y. Tabata, A.J. Domb: *Dextran–sperminopolycation: an efficient nonviral vector for in vitro and in vivo gene transfection*, Gene Therapy, vol. 11, 2004, s. 194–203.
- [34] T. Azzam, A. Raskin, A. Makovitzki, H. Brem, P. Vierling, M. Lineal, A.J. Domb: *Cationic polysaccharides for gene delivery*, Macromolecules, vol. 35, 2002, s. 9947–9953.
- [35] M. Atiya Ali, B. Strandvik, K.G. Sabel, C. Palme Kilander, R. Strömberg, A. Yngve: *Polyamine levels in breast milk are associated with mothers' dietary intake and are higher in preterm than full-term human milk and formulas*, Journal of Human Nutrition and Dietetics, vol. 27, 2014, s. 459–467.
- [36] A.U. Khan, Y.H. Mei, T. Wilson: *A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen*, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., vol. 89, 1992, s. 11426–11427.
- [37] S. Hou, X. Li, X.Z. Feng: *Method to improve DNA condensation efficiency by alkali treatment*, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, vol. 28, 2009, s. 725–735.

otrzymano / submitted: 20.12.2014

wersja poprawiona / revised version: 11.02.2015

zaakceptowano / accepted: 15.02.2015