

А. О. Кривцов, А. В. Биалов, У. Олссон,
Б. Линдман

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ МНОГОЗАРЯДНОГО ПРОТИВООИОНА НА СОЛЮБИЛИЗАЦИЮ ДНК ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНОЙ

Ключевые слова: самоассоциация, полиамины, ДНК, липид, фазовое равновесие.

Изучение влияния природы противоиона на фазовое поведение ДНК является продолжением работы по выявлению закономерностей самоорганизации биополимеров. В данной статье раскрывается фазовая диаграмма трехкомпонентной системы полиамин-ДНК/лецитин/вода. Показано, что нейтральный стехиометрический комплекс полиамин-ДНК не встраивается в структуру липидной мембраны. Этот результат помог по-новому взглянуть на роль амфифильных противоионов в самоассоциации ДНК и липида.

Key words: selfassembling, polyamines, DNA, lipids, phase equilibrium.

An influence of the counter-ion nature on the phase behavior of DNA is an extension of research studying the biopolymers self-organization. In this article the phase diagram of the polyamine-DNA/lecithin/water ternary system is revealed. It is shown that the neutral stoichiometric polyamine-DNA complex doesn't penetrate into the lipid membrane. This result helped to look deeper on the role of amphiphilic counter-ions in the DNA-lipid self-association.

Введение

В рамках проекта по изучению закономерностей самоорганизации биополимеров в водной среде в присутствии лецитина, нами было изучено влияние многозарядного противоиона на амфифильные свойства и самоорганизацию молекул ДНК. Известно [1-9], что замена неорганического противоиона ДНК на катионное ПАВ открывает обширные возможности для настройки амфифильных свойств и геометрических решений самоорганизации ДНК. Так, в трехкомпонентной системе, с додецилтриметиламмонием (ДТА) в качестве противоиона ДНК, в присутствии лецитина в водной среде были обнаружены три жидкокристаллические (ЖК) фазы: ламеллярная, обратная гексагональная и кубическая [10]. На рисунке 1 приведены фазовые диаграммы трехкомпонентных систем ПАВ-ДНК/лецитин/вода. Изменение структуры ПАВ с однохвостого ДТА на двуххвостый дидодецилдиметиламмоний (ДДА) позволяет настраивать систему, влияя на фазовый состав, структуру и стабильность ЖК фаз [11], о чем свидетельствуют отличия фазовых диаграмм систем ДДА-ДНК/лецитин/вода (рис. 1) и ДТА-ДНК/лецитин/вода (рис. 2).

Правая сторона треугольника Гиббса на каждой фазовой диаграмме описывает фазовое поведение бинарной системы лецитин-вода. В литературе хорошо описана двойная система лецитин/вода. В работе Бергеншталя и Фонтелл [12] приведена фазовая диаграмма температура/состав, откуда следует, что при температуре в 25⁰С двойная система лецитин/вода образует ламеллярную ЖК фазу, когда весовая доля воды колеблется в пределах от 10 до 40 %. Эта структура стабильна до 240⁰С. Рентгеновские дифрактограммы образцов данного состава свидетельствуют о повторении структуры в одном разрешении через равные промежутки, увеличивающиеся по мере добавления воды. В среднем толщина углеводородного слоя этой ламеллярной фазы равна 38 Å [13].

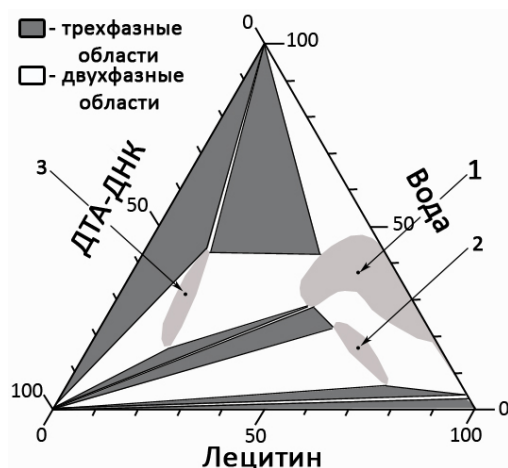


Рис. 1 - Фазовая диаграмма системы ДТА-ДНК/лецитин/вода при температуре 25⁰С: 1 – однофазный регион ламеллярной ЖК фазы; 2 – однофазный регион обратной гексагональной ЖК фазы; 3-х фазные области закрашены серым, 2-х фазные области не закрашены и даны без каких-либо обозначений. Состав дан в весовых процентах. Перерисовано из работы [10]

Лецитин часто применяется для моделирования клеточной мембраны при физико-химических исследованиях. Например, сравнивая две фазовые диаграммы представленные на рисунке 1, можно заметить, что область существования ламеллярной фазы сильно вытянута в сторону угла соответствующего чистому комплексу ДДА-ДНК. В случае ДТА-ДНК область ламеллярной фазы гораздо короче. Если быть точным, то ламеллярная фаза на основе лецитина может сольбуилизовать до 55 вес.% ДДА-ДНК, и не более 25 вес.% ДТА-ДНК. Это является основанием для утверждения, что проницаемость ДНК через клеточную мембрану будет эффективнее, если в качестве противоиона ДНК использовать катионное ПАВ с двумя углеводородными радикалами, а не с одним.

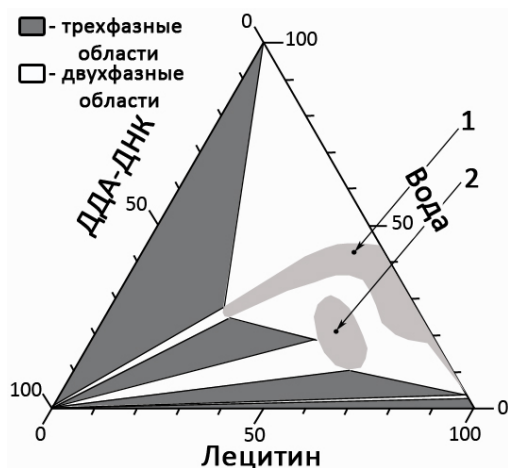


Рис. 2 - Фазовая диаграмма системы ДДА-ДНК/лецитин/вода при температуре 25°C: Обозначения: 1 – однофазный регион ламеллярной ЖК фазы; 2 – однофазный регион обратной гексагональной ЖК фазы; 3 – однофазный регион кубической ЖК фазы; 3-х фазные области залиты серым, 2-х фазные области не залиты и даны без каких-либо обозначений. Состав дан в весовых процентах. Перерисовано из работы [11]

В отсутствие амфифильных противоионов ДНК очень слабо взаимодействует с фосфолипидной мембраной, поскольку последняя носит хоть и слабый, но отрицательный поверхностный электростатический потенциал. Это служит барьером для проникновения одноименнозаряженной ДНК через двойной слой липида. Таким образом, есть основание предположить, что нейтрализация заряда является необходимым условием проникновения ДНК через клеточную мембрану. Мы видели, что ДНК может легко проникать в мембрану, если противоион содержит углеводородный радикал.

Насколько важна роль углеводородного радикала амфифильного противоиона? Для ответа на этот вопрос мы заменили ДТА и ДДА на спермин и спермидин.

Двухспиральная ДНК является сильнозаряженным и жесткоцепным полимером. Поэтому ДНК практически полностью обязана своей растворимостью в воде энтропийному вкладу от диссоциированных противоионов, в то время как вклад от конформационной энтропии полимерной цепи очень мал. ДНК прочно связывается с многозарядными катионами, такими как, например, многозарядные ионы металлов, положительно заряженные полиэлектролиты (поликатионы), катионные ПАВ или липиды, которые самоассоциируют с образованием многозарядных ансамблей (мицелл), а также полиамины (спермин, спермидин и т.д.). Данная работа сфокусирована на последней категории противоионов ДНК.

Химическая структура полиаминов предопределяет их гидрофильность. Являясь основаниями Льюиса как и простые амины охотно взаимодействующие со свободными протонами, спермин и спермидин легко гидролизуются в воде.

Таким образом на каждой из аминогрупп формируется частичный положительный заряд. Спермин, имея четыре аминогруппы в водной среде, обладает общим зарядом равным +4. Молекула спермидина, в отличие от молекулы спермина, содержит только три аминогруппы и поэтому при растворении в водной среде катион этого полиамина обладает максимальным зарядом равным +3.

Спермин как и спермидин содержится во всех эукариотических клетках и участвует в клеточном метаболизме. Они участвуют в стабилизации ДНК и РНК в живых клетках [14]. Влияние этих полиаминов на процессы происходящие с ДНК до конца еще не изучены и поэтому определить их влияние на ассоциативные взаимодействия главной макромолекулы животных организмов «in vitro» представляется интересной задачей.

В литературе описаны свойства комплексов ДНК и спермина [15]. Предлагаемая модель [15], учитывающая среднее расстояние между заряженными группами на полиамине и ДНК, подразумевает расположение молекул полиамина на поверхности ДНК вдоль основных бороздок двойной спирали. Известно, что уже при низких концентрациях полиамины успешно вытесняют с поверхности неорганические катионы практически полностью [15].

В данной работе для определения влияния оказываемого полиаминами на ассоциацию ДНК с клеточной мембраной были изучены трехкомпонентные системы, где комплексная соль ДНК-полиамин это первый компонент. Остальные два компонента – это лецитин и вода.

Экспериментальная часть

В целом для работы были приготовлены две комплексные соли: ДНК-спермин (Сп.-ДНК), ДНК-спермидин (Спд.-ДНК) и соответственно изучались две системы: сп.-ДНК / лецитин / вода и спд.-ДНК / лецитин / вода. Каждая из систем была изучена на основании около 70 образцов. Образцы готовились согласно единой методике, описанной ниже.

После достижения равновесного состояния в системе сначала производился визуальный осмотр образца с выявлением цвета, прозрачности, примерного количества фаз и их агрегатного состояния. Далее образцы помещались между двумя поляризаторами, для экспресс-анализа оптической анизотропии.

Далее использовался метод ЯМР. ^2H ЯМР спектроскопия позволяет точно определить наличие анизотропной ЖК фазы. Методика работы этого метода и основные принципы исследования описаны ниже.

Индивидуальные фазы самых интересных образцов были исследованы методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (SAXS). На этой стадии происходит установление точной структуры ЖК фазы и ее геометрических характеристик.

После анализа полученной информации строится тройная фазовая диаграмма.

Препараты

Натриевая соль ДНК, тип XIV, полученная из икры сельди, от фирмы Сигма (RN - D6898), была использована без дополнительной очистки. Данная ДНК имеет В-форму двойной спирали. Средняя длина молекулы ДНК составляет 700 пар оснований, что было определено методом электрофореза. Важно отметить, что использованная ДНК характеризуется высокой полидисперсностью. Концентрация ДНК была определена при помощи метода УФ-спектроскопии.

Полиамины спермин и спермидин торговой марки «Сигма» (RN –S3256; RN –S6743) были использованы без дополнительной очистки.

Соевый лецитин (1,2-диацил-сн-3-фосфатилдихолин), под торговым названием Epikuron 200, фирмы (Лукас Мейер Гамбург, Германия) был использован без дополнительной очистки. Его плотность составляет 1.02 г/мл. Высокое содержание ненасыщенных цепей жирных кислот (весовая доля более 78%) обуславливает температуру плавления лецитина Epikuron 200 цепи значительно ниже 0° С. Epikuron 200 содержит немного воды (приблизительно 2.5%), а молекулярная масса лецитина составляет 773 г/моль. Epikuron 200 содержит β -каротин как добавленный антиокислитель, обуславливающий оранжево-желтый цвет лецитина.

Вода. При приготовлении образцов была использована тяжелая вода, D₂O, производства фирмы «Dr Glaser AG» с целью применения метода ²H ЯМР. Плотность D₂O-составляет 1,11 г/мл.

Приготовление комплексных солей полиамин-ДНК (ПА-ДНК)

ДНК и ПА предварительно отдельно растворялись в 0,01М водном растворе NaBr течение четырех дней при температуре 2-6 °С. Затем, растворы ДНК и ПА, содержащие равные количества отрицательных зарядов ДНК и положительных зарядов ПА, медленно перемешивались в течение трех дней при комнатной температуре. Комплекс ПА-ДНК выпадал в виде белого волокнистого осадка. Далее осадок многократно промывался большим количеством воды системы Milli-Q путем отделения осадка от надосадочной жидкости на центрифуге. Последним этапом приготовления комплексной соли была сушка при глубокой заморозке в течении 5 дней в аппарате Freeze dryer DW6-85.

Приготовление образцов

Необходимые количества ПА-ДНК, лецитина и воды загружались в стеклянные центрифужные пробирки, которые немедленно запаивались на кислородной горелке. Образцы подвергались центрифугированию в течение пяти дней при скорости вращения 4000 оборотов в минуту и температуре 25°С, причем через каждые 15 минут образцы переворачивались верхом вниз. Затем образцы выдерживались для достижения равновесия в течение 4 месяцев при температуре 25°С.

Методы

²H ЯМР (D₂O) спектроскопия. Эксперименты были выполнены при частоте 30.721

МГц на спектрометре Bruker DMX 200, оборудованным 200 МГц (4.7 Т) магнитом с широким сверхпроводящим магнитом. Термостатирование системы производилось при помощи воздушного потока температуры 25°С. ²H спектр ЯМР тяжелой воды обусловлен взаимодействием электрического квадрупольного момента дейтерия с градиентом электрического поля в ядре. ²H ЯМР - очень удобный инструмент для исследования липидных равновесных анизотропии ЖК фаз в водной среде. Существующая ориентацию молекул тяжелой воды, находящихся близко к поверхности раздела внутри ЖК структуры. При этой ориентации не происходит полного усреднения квадрупольного взаимодействия, что выражается в ЯМР спектре в виде наложения двух расщеплений, отличающихся шириной расщепления ровно вдвое. В случае ориентации воды в составе кубической фазы или отсутствия ориентации (изотропный раствор) спектр имеет один пик из-за усреднения сигнала от квадрупольного момента. Для системы, содержащей больше чем одну фазу, спектры представляют собой суперпозицию «чистых спектров», так как не возможно усреднение сигнала в виду медленной диффузии D₂O по шкале времени ЯМР.

Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей SAXS (Small Angle X-ray Scattering). Измерения SAXS были выполнены при помощи компактной системы малого угла “SAXSess”, оборудованной чувствительным датчиком (OED 50M производства М Брауна, Грац, Австрия). Генератор (Seifert) работающий от 50 кВ и 40 мА силовой установкой излучает радиоактивное излучение К α с длинной волны 1.542 Å. Устройство прибора так же предусматривает никелевый фильтр толщиной 10 μ м для удаления радиации К β , и 1.55-миллиметровый вольфрамовый фильтр который использовался для защиты датчика от прямого луча (Beam stop). Расстояние между образцом и датчиком составляло 277 мм. В камере поддерживался вакуум. Термостатирование системы при 25°С производилось при помощи системы Peltier.

Обсуждение результатов

Бинарные системы спермин-ДНК-вода и спермидин-ДНК-вода

Полностью гидратированный комплекс спермин-ДНК не растворим в воде и выпадает в виде волокнистого осадка белого цвета. Аналогично ведет себя комплекс спермидин-ДНК. Осадок представляет собой ЖК мезофазу гексагональной или холестеричной симметрии, в которой стержни двухспиральной ДНК упакованы в гексагональном порядке на расстоянии 29-33 Å между осями [13].

Бинарные системы спермин-ДНК-лецитин и спермидин-ДНК-лецитин

Взаимная растворимость комплекс полиамин-ДНК и лецитина при комнатной температуре очень мала.

Система Спермин-ДНК/лецитин/вода

На рисунке 3 представлена фазовая диаграмма 3-х компонентной системы Сп.-ДНК-лецитин-вода.

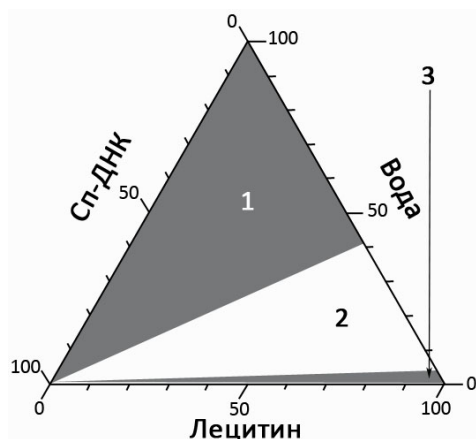


Рис. 3 - Фазовая диаграмма системы Сп-ДНК/лецитин/вода при температуре 25°C. 1- трехфазная область: вода, везикулы лецитин/вода, комплексная соль Сп-ДНК; 2 — двухфазная область: ламеллярная фаза лецитин/вода, комплексная соль Сп-ДНК; 3 — трехфазная область: кристаллический лецитин, ламеллярная фаза лецитин/вода, Сп-ДНК

Трехфазная область №1 представлена 35 образцами, на ^2H ЯМР спектрах которых доминирует узкий синглет высокой интенсивности (рис. 4а). При визуальном осмотре этих образцов было отмечено (рис. 7б): жидкая фаза, обладающая низкой вязкостью, мениск жидкости окаймлен гелеобразной белого цвета непрозрачной фазой, а на дне образцов была идентифицирована порошкообразная волокнистая твердофазная субстанция. При увеличе-

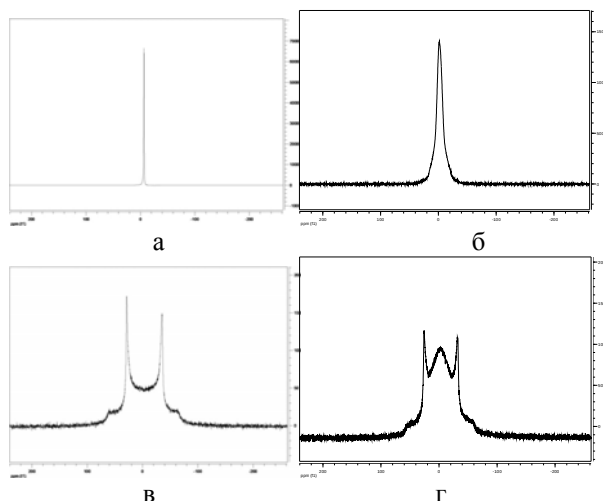


Рис. 4 - ^2H ЯМР спектры различных образцов трехкомпонентной системы Сп-ДНК/лецитин/вода: а - ^2H ЯМР спектр образца, содержащего преимущественно водный раствор липида, состав образца 10:10:80 из области №1; б, в и г — ЯМР спектры образцов из области №2 разного состава: б — 11:44:45 в — 4:77:19 г - 27:63:10

нии содержания лецитина до 30-40 вес. % на верхней кромке жидкой части образца отчетливо определяется гелеобразная непрозрачная субстанция слегка желтого цвета. Дифрактограммы образцов из области №1 содержат максимум два брэгговских пика с соотношением 1:2 (рис 5), что характерно для везикулярных структур. Известно, что лецитин в избыточном количестве воды часто образует везикулы. Для того что бы прояснить природу легкой фазы трехфазной области №1, образец состава 2:18:80 был сфотографирован при 100-кратном увеличении на поляризационном микроскопе. Микрофотография текстуры образца из области №1 (рис. 8а) подтверждает везикулярную природу ламеллярной фазы, аналогичную образуемой в двухкомпонентной системе лецитин-вода (рис. 8б). Проведенный анализ показывает присутствие в образцах трех фаз.

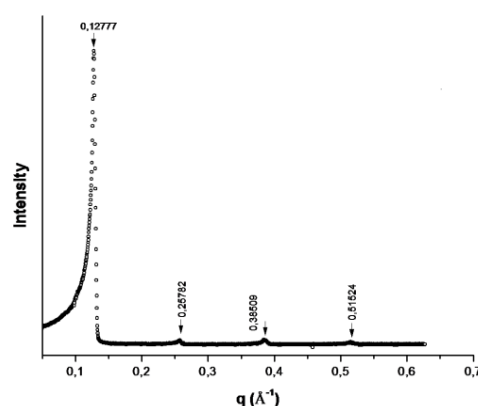


Рис. 5 - Дифрактограмма образца из области №2 фазовой диаграммы Сп-ДНК/лецитин/вода, состав 11:44:45

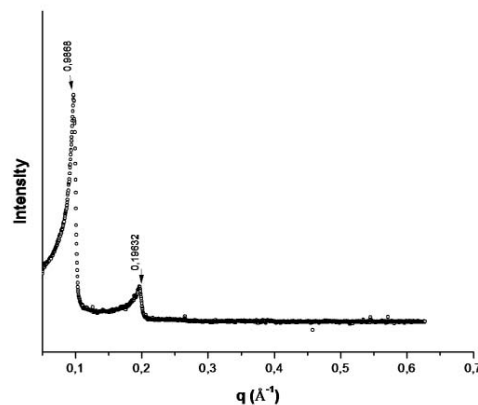


Рис. 6 - Дифрактограмма образца из области №1 фазовой диаграммы Сп-ДНК/лецитин/вода, состав 10:40:50

Двухфазная область №2 представлена 30 образцами, содержание воды в которых находится в пределах от 4 до 45 вес. %. При визуальном осмотре образцов обнаружено наличие белого порошкообразного вещества на дне и мутной желтого цвета гомогенной по всему объему гелеобразной фазы сверху (рис. 7а). По мере уменьшения содержания воды в образце верхняя желтая фаза становится более прозрачной. Верхняя фаза является

оптически анизотропной и имеет текстура (рис. 8в), очень характерную для ламеллярных фаз. ^1H ЯМР спектры образцов области №2 выглядят по-разному. Так при высоком содержании воды, спектр представляет собой широкий синглет с плечами у основания пика (рис. 4б). При небольшом содержании воды, спектр представляет собой двойной сплиттинг с соотношением ширин 1:2 (рис. 4в), либо сочетает в себе сплиттинг с синглетом (рис. 4г). По-видимому, область №2 является 2-х фазной. Верхняя фаза анизотропна, поэтому на спектрах ЯМР квадрупольное взаимодействие дает двойной сплиттинг с соотношением 1:2. Появление расширенного синглета и его усиление до полного подавления анизотропного сигнала (сплиттинга) при увеличении содержания воды может быть связано с переходом от обычной ламеллярной фазы к везикулярной ламеллярной фазе.

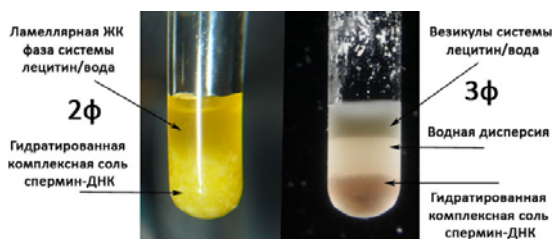


Рис. 7 - Фотографии образцов трехкомпонентной системы Сп.-ДНК/лецитин/вода: а - образец состава 11:44:45 из двухфазной области №2 при температуре 25°C; б - образец состава 10:10:80 из трехфазной области №1 при температуре 25°C

Для установления точной структуры гелеобразной желтой фазы в образцах из области №2 были проведены исследования с использованием метода малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS). Было исследовано три образца из разных точек области №2. На рисунке 6 представлена дифрактограмма образца состава 11:44:45. На дифрактограмме видно четыре Брэгговских пика с соотношением 1:2:3:4. Данное взаимное расположение пиков характерно для ламеллярной фазы. На основании спектральных данных можно рассчитать минимальную повторяющуюся дистанцию между слоями ламеллярной фазы, d , по уравнению:

$$d = \frac{2\lambda \times n}{q}; \quad (1)$$

где n – порядковый номер пика (1,2,3,4...) и q – значение вектора рассеяния соответствующее данному пику

Для образцов из области №2 величина d варьировалась от 41 до 53 Å. В случае если ДНК встраивается в структуру ламеллярной фазы, повторяющееся расстояние больше и составляет в среднем 62 Å [10]. В случае ламеллярной ЖК фазы, образованной лецитином в водной среде значения d изменяются как раз в тех же пределах в зависимости от объемной доли воды [16]. Следовательно, в изучаемой системе образуется ламеллярная ЖК фаза двойной системы лецитин/вода. Комплексная соль

Сп-ДНК не задействована в образовании этой фазы и в изученных образцах, по-видимому, целиком находится на дне образца. Это означает, что область №2 простирается от левого нижнего угла до отрезка ламеллярной ЖК фазы на правой стороне треугольника Гиббса.

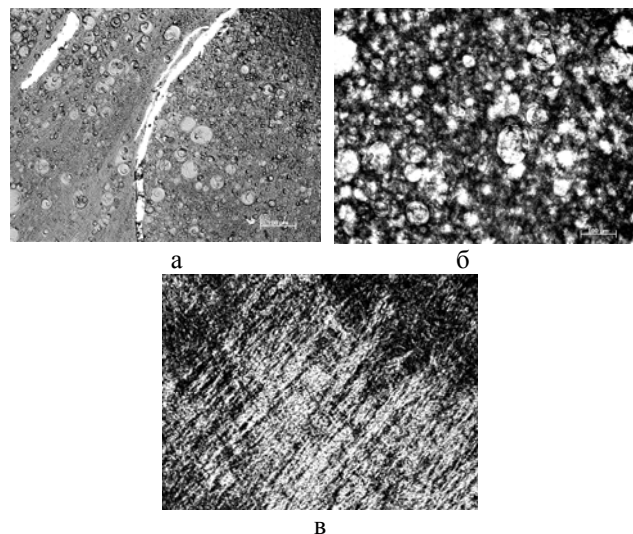


Рис. 8 – Микрофотографии текстур при 100-кратном увеличении: (а) образца состава 2:18:80 %: % вес. Сп-ДНК:лецитин:вода (область №1 на рис.2); (б) Мультиламеллярные везикулы образованные лецитином в двухкомпонентной системе лецитин-вода при 60 вес.% воды; (в) Система Сп-ДНК-лецитин-вода, 4:81:15 %: % вес. Текстура ламеллярной фазы лецитина Масштабная шкала в нижнем правом углу по длине равна 100 мкм

Область №3 оккупировала оставшуюся часть фазовой диаграммы (рис. 2) Область №3 сочетает в себе три фазы: кристаллический лецитин, ламеллярную фазу лецитина и чистый Сп-ДНК комплекс.

Система Спермидин(Спд.)-ДНК/лецитин/вода

Фазовая диаграмм тройной системы Спд.-ДНК/лецитин/вода при температуре 25°C абсолютно идентична фазовой диаграмме Сп-ДНК/лецитин/вода. Никаких отличий в фазовом поведении и структуре фаз двух систем нами обнаружено не было.

Таким образом, можно с уверенностью сказать, что ламеллярная фаза лецитина в воде не сольбилизирует нейтральные комплексы ДНК со спермином или спермидином. Другими словами, нейтрализация заряда ДНК и ее компактизация не являются достаточным условием для ее переноса через липидную мембрану. Очевидно, углеводородный радикал у амфифильного противоиона играет двойную роль: во-первых, как уже говорилось во введении, он ответственен за многозарядность противоиона (мицеллообразование), что обеспечивает прочную ассоциацию ДНК с противоионами (стабильность комплекса); во-вторых, встраиваясь в углеводородный слой липидного

бислоя, по-всей видимости он играет роль якоря, удерживающего противоион, а вместе с ним и ДНК внутри фосфолипидной мембраны.

Нужно сказать, что несмотря на то что нейтральный комплекс полиамин-ДНК практически не взаимодействует с лецитином, сильно положительно заряженные комплексы спермин-ДНК или спермидин-ДНК легко связываются с фосфолипидами [15]. В этом случае роль якоря играют уже электростатические взаимодействия между поляризованной липидной мембраной и противоположнозаряженным комплексом полиамин-ДНК.

Выводы

1) На основании данных ЯМР и SAXS установлены фазовые диаграммы Сп.-ДНК-лецитин-вода и Спд.-ДНК-лецитин-вода при 25 °С.

2) Нейтральный комплекс полиамин-ДНК не встраивается в ламеллярную фазу лецитина.

3) Углеводородный радикал у амфифильного противоиона играет двойную роль: во-первых, он ответственен за многозарядность противоиона (мицеллообразование), следовательно за компактизацию ДНК; во-вторых, встраиваясь в углеводородный слой липидного бислоя, он играет роль якоря, удерживающего противоион, а вместе с ним и ДНК внутри фосфолипидной мембраны.

При использовании полиаминов в векторах для переноса генного материала соотношение амногруппа(полиамин):фосфатная группа(ДНК) должно быть значительно выше единицы.

Литература

1. D. D. Lasic, H. Strey, M. C. A. Stuart, R. Podgornik and P. M. Frederik, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 832–833 (1997).
2. R. Koynova and B. Tenchov, *Soft Matter*, **5**, 3187–3200 (2009).
3. D. McLoughlin, R. Dias, B. Lindman, M. Cardenas, T. Nylander, K. Dawson, M. Miguel and D. Langevin, *Langmuir*, **21**, 1900–1907 (2005).
4. J. J. McManus, J. O. Rädler and K. A. Dawson, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 9869–9875 (2003).
5. J. J. McManus, J. O. Rädler and K. A. Dawson, *Langmuir*, **19**, 9630–9637 (2003).
6. K. K. Ewert, C. E. Samuel and C. R. Safinya, in *DNA Interactions with Polymers and Surfactants*, ed. R. Dias and B. Lindman, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, , **ch. 16**, pp. 377–404 (2008).
7. A. R. Thierry, V. Norris, F. Molina and M. Schmutz, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 385–394 (2009).
8. O. Farago and N. Grønbech-Jensen, *J. Am. Chem. Soc.*, , **131**, 2875–2881 (2009).
9. R. Dias and B. Lindman, *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey*, (2008).
10. A. Bilalov, U. Olsson, B. Lindmann, *Soft Matter*, **7**, 730–742 (2011).
11. A. Krivtsov, A. Bilalov, U. Olsson, B. Lindmann, *Langmuir*, **28**, 13698–13704 (2012).
12. B. Bergenstahl, K. Fontell, *Progr. Colloid Polym. Sci.* **68** 48 (1983).
13. E. Raspaud, D. Durand, F. Livolant, *Biophysical Journal*, **88**, 392–403 (2005).
14. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines // *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 749–790 (1984).
15. “Polyamine – Lipid Conjugates as Effective Gene Carriers: Chemical Structure, Morphology, and Gene Transfer Activity, Non-Viral Gene Therapy”, Takehisa Dewa, Tomohiro Asai, Naoto Oku and Mamoru Nango (2011), Prof. Xubo Yuan (Ed.), ISBN: 978-953-307-538-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/non-viral-gene-therapy/polyamine-lipid-conjugates-as-effective-gene-carriers-chemical-structure-morphology-and-gene-transfe>.
16. G. Montalvo and Ali Khan, *Langmuir*, **18**, 8330–8339 (2002).

© А. О. Кривцов - асп. каф. физической и коллоидной химии КНИТУ, alexey_krivtsov@mail.ru; А. В. Билалов – проф. той же кафедры, azus2004@bk.ru; Ульф Олссон – проф. каф. физической химии Университета города Лунд, Швеция, Ulf.Olsson@fkem1.lu.se; Бьёрн Линдманн – проф. каф. физической химии Университета города Лунд, Швеция, Bjorn.Lindman@fkem1.lu.se.