

Dace Avotiņa

LAIKA-FĀZES VARIĒJOŠA
MAGNĒTISKĀ LAUKA IETEKME
UZ NUKLEĪNSKĀBJU PIEGĀDES
EFEKTIVITĀTI VĒŽA ŠŪNĀS

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – teorētiskā medicīna

Rīga, 2016

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. biol. vadošais pētnieks **Mihails Bariševs**,
Rīgas Stradiņa universitātes A. Kirhenšteina
Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūts, Latvija

Dr. biol. vadošā pētniece **Svetlana Kozireva**,
Rīgas Stradiņa universitātes A. Kirhenšteina
Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūts, Latvija

Darba zinātniskā konsultante:

Dr. med. asociētā profesore **Modra Murovska**,
Rīgas Stradiņa universitātes A. Kirhenšteina
Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūts, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. habil. med. profesors **Jānis Vētra**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. habil. phys. profesors **Jurijs Dehtjars**,
Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija

Dr. biol. asociētā profesore **Elena Kashuba**,
Karolinskas institūts, Zviedrija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2016. gada 14. novembrī plkst. 16.00 Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:
www.rsu.lv



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Promocijas darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta
“Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei
Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med. docente **Anda Ķīvīte**

SATURS

IEVADS	6
Darba mērķis	10
Darba uzdevumi	11
Darba hipotēze	11
Promocijas darba zinātniskā novitāte	11
2. METODES.....	13
3. REZULTĀTI.....	15
3.1. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz SPION sedimentāciju	15
3.2. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz gēnu piegādi vēža šūnās.....	16
3.2.1. LM LFV – reakcijas optimālie apstākļi.....	16
3.2.2. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz nukleīnskābju piegādes efektivitāti šūnās.....	22
3.2.3. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka pielietojuma citotoksiskais efekts.....	29
3.3. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz SPION piegādes efektivitāti vēža šūnās.....	30
DISKUSIJA	33
SECINĀJUMI	42
PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU.....	44
IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	46

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

SAĪSINĀJUMS	SKAIDROJUMS ANĢĻU VALODĀ	SKAIDROJUMS LATVIEŠU VALODĀ
AO/EB	<i>Acridine</i> <i>Orange/Ethidium</i> <i>Bromide staining</i>	Atkrāsošana ar etīdija bromīda/akridīna oranža maisījumu
CM	<i>CombiMAG magnetic nanoparticles</i>	<i>CombiMAG</i> magnētiskās nanodaļiņas
Cos7	<i>African green monkey kidney fibroblast-like cell line</i>	Āfrikas zaļā pērtiķa nieru fibroblastu šūnu līnija
DNS	<i>deoxyribonucleic acid</i>	dezoksiribonukleīnskābe
E. Coli	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (zarnu nūjiņa)
ECFP-ERp29pDNS	<i>plasmid DNA containing ECFP-ERp29 gene</i>	ECFP-ERp29 gēnu saturošas plazmīdas DNS
Fe²⁺	<i>ferrum (II) ion</i>	dzelzs (II) jons
HeLa	<i>human cervix adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka dzemdes kakla adenokarcinomas šūnu līnija
HEPG2	<i>human hepatocellular adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka hepatocelulārās adenokarcinomas šūnu līnija
L	<i>lipofection</i>	lipofekcija
L siRNS	<i>co-lipofection with siRNA</i>	ko-lipofekcija ar siRNS
LacZpDNS	<i>plasmid DNA containing LacZ gene</i>	LacZ gēnu saturošas plazmīdas DNS
LIP	<i>Lipofectamine2000 transfection reagent</i>	<i>Lipofectamine2000</i> transfekcijas reaģents
LM	<i>liposomal magnetofection</i>	liposomālā magnetofekcija
LM LFV	<i>liposomal magnetofection in time-varied magnetic field</i>	liposomālā magnetofekcija laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā
LM LFV siRNS	<i>co-liposomal magnetofection in time-varied magnetic field with siRNA</i>	ko-liposomālā magnetofekcija laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā ar siRNS

LM siRNS	<i>co-liposomal magnetofection with siRNA</i>	ko-liposomālā magnetofekcija ar siRNS
NdFeB PB	<i>neodymium-iron-boron Prussian blue staining</i>	neodīms-dzelzs-bors prūšu zilā atkrāsošanas metode
PC3	<i>human prostate adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka prostatas karcinomas šūnu līnija
pDNS PEI siRNS	<i>plasmid DNA polyethylenimine small interference ribonucleic acid</i>	plazmīdas DNS polietilēnimīns mazā interferences ribonukleīnskābe
SPION	<i>superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i>	superparamagnētiskā dzelzs oksīda nanodaļiņa

IEVADS

Vēzis ir nekontrolēta šūnu augšana, kas rodas vairāku gēnu somatisku mutāciju un epigēnētisku izmaiņu rezultātā.

Gēnu terapija ir terapijas veids, kas balstīts uz viena vai vairāku gēnu, kas kodē normālus, funkcionālus proteīnus ievadīšanu pacienta šūnu ģenētiskajā materiālā ar mērķi aizstāt mutēto gēnu (-us) (*Mehier-Humbert and Guy, 2005; Dick et al., 2015*).

Mūsdienās zināmi vairāki simti dažādu gēnu (> 1% no cilvēka genoma), kuru mutācijas ir saistītas ar vēža veidošanos (*Futreal et al., 2004; Wishhart, 2015*), taču gēnu terapija lielā mērā ir eksperimentāla ārstēšanas metode un tikai nedaudzi gēnu terapijas līdzekļi tiek pielietoti klīnikā.

Gēnu piegāde ir viens no problemātiskākajiem posmiem gēnu terapijā, jo ietver ne tikai terapeitiskā gēna aizvadīšanu līdz šūnām, bet arī efektīvu piesaisti šūnas membrānai ar sekojošu internalizāciju un migrāciju šūnas iekšējā vidē līdz kodolam. Turklāt šo procesu apgrūtina pašu terapeitisko līdzekļu – nukleīnskābju īpašības – sliktā difundētspēja caur šūnas membrānu to izmēru, negatīvā lādiņa un hidrofilītātes dēļ (*Jafari et al., 2012*). Gēnu piegādes iznākums ir tieši atkarīgs no izvēlētās vektorsistēmas – tai ir jābūt efektīvai, specifiskai un drošai, bet ideālu gēnu piegādes vektoru raksturo virkne īpašību (*Somia and Verma, 2000; Ibraheem et al., 2014*):

- efektīvā veidā piesaistās terapeitiskajam gēnam neatkarīgi no tā lieluma un formas;
- aizsargā terapeitisko gēnu no seruma, ekstracelulāro un intracelulāro endonukleāžu degradējošās iedarbības;
- nodrošina terapeitisko gēnu piegādi noteiktās dalošās un nedalošās mērķšūnās neatkarīgi no to lokalizācijas vietas un integrētības apkārtējos audos;

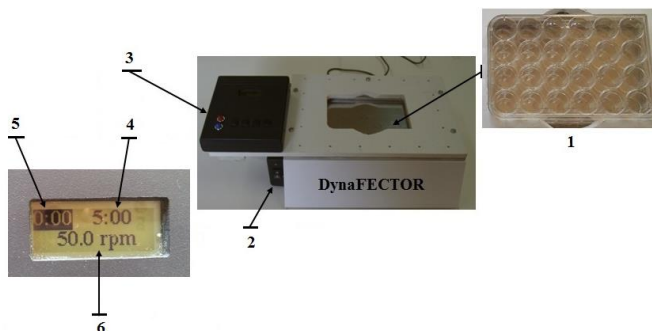
- ir neimunogēna;
- ir netoksiska.

Gēnu piegāde šūnās, izmantojot vīrusu vektorsistēmas, ir visbiežāk pielietotais gēnu piegādes veids. Vīrusiem piemētošās dabiskās īpašības – spēja viegli pārvarēt šūnas membrānas barjeru, stimulējot endocitozes procesus, un ekspresēt vīrusa gēnus, izmantojot saimniekšūnas biosintēzes mehānismu, padara tos par efektīviem gēnu piegādes līdzekļiem (*Mulligan, 1993*). Neskatoties uz to, tiem piemīt vairāki būtiski trūkumi – vīrusa proteīnu imunogenitāte, kas var izraisīt spēcīgu organisma imūno atbildi un augsta citotoksicitāte pie lielām vīrusa devām (*Teramoto et al., 2000; Anson, 2004*). Pastāv arī zināms inserciju mutāģenēzes risks, kas var novest pie onkogēnu aktivācijas, kā arī nejausa infekciozu vīrusa daļiņu veidošanās (*Lachmann and Davies, 1997; Thrasher et al., 2006; Bushman, 2007*). Bezvīrusu – ķīmiskajiem un fizikālajiem vektoriem ir vairākas priekšrocības, salīdzinot ar vīrusu vektoriem. Tie ir viegli sintezējami un ekspluatējami, spēj pārnest neierobežota garuma un daudzuma kodējošās sekvenču un tiem ir zema imunogenitāte (*Ruf and Wagner, 2007*). Liela daļa ķīmisko vektoru ir katjoniski savienojumi. Tādējādi tie spēj efektīvi piesaistīties gan negatīvi lādētajiem fosfātiem, kas ir nukleīnskābju ķēdes skeleta pamatā, veidojot stabilu kompleksu, gan arī negatīvi lādētajai šūnas membrānai. Piemēram, katjoniski lipīdi veido sfēriskas, hidrofobas struktūras – liposomas, kur terapeitiskais gēns ir iekapsulēts lipīdu dubultslānī (*Fraley et al., 1980*). Liposomu formēšanās procesā lipīda pozitīvi lādētā hidrofilā daļa piesaistās nukleīnskābes ķēdes skeleta garumā, bet hidrofobās daļas, savstarpēji mijiedarbojoties, aizkavē hidrofilās daļas atdalīšanos un vienlaicīgi kalpo kā pārklājums, nodrošinot nukleīnskābes aizsardzību (*Kennedy et al., 2000; Oberle et al., 2000*). Šis mehānisms padara liposomu mediētu gēnu piegādi jeb lipofekciju par vienu no efektīvākajām un visplašāk pielietotajām metodēm visu veidu nukleīnskābju transficēšanai

dažādās šūnu līnijās. Ķīmisko gēnu piegādes vektoru galvenais trūkums ir augstā citotoksicitāte (*Moghimi et al., 2005; Hunter; Lv et al., 2006*), tie ir ļoti jutīgi pat pret nelielām izmaiņām vides pH, tūrā un sāļu koncentrācijā, tāpēc ir problemātisks to pielietojums *in vivo* pētījumos. Fizikālas gēnu piegādes galvenā priekšrocība ir spēja pārvarēt vairākas ekstracelulārās un intracelulārās barjeras, apejot vienu vai vairākus pasīvās gēnu piegādes posmus (*Brunner et al., 2002*). Tādējādi tiek nodrošināta tieša piekļuve šūnas citoplazmai vai pat kodolam, kas nozīmē, ka teorētiski šūnās iespējams piegādāt jebkuru membrānu necaurlaidīgu molekulu, un šāda pieeja vienlaicīgi paaugstina gan gēnu piegādes ātrumu, gan arī efektivitāti. Magnetofekcija ir viena no efektīvākajām fizikālajām gēnu piegādes metodēm. Tās pamatā ir ar superparamagnētiskajām nanodaļiņām (SPION) saistītu nukleīnskābju paātrināta koncentrēšana uz šūnu virsmas un piegāde šūnās, izmantojot spēcīgu ārējo magnētisko lauku. Salīdzinot ar citām fizikālajām gēnu piegādes metodēm, magnetofekcijai ir vairākas priekšrocības. Tās gadījumā tiek izmantoti dabiski piesaistes un internalizācijas mehānismi, tādējādi netiek bojāta šūnas membrāna un rezultātā būtiski samazinās metodes citotoksicitāte (*Laurent et al., 2011; Sapet et al., 2011*). Magnētiskā lauka iedarbība audos sniedzas 10–15 cm dziļumā, līdz ar to magnētiskās nanodaļiņas vienmērīgi akumulējas ne tikai virsējos, bet arī dziļākajos audu slāņos (*Goudy et al., 2008*). Magnetofekcijas efektivitāte ir atkarīga gan no SPION fizikāli ķīmiskajām īpašībām, gan arī magnētiskā lauka parametriem – magnētiskās intensitātes un magnētiskā lauka gradienta.

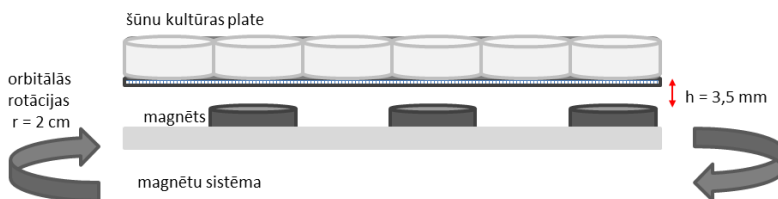
Permanenti magnēti rada savu patstāvīgu statisku magnētisko lauku, kur magnētiskā lauka gradienta virziens ir vertikāls pa Z asi (*Hofmann-Antenbrink et al., 2009*). Tādējādi statiskā magnētiskā laukā SPION kustība šķīdumā virzienā pret magnētu ir aksiāla. Vairākās publikācijās aprakstīts alternatīvu magnētisko lauku pielietojums, kas ietver kompleksu magnētiskā spēka iedarbību uz SPION pa X-Y-Z asi. Šādu magnētisko lauku ietekmes rezultātā tiek izmainīta SPION kustība šķīdumā – tā ir ne tikai aksiāla, bet var būt arī

laterāla, oscilējoša un rotējoša. Pastāv uzskats, ka izmainītas SPION kustības rezultātā tiek stimulēta to pārnese caur šūnas membrānu, taču precīzs šīs parādības mehānisms līdz galam nav noskaidrots. Laika-fāzes variējošs magnētiskais lauks tiek ģenerēts ar magnetofekcijas iekārtas *DynaFECTOR* (1. att.) palīdzību.



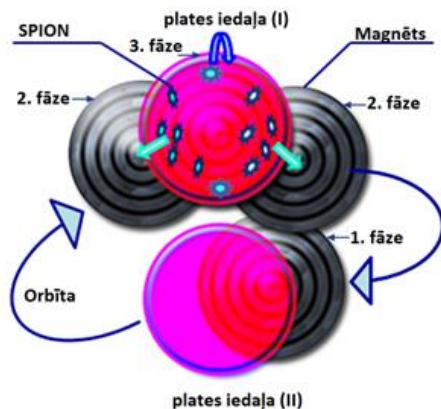
1. attēls. Magnetofekcijas iekārta *DynaFECTOR*: 1 – 24 iedaļu plates vieta, 2 – strāvas padeves slēdzis, 3 – vadības panelis, 4 – ekspozīcijas ilgums laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, 5 – ekspozīcijas ilgums statiskajā magnētiskajā laukā, 6 – magnētu apgriezību frekvence

Laika-fāzes magnētiskā lauka pamatā ir permanentu magnētu plates orbitāla rotācija šūnu kultūras platei paralēlā plaknē (2. att.).



2. attēls. Magnētu sistēmas rotācijas plakne attiecībā pret 24 iedaļu šūnu kultūru plates plakni.

Rotējošā magnētu sistēmā specifisku magnētisko spēku iedarbību uz SPION raksturo magnētu pozīcijas orbītā, respektīvi, 1., 2., 3. fāze (3. att.).



3. attēls. Rotējošas magnētiskās sistēmas princips – shematiska magnētu sistēmas ilustrācija vienam magnētam un divām šūnu kultūru plates iedaļām; 1., 2., 3. fāze – magnētu pozīcijas zem iedaļām orbitālās rotācijas procesā (Adaptēts no *Karpov et al.*, 2014)

Pirmās fāzes gadījumā magnēts neatrodas zem iedaļas un šajā gadījumā magnētiskā spēka iedarbība ir līdzvērtīga nullei. Otrajā fāzē notiek SPION laterāla kustība, jo dominanta kļūst radiālā komponente, bet trešajā fāzē SPION kustība notiek aksiālā virzienā, jo magnēts atrodas tieši zem iedaļas.

Datormodelēšanas rezultātā tika noskaidrots, ka aksiāli laterālas kustības rezultātā sedimentācijas procesā SPION izvietojas gan magnēta centrālajā daļā, gan pie ārējās robežas, kas veicina to vienmērīgāku sedimentāciju arī uz virsmas. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz SPION-nukleīnskābju kompleksu piegādes efektivitāti šūnās nav noskaidrota.

Darba mērķis

Izpētīt laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmi uz nukleīnskābju piegādes efektivitāti vēža šūnās.

Darba uzdevumi

1. Salīdzināt superparamagnētisku dzelzs oksīda nanodaļiņu sedimentāciju šķīdumā statiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, izmantojot iekārtu *DynaFECTOR*.

2. Veikt eksperimentālu reakcijas apstākļu optimizāciju statiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, izmantojot iekārtu *DynaFECTOR*, lai sasniegtu maksimālu nukleīnskābju piegādes efektivitāti vēža šūnās.

3. Salīdzināt nukleīnskābju piegādes efektivitāti vēža šūnās starp dažādām gēnu piegādes metodēm.

4. Salīdzināt dažādu gēnu piegādes metožu pielietošanas citotoksisko efektu vēža šūnās.

5. Salīdzināt superparamagnētisku dzelzs oksīda nanodaļiņu internalizācijas efektivitāti statiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, izmantojot iekārtu *DynaFECTOR*.

Darba hipotēze

Laika-fāzes magnētiskā lauka ietekmē notiek superparamagnētisku dzelzs oksīda nanodaļiņu pārvietošanās aksiāli laterālā virzienā, kas stimulē to iekļūšanu šūnās, tā paaugstinot arī ar to saistīto nukleīnskābju piegādes efektivitāti.

Promocijas darba zinātniskā novitāte

Šajā pētījumā eksperimentāli tiks novērtēta laika-fāzes magnētiskā lauka ietekme uz nukleīnskābju piegādes efektivitāti vēža šūnās *in vitro* un līdz ar to raksturota uzlabota gēnu piegādes metode – liposomālā magnetofekcija laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā. Metode varētu tikt pielietota efektīvākai

gēnu piegādei dažādu veidu monoslāņa šūnu līnijās un perspektīvā arī terapeitisko gēnu pārnēsē vēža šūnās *in vivo*.

2. METODES

Pētījumā tika pielietota kompleksa metodoloģiskā pieeja. Metodes un to izmantošanas kārtība apkopota zemāk.

CM sedimentācijas profila noteikšana:

- CM sedimentācija šūnu kultūru barotnē statistiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā;
- mikroskopēšana ar fotoattēlu iegūšanu.

LacZ un ECFP-ERp29 pDNS iegūšana:

- pDNS transformēšana *E. Coli* un transformēto baktēriju kultivēšana;
- pDNS izdalīšana no *E. Coli* kultūras, izmantojot *Plasmid Midi Kit*;
- izdalītās pDNS koncentrācijas noteikšana.

Optimizācija

Optimālās pDNS:LIP un pDNS:LIP:CM **attiecības noteikšana**:

- PC3 un HEPG2 šūnu transfekcija statistiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, izmantojot dažādu LacZpDNS:LIP un LacZpDNS:LIP:CM daudzumu/savstarpējo attiecību;
- transficēto šūnu krāsošana, izmantojot *β -Gal Staining Kit*;
- mikroskopēšana ar fotoattēlu iegūšanu;
- transfekcijas efektivitātes/citotoksiskā efekta novērtēšana.

Optimālā **ekspozīcijas ilguma** noteikšana:

- PC3 un HEPG2 šūnu transfekcija ar 2,5; 5; 10; 20 min ekspozīciju statistiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, izmantojot optimālu LacZpDNS:LIP:CM;
- transficēto šūnu krāsošana, izmantojot *β -Gal Staining Kit*;
- mikroskopēšana ar fotoattēlu iegūšanu;
- šūnu skaitīšana *ImageJ* programmā, transfekcijas efektivitātes aprēķini.

Optimālās **magnētu apgriezīgu frekvences** noteikšana:

- PC3 un HEPG2 šūnu transfekcija laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā ar 5; 25; 50; 100 apgr./min frekvenci, izmantojot optimālu LacZpDNS:LIP:CM;
- transficēto šūnu krāsošana, izmantojot *β -Gal Staining Kit*;
- mikroskopēšana ar fotoattēlu iegūšanu;
- šūnu skaitīšana *ImageJ* programmā, transfekcijas efektivitātes aprēķini.

Optimālās **magnētiskā lauka intensitātes** noteikšana:

- PC3 šūnu transfekcija statistiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā ar optimālu magnetofekcijas ilgumu un magnētu apgriezīgu frekvenci, izmantojot optimālu LacZpDNS:LIP:CM;

- transficēto šūnu krāsošana, izmantojot *β-Gal Staining Kit*;
- mikroskopēšana ar fotoattēlu iegūšanu;
- šūnu skaitīšana *ImageJ* programmā, transfekcijas efektivitātes aprēķini.

Dažādu transfekcijas metožu efektivitātes noteikšana

LacZpDNS:LIP:CM piegādes efektivitātes noteikšana:

- PC3 un HEPG2 šūnu transfekcija ar **L**, **LM** un **LM LFV** metodēm;
- transficēto šūnu krāsošana, izmantojot *β-Gal Staining Kit*;
- mikroskopēšana ar fotoattēlu iegūšanu;
- šūnu skaitīšana *ImageJ* programmā, transfekcijas efektivitātes aprēķini.

ECFP-ERp29pDNS:LIP:CM piegādes efektivitātes noteikšana:

- PC3 un HEPG2 šūnu transfekcija ar **L**, **LM** un **LM LFV** metodēm;
- transficēto šūnu analīze ar *Western* blota metodi;
- densitometrijas analīze programmā *Image Reader LAS-1000*.

LacZpDNS:LIP:CM:siRNS piegādes efektivitātes noteikšana:

- PC3 šūnu transfekcija ar **L/L siRNS**, **LM/LM siRNS** un **LM LFV/LM LFV siRNS** metodēm;
- transficēto šūnu krāsošana, izmantojot *β-Gal Staining Kit*;
- mikroskopēšana ar fotoattēlu iegūšanu;
- šūnu skaitīšana *ImageJ* programmā, transfekcijas efektivitātes aprēķini.

Citotoksiskā efekta noteikšana

LacZpDNS:LIP:CM piegādes izraisītās citotoksicitātes noteikšana:

- PC3 šūnu transfekcija ar **L**, **LM** un **LM LFV** metodēm;
- transficēto šūnu krāsošana, izmantojot AO/EB metodi;
- mikroskopēšana ar fotoattēlu iegūšanu;
- šūnu skaitīšana *ImageJ* programmā, nedzīvo šūnu īpatsvara aprēķini.

Dzelzs satura noteikšana šūnās

Internalizētās Fe²⁺ noteikšana pēc **šūnu skaita**:

- PC3 šūnu magnētiskā iezīmēšana ar CM statistiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā;
- iezīmēto šūnu krāsošana, izmantojot PB metodi;
- mikroskopēšana ar fotoattēlu iegūšanu;
- šūnu skaitīšana *ImageJ* programmā.

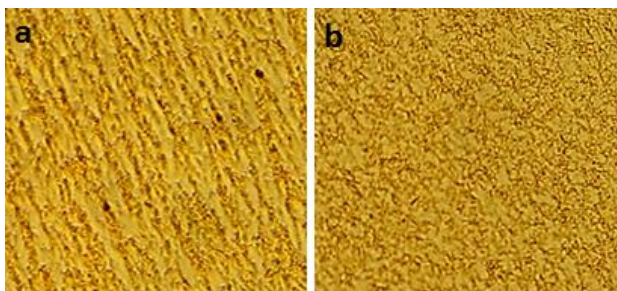
Internalizētās Fe²⁺ noteikšana pēc **daudzuma/šūnā**:

- PC3 šūnu magnētiskā iezīmēšana ar CM statistiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā;
- iezīmēto šūnu spektrofotometriska analīze;
- dzelzs daudzuma aprēķini.

3. REZULTĀTI

3.1. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz SPION sedimentāciju

Datormodelēšanas rezultāti parādīja, ka rotējošas magnētu sistēmas ģenerēta magnētiskā lauka ietekmē notiek SPION kustība kā aksiālā tā laterālā virzienā, tā veicinot SPION vienmērīgāku izkliedi un veidojot raksturīgu sedimentēto SPION ainu uz virsmas. Lai eksperimentāli pārlicinātos vai pastāv atšķirības SPION sedimentācijā statistiskajā magnētiskajā laukā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, tika veikta CM sedimentācija uz šūnu kultūras plates iedaļas virsmas reālajiem transfekcijas apstākļiem raksturīgā vidē, respektīvi, *Opti-MEM* šūnu kultūru barotnē. Iegūtie rezultāti parāda krāsas atšķirības SPION sedimentācijas profilā statistiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (3.1. att.).



3.1. attēls. SPION sedimentācijas profila salīdzinošā analīze; SPION dispersijas raksturīgā aina statistiskajā magnētiskajā laukā (a) un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (b), $\times 400$

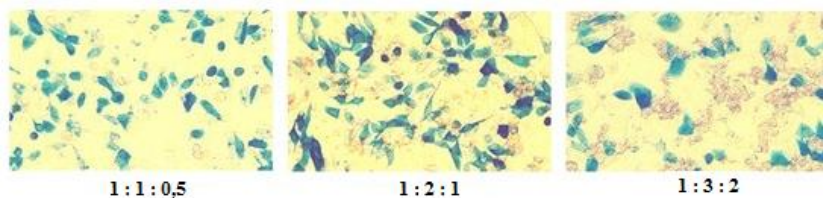
Gadījumā, kad sedimentācija tika veikta statistiskajā magnētiskajā laukā, SPION veidoja izteiktu svītrveida rakstu (3.1. att. (a)). Laika-fāzes variējošā

magnētiskajā laukā SPION izvietojās vienmērīgāk (3.1. att. (b)), izteiktas formas struktūru veidošanās netika novērota. Iegūtie rezultāti apstiprina pieņēmumu, ka aksiāli laterāla SPION kustība šķīdumā, ko izraisa laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka iedarbība, noved pie vienmērīgāka SPION izvietojuma uz šūnu kultūras plātes iedaļas virsmas.

3.2. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz gēnu piegādi vēža šūnās

3.2.1. LM LFV – reakcijas optimālie apstākļi

Optimizācijas rezultātā tika konstatēts, ka visaugstākos transfekcijas efektivitātes rādītājus ar minimālu citotoksisku efektu iespējams iegūt pie LacZpDNS:LIP:CM savstarpējās attiecības 1:2:1 (3.2. att.). Liposomālā magnetofekcija ar LacZpDNS:LIP:CM savstarpējo attiecību 1:1:0,5; 1:2:0,5; 1:1:1; 1:1:2 noved pie zemākas efektivitātes. Savukārt pie LacZpDNS:LIP:CM attiecības 1:3:0,5; 1:3:1; 1:2:2; 1:3:2 tika konstatēts spēcīgs citotoksiskais efekts (liels daudzums bojātu šūnu).



3.2. attēls. Transfekcijas efektivitātes izmaiņas un citotoksiskais efekts atkarībā no LacZpDNS:LIP:CM savstarpējās attiecības (pēc β -galaktozidāzes ekspresijas PC3 šūnās laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā), $\times 200$

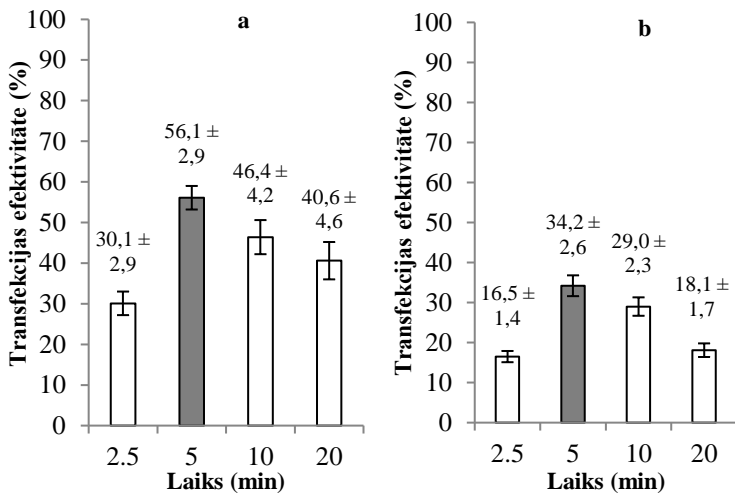
Visvairāk β -galaktozidāzi ekspresējošu šūnu vienlaicīgi nenovērojot citotoksisku efektu statistiskajā magnētiskajā laukā gan PC3, gan HEPG2 šūnās iespējams iegūt pie LacZpDNS:LIP:CM savstarpējās attiecības 1:2:1. Tāda pati LacZpDNS:LIP:CM savstarpējā attiecība, attiecīgi 1:2:1 ļauj sasniegt maksimālo β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaitu, vienlaicīgi nenovērojot citotoksisku efektu, arī laika-fāzes variējošā laukā gan PC3, gan HEPG2 šūnās.

Visvairāk β -galaktozidāzi ekspresējošu šūnu, vienlaicīgi nenovērojot citotoksisku efektu, gan PC3, gan HEPG2 šūnās iespējams iegūt pie LacZpDNS:LIP savstarpējās attiecības 1:2.

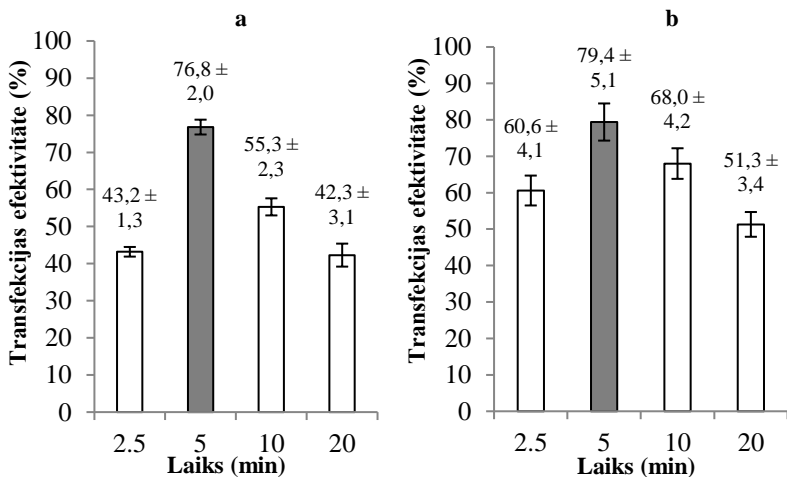
Maksimālais siRNS inhibējošais efekts pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita tika sasniegts izmantojot 50 nM siRNS pret β -galaktozidāzi.

Iegūtie dati tālāk tika izmantoti, lai noteiktu optimālos magnētiskā lauka parametrus – ekspozīcijas ilgumu, magnētu apgriezīenu frekvenci un magnētiskā lauka intensitāti.

Visvairāk β -galaktozidāzi ekspresējošo PC3 un HEPG2 šūnu tika konstatēts pie 5 min ekspozīcijas statistiskajā magnētiskajā laukā (3.3. att.). Palielinot ekspozīcijas ilgumu magnētiskajā laukā, β -galaktozidāzi ekspresējošo PC3 un HEPG2 šūnu skaits samazinājās, lai gan 5 min un 10 min ekspozīcijas rezultāti ir līdzvērtīgi, īpaši HEPG2 šūnās (3.3. att. (b)). Optimālais ekspozīcijas ilgums statistiskajā magnētiskajā laukā – 5 min tika izmantots turpmākajos eksperimentos.



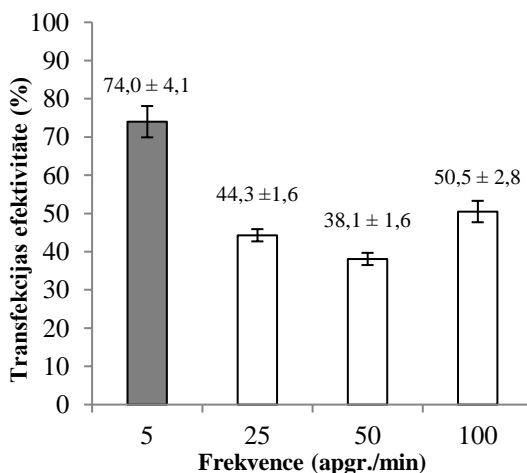
3.3. attēls. Transfekcijas efektivitāte PC3 šūnās (a) un HEPG2 šūnās (b) pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita ar variablu ekspozīcijas ilgumu statistiskajā magnētiskajā laukā (n = 3)



3.4. attēls. Transfekcijas efektivitāte PC3 šūnās (a) un HEPG2 šūnās (b) pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita ar variablu ekspozīcijas ilgumu laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (n = 3)

Analogs rezultāts tika iegūts nosakot optimālo ekspozīcijas ilgumu laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā. Visvairāk β -galaktozidāzi ekspresējošo PC3 un HEPG2 šūnu tika konstatēts pie 5 min ekspozīcijas magnētiskajā laukā (3.4. att.). Līdzīgi kā statiskā magnētiskā lauka gadījumā, palielinot ekspozīcijas ilgumu > 5 min, tika novērota stabila transfekcijas efektivitātes samazināšanās gan PC3, gan HEPG2 šūnās.

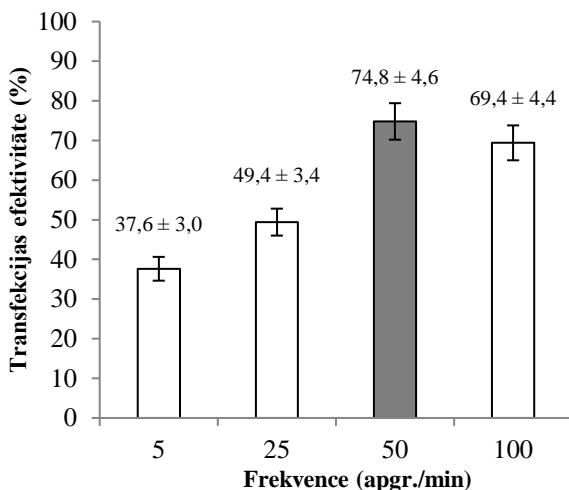
Turpmākajos eksperimentos tika pārbaudīta laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka raksturojošo parametru – magnētu apgriezīnu frekvences un magnētiskā lauka gradienta ietekme uz LacZ gēna ekspresiju.



3.5. attēls. Transfekcijas efektivitāte PC3 šūnās pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita ar variablu magnētu apgriezīnu frekvenci pie 5 min ekspozīcijas laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (n = 3)

Analizējot transfekcijas efektivitāti pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita PC3 šūnās, pie dažādām rotējošas magnētu sistēmas magnētu apgriezīnu frekvencēm, tika konstatēts, ka visefektīvākā iedarbība ir 5 min ekspozīcijai laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā ar 5 apgr./min frekvenci (3.5. att.). Palielinot magnētu apgriezīnu frekvenci (25 un 50 apgr./min),

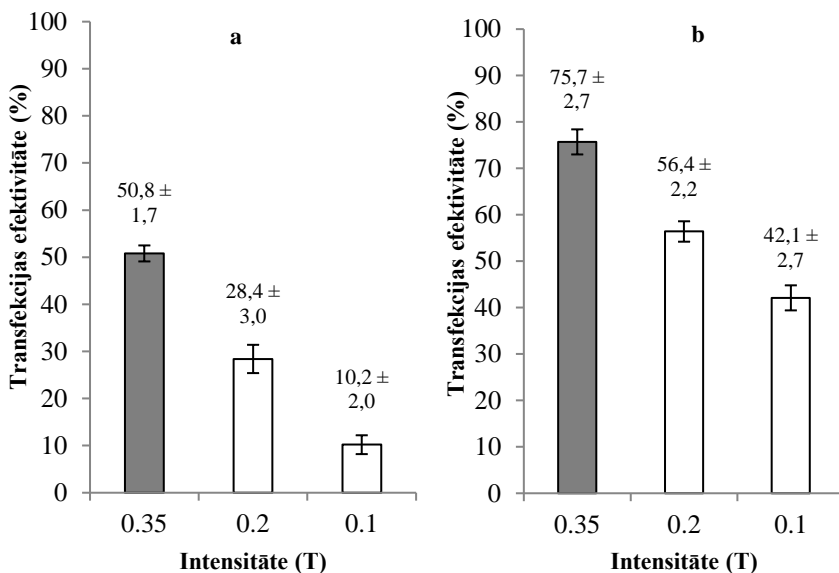
vērojams straujš transfekcijas efektivitātes kritums, bet pie 100 apgr./min transfekcijas efektivitāte atkal paaugstinās.



3.6. attēls. **Transfekcijas efektivitāte HEPG2 šūnās pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita ar variablu magnētu apgriezību frekvenci pie 5 min ekspozīcijas laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (n = 3)**

HEPG2 šūnās augstākie LacZ piegādes efektivitātes rādītāji pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita tika novēroti pie 50 apgr./min magnētu apgriezību frekvences ar 5 min ekspozīciju magnētiskajā laukā (3.6. att.). Taču augsta transfekcijas efektivitāte saglabājas arī pie magnētu apgriezību frekvences 100 apgr./min.

Analizējot transfekcijas efektivitātes izmaiņas atkarībā no magnētiskā lauka intensitātes, visaugstākā LacZ ekspresija PC3 šūnās gan statiskajā, gan laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā tika novērota pie maksimālās pielietotās magnētiskā lauka intensitātes 0,35 T (3.7. att.).



3.7. attēls. Transfekcijas efektivitāte PC3 šūnās pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita ar optimālu laika-fāzes variējošā magnētiskā lauka ekspozīcijas ilgumu/frekvenci un variablu magnētiskā lauka intensitāti statistiskajā magnētiskajā laukā (a) un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (b) (n = 3)

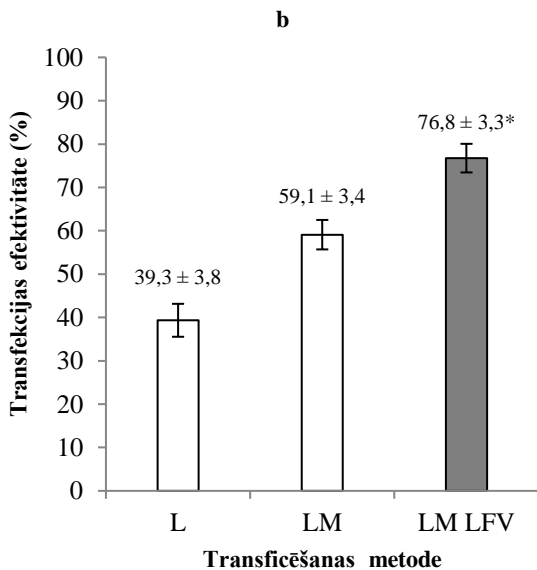
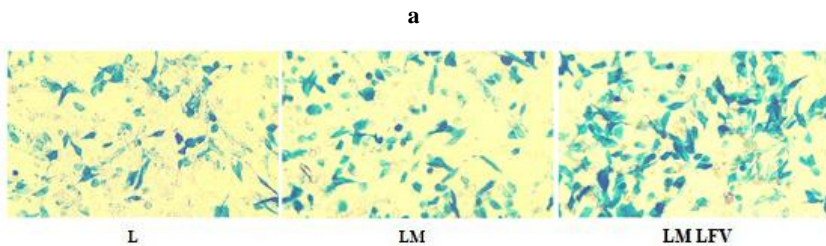
Samazinot magnētiskā lauka intensitāti, abos gadījumos tika novērots stabils transfekcijas efektivitātes kritums, taču redzams, ka statistiskajā magnētiskajā laukā transfekcijas efektivitātes samazinājums ir straujāks (3.7. att. (a)) nekā laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (3.7. att. (b)).

Iegūtie optimālos reakcijas apstākļus atspoguļojošie rādītāji pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita tika izmantoti, lai novērtētu laika-fāzes variējošā magnētiskā lauka ietekmi uz LacZ un ECFP-ERp29 ekspresiju PC3 un HEPG2 šūnās salīdzinājumā ar divām plaši pielietotām konvencionālajām gēnu piegādes metodēm – liposomālo magnetofekciju un lipofekciju.

3.2.2. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz nukleīnskābju piegādes efektivitāti šūnās

Rezultāti, kas iegūti pēc PC3 šūnu transfekcijas ar LacZ saturoša gēna pDNS, izmantojot dažādas gēnu piegādes metodes – lipofekciju, kad šūnas nav pakļautas magnētiskā lauka iedarbībai, liposomālo magnetofekciju statistiskajā magnētiskajā laukā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā optimālos reakcijas apstākļos, attēloti 3.8. attēlā.

Tika konstatēts, ka LM LFV ietekmē būtiski paaugstinās LacZ gēna ekspresija PC3 šūnās ($p < 0,001$) salīdzinājumā ar abām pārējām metodēm – L un LM. Pielietojot LM LFV, iespējams sasniegt visaugstāko transfekcijas efektivitāti pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita – 79,6% transfcēto šūnu, kas ir par 21% vairāk, salīdzinot ar LM un par 42% vairāk, salīdzinot ar L. Turklāt tika novērots, ka ar LM LFV metodi transfcētājās, atkrāsotajās PC3 šūnās raksturīgā krāsojuma intensitāte ir augstāka, salīdzinot gan ar LM, gan L (3.8. att. (a)). Tas netieši norāda, ka pielietojot LM LFV, ne tikai paaugstinās β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaits, bet arī pieaug β -galaktozidāzes ekspresijas līmenis transfcētājās šūnās.

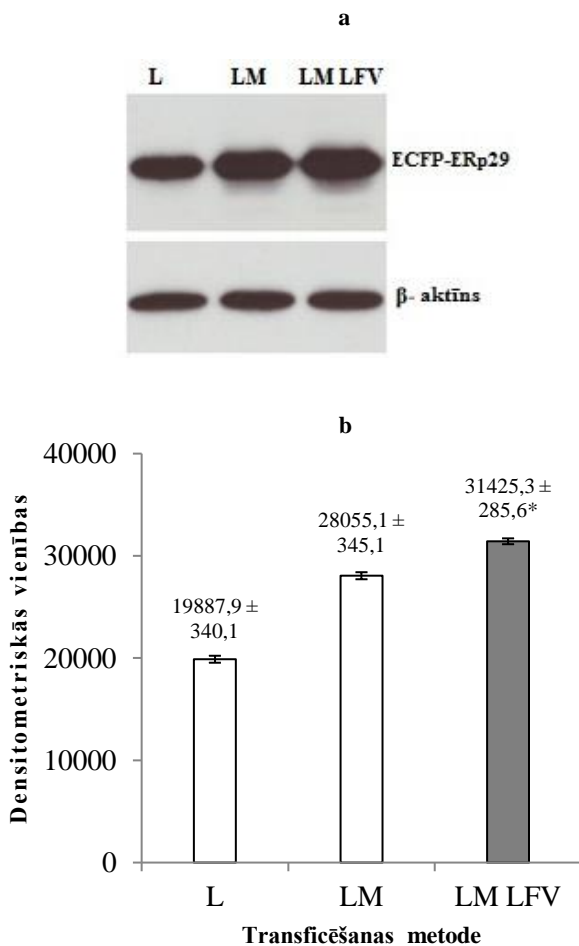


3.8. attēls. LacZ gēna piegāde PC3 šūnās izmantojot trīs dažādas gēnu piegādes metodes: (a) β-galaktosidāzes ekspresija PC3 šūnās (× 200), (b) transfēcēšanas efektivitāte pēc β-galaktosidāzi ekspresējošo šūnu skaita (n = 9; * p < 0,05, salīdzinot ar L un LM, Tukey tests)

Līdzīgi rezultāti tika iegūti nosakot laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmi uz ECFP-ERp29pDNS piegādi PC3 šūnās (3.9. att.).

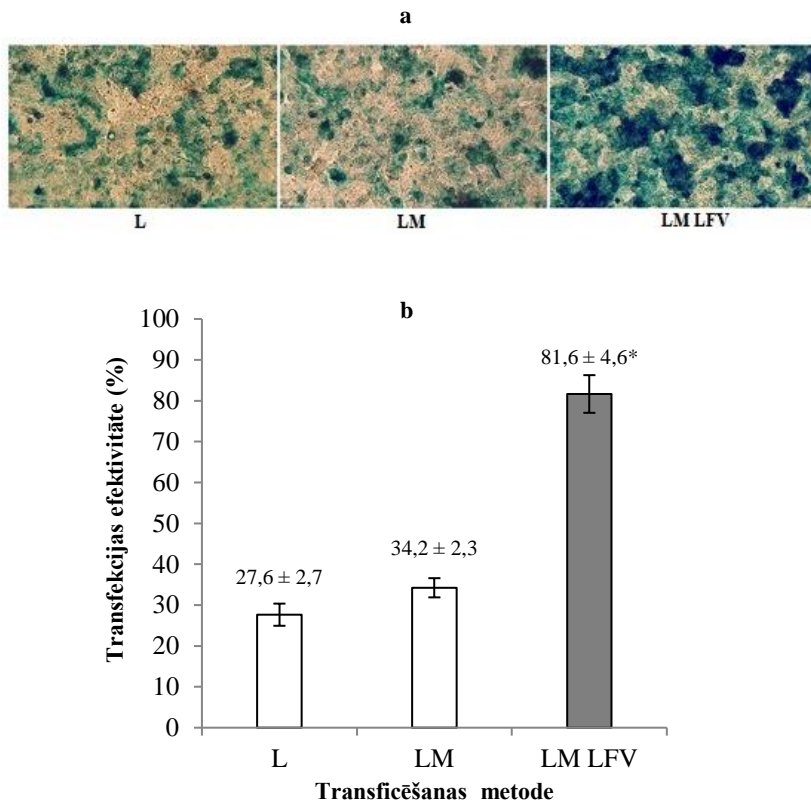
Analizējot proteīnu daudzumu (densitometriskajās vienībās), kas atspoguļo proteīnu ekspresijas līmeni, tika konstatēts, ka LM LFV pielietojums būtiski paaugstina arī ECFP-ERp29 piegādes efektivitāti PC3 šūnās (p < 0,001) salīdzinājumā ar abām pārējām gēnu piegādes metodēm – L un LM. LM LFV

gadījumā kopējais ECFP-ERp29 ekspresijas līmenis ir par 6% augstāks, salīdzinot ar LM un par 22% augstāks, salīdzinot ar L.



3.9. attēls. ECFP-ERp29 gēna piegāde PC3 šūnās izmantojot trīs dažādas gēnu piegādes metodes: (a) ECFP-ERp29 ekspresija PC3 šūnās (*Western blota* analīze), (b) transfekcijas efektivitāte pēc ECFP-ERp29 ekspresijas līmeņa (n = 9; * p < 0,05, salīdzinot ar L un LM, *Tukey tests*)

Rezultāti, kas iegūti transficējot HEPG2 šūnas ar LacZ saturoša gēna pDNS, izmantojot dažādas gēnu piegādes metodes – lipofekciju, kad šūnas nav pakļautas magnētiskā lauka iedarbībai, liposomālo magnetofekciju statistiskajā magnētiskajā laukā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā optimālos apstākļos, attēloti 3.10. attēlā.

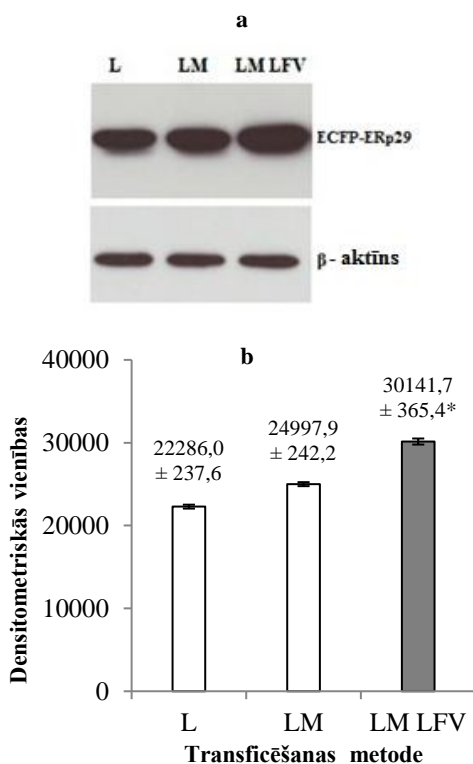


3.10. attēls. LacZ gēna piegāde HEPG2 šūnās izmantojot trīs dažādas gēnu piegādes metodes: (a) β-galaktosidāzes ekspresija HEPG2 šūnās (× 200), (b) transfēcēšanas efektivitāte pēc β-galaktosidāzi ekspresējošo šūnu skaita (n = 9; * p < 0,05, salīdzinot ar L un LM, Tukey tests)

Tika konstatēts, ka LM LFV ietekmē būtiski paaugstinās transfēcēšanas efektivitāte arī HEPG2 šūnās (p < 0,001) salīdzinājumā ar abām pārējām

metodēm – L un LM. Pielietojot LM LFV, iespējams sasniegt visaugstāko transfekcijas efektivitāti pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita – 87,7% transficētu šūnu, kas ir par 51% vairāk, salīdzinot ar LM un par 56% vairāk, salīdzinot ar L. Kā redzams 3.10. attēlā (a), arī HEPG2 šūnās tika novērots, ka ar LM LFV metodi transficētajās atkrāsotajās šūnās raksturīgā krāsojuma intensitāte ir ievērojami augstāka salīdzinot ar LM un L.

ECFP-ERp29 ekspresijas rādītāji HEPG2 šūnās atspoguļoti 3.11. attēlā.



3.11. attēls. ECFP-ERp29 gēna piegāde HEPG2 šūnās izmantojot trīs dažādas gēnu piegādes metodes: (a) ECFP-ERp29 ekspresija HEPG2 šūnās (*Western blota* analīze), (b) transfekcijas efektivitāte pēc ECFP-ERp29 ekspresijas līmeņa ($n = 9$; * $p < 0,05$, salīdzinot ar L un LM, *Tukey tests*)

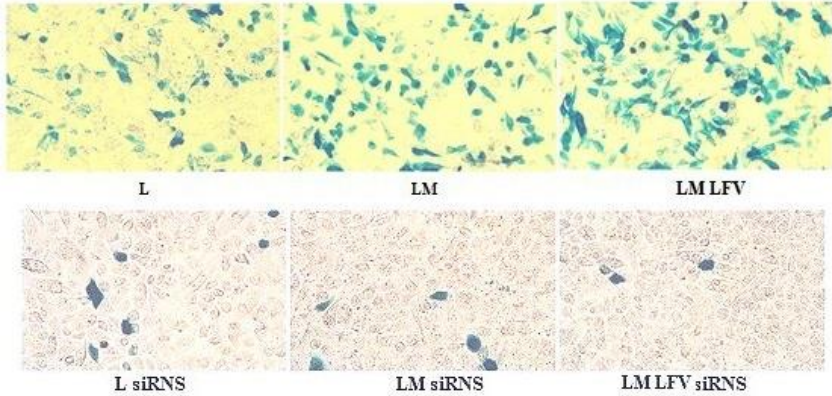
Tika konstatēts, ka LM LFV pielietojums būtiski paaugstina ECFP-ERp29 gēna piegādi HEPG2 šūnās ($p < 0,001$) salīdzinājumā ar abām pārējām gēnu piegādes metodēm. Kopējais ECFP-ERp29 ekspresijas līmenis LM LFV ietekmē pieaug par 9%, salīdzinot ar LM un par 15%, salīdzinot ar L.

Iegūtie rezultāti parāda, ka, salīdzinot trīs dažādas gēnu piegādes metodes, LM LFV pielietojums noved pie gan pie visaugstākā reportējošo gēnu ekspresējošo šūnu skaita, gan pie visaugstākā kopējā proteīnu līmeņa transkribētajās šūnās.

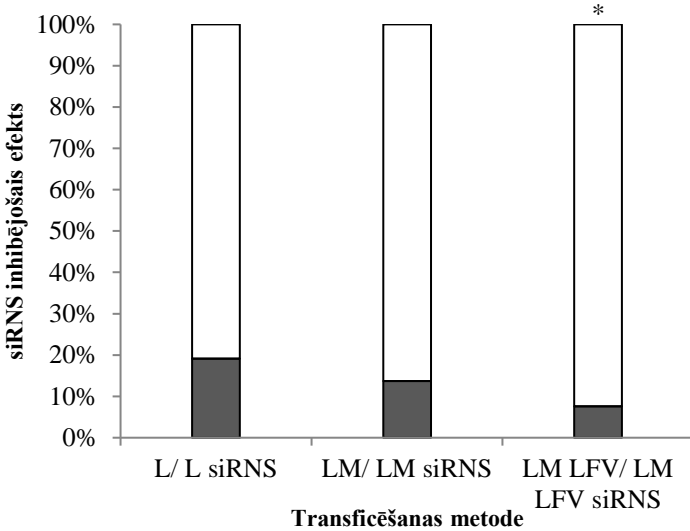
Ko-transfekcijas eksperimentos tika pārbaudīts siRNS inhibējošais efekts uz β -galaktozidāzes ekspresiju PC3 šūnās, izmantojot dažādas gēnu piegādes metodes. Iegūtie rezultāti atspoguļoti 3.12. attēlā.

Tika panākta būtiska siRNS inhibējoša ietekme uz β -galaktozidāzes ekspresiju PC3 šūnās ($p < 0,001$), pielietojot visas trīs gēnu piegādes metodes (3.12. att. (a)). Tomēr, novērtējot siRNS inhibējošo efektu attiecībā pret transfekciju bez siRNS, respektīvi L, LM un LM LFV, tika konstatēts, ka LM LFV ietekmē tiek panākts visaugstākais β -galaktozidāzes ekspresiju inhibējošais efekts – 92,4% β -galaktozidāzi neekspresējošu šūnu, kas ir būtiski vairāk, salīdzinot ar LM (86,3%) un L (80,9%) ($p < 0,001$).

a



b

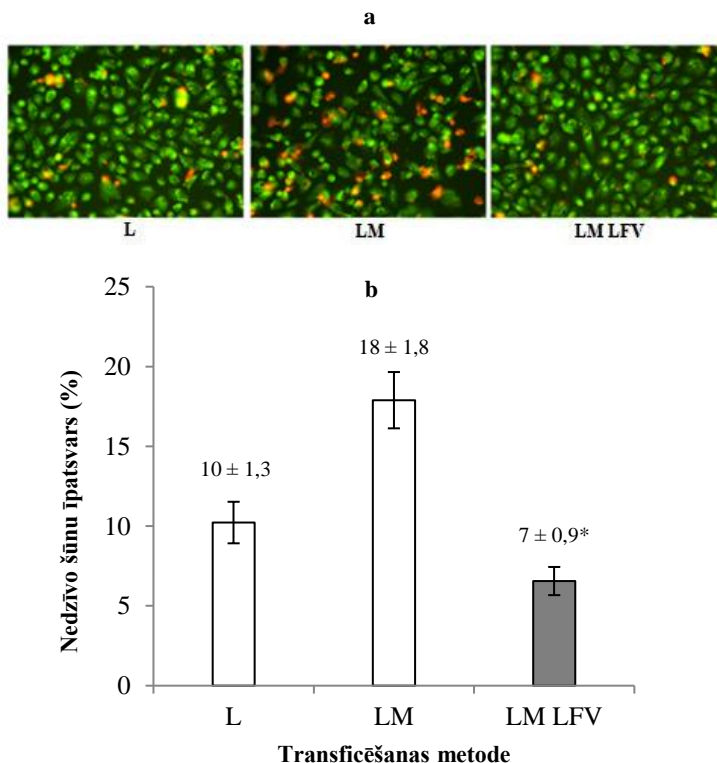


3.12. attēls. LacZ gēna un siRNS pret β -galaktozidāzi piegāde PC3 šūnās izmantojot trīs dažādas gēnu piegādes metodes: (a) LacZ gēna ekspresija PC3 šūnās ($\times 200$), (b) transfekcija ar LacZ (balts) un ko-transfekcija ar LacZ un siRNS pret β -galaktozidāzi (pelēks) ($n = 9$; * $p < 0,05$, salīdzinot ar L/Lsi RNS un LM/LM siRNS, Tukey tests)

3.2.3. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka pielietojuma citotoksiskais efekts

Ar LacZpDNS transficētu PC3 šūnu dzīvotspēju raksturojošie rādītāji attēloti 3.13. attēlā.

Vizuāli visaugstākais citotoksiskais efekts tika novērots ar LM transficētu PC3 šūnu paraugos (3.13. att. (a)).

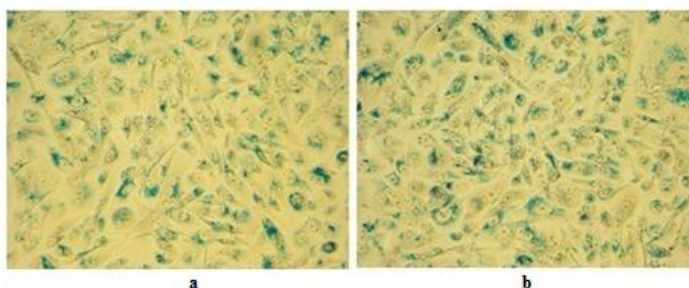


3.13. attēls. Dažādu gēnu piegādes metožu pielietojuma citotoksiskais efekts: (a) ar trim dažādām gēnu piegādes metodēm transficētas un pēc AO/EB metodes atkrāsotās PC3 šūnas ($\times 200$), (b) citotoksicitāte ($n = 9$); * $p < 0,05$, salīdzinot ar L un LM, *Tukey tests*)

Aprēķinu rezultātā tika konstatēts, ka LM LFV ietekmē būtiski samazinās apopototisko un mirušo šūnu īpatsvars paraugos, salīdzinot abām pārējām gēnu piegādes metodēm – LM un L (3.13. att. (b)). Dzīvo PC3 šūnu īpatsvars LM LFV ietekmē sasniedza 94%, kamēr LM gadījumā 82% un L gadījumā 90% ($p < 0,001$).

3.3. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz SPION piegādes efektivitāti vēža šūnās

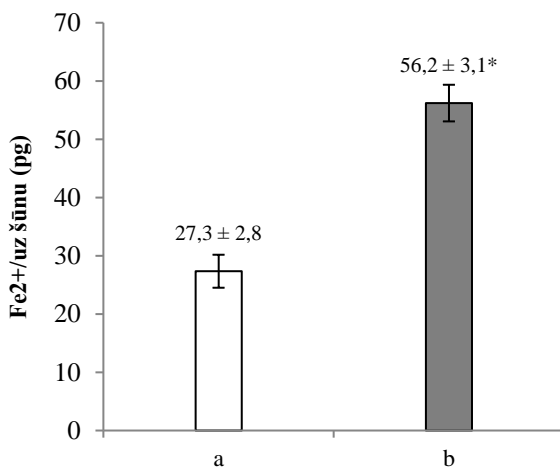
Lai netieši apstiprinātu iepriekšējās eksperimentu sērijās konstatēto, ka β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita pieaugumu un ECFP-ERp29 kopējā ekspresijas līmeņa paaugstināšanos laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē izraisa lielāks sedimentēto un attiecīgi PC3 šūnās iekļauto SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu daudzums, tika veikta SPION internalizācijas kvalitatīva analīze. Veicot šūnu magnētisko iezīmēšanu ar 10 μg SPION/šūnu kultūras plates iedaļu, un pielietojot PB krāsošanas metodi, tika skaidri parādīta SPION klātbūtne magnētiski iezīmētu šūnu citoplazmā.



3.14. attēls. Pēc PB metodes atkrāsotās magnētiski iezīmētās PC3 šūnas ($\times 200$). (a) – magnētiskā iezīmēšana veikta statiskajā magnētiskajā laukā, (b) – magnētiskā iezīmēšana veikta laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā; zilais krāsojums norāda uz šūnās internalizēto SPION klātbūtni

Kā redzams 3.14. attēlā, PC3 šūnu magnētiskās iezīmēšanas efektivitāte pēc ekspozīcijas kā statiskajā magnētiskajā laukā (3.14. att. (a)), tā laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (3.14. att. (b)) bija tuvu 100%. Vizuāli starp abām pielietotajām metodēm tika novērota atšķirība krāsojuma intensitātē, kas netieši norāda par atšķirībām internalizētās dzelzs daudzumā.

Lai apstiprinātu iegūtos rezultātus pēc PB krāsojuma, tika kvantitatīvi novērtēts šūnās ieslēgto SPION daudzums, veicot dzelzs satura spektrofotometrisku analīzi ar SPION magnētiski iezīmētās šūnās.



3.15. attēls. **Dzelzs daudzums magnētiski iezīmētās PC3 šūnās: (a) – magnētiskā iezīmēšana veikta statiskajā magnētiskajā laukā, (b) – magnētiskā iezīmēšana veikta laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (n = 9; * p < 0,05, salīdzinot ar a, t-tests)**

Tika konstatēts, ka laika-fāzes variējošā magnētiskā lauka ietekmē būtiski – 2 reizes paaugstinās internalizētās dzelzs daudzums PC3 šūnās, salīdzinot ar statiskā magnētiskā lauka ietekmē šūnās internalizētās dzelzs daudzumu (3.15. att.). Iegūtie rezultāti apstiprina šūnās internalizēto SPION un

attiecīgi SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu saistību ar paaugstinātu gēnu ekspresiju laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē.

Pētījumā eksperimentāli tika parādīts, ka laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē tiek panākta vienmērīgāka SPION izkliede uz šūnu kultūras plates iedaļas virsmas, salīdzinot ar SPION izkliedi uz virsmas statistiskajā magnētiskajā laukā. Laika-fāzes magnētiskā lauka ietekmē paaugstinās šūnās internalizēto SPION daudzums, kā arī palielinās gan transficēto šūnu skaits, gan kopējais ekspresētā proteīna līmenis transficētajās šūnās. Laika-fāzes variējošā magnētiskā lauka ietekmē samazinās gēnu piegādes izraisītais citotoksiskais efekts.

DISKUSIJA

Gēnu terapijas efektivitāti raksturo atbilstošas devas terapeitiskā gēna piegāde mērķa šūnās, neizraisot būtisku citotoksisko efektu. Magnetofekcija ir viena no efektīvākajām gēnu piegādes metodēm, kuras pamatā ir ar SPION saistītu nukleīnskābju piegāde šūnās ar ārēja statiska magnētiskā lauka palīdzību. Magnētiskais lauks ļauj īsā laikā koncentrēt nukleīnskābes uz šūnu virsmas, tā paaugstinot arī šūnās piegādāto nukleīnskābju daudzumu.

Literatūras datu analīzē tika noskaidrots, ka dažādu alternatīvu (ne statisku) magnētisko lauku pielietojums uzlabo magnetofekcijas efektivitāti. Pastāv uzskats, ka kompleksa magnētiskā lauka iedarbība izraisa SPION-nukleīnskābju svārstības dažādos virzienos, tā stimulējot to pārneši caur šūnas membrānu, taču šīs parādības mehānisms līdz galam nav noskaidrots. Mūsu starpdisciplinārā grupa aprakstījusi jaunu – laika-fāzes variējošu magnētisko lauku, kura pamatā ir permanentu magnētu orbitāla rotācija šūnu kultūrai paralēlā plaknē. Datormodelēšanas rezultāti parādīja, ka laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē, SPION sedimentācija notiek tās pārmaiņus pārvietojot aksiālā un laterālā virzienā, kā rezultātā tiek panākta vienmērīga SPION izkliede uz virsmas.

Promocijas darbā ir praktiski pierādīts, ka pielietojot laika-fāzes variējošu magnētisko lauku, iespējams būtiski paaugstināt nukleīnskābju piegādes efektivitāti vēža šūnās.

Lai apstiprinātu datormodelēšanas rezultātus, pirmkārt tika savstarpēji salīdzināta sedimentēto SPION izkliede statiska un laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē. Iegūtie rezultāti uzrādīja krasu atšķirību SPION izvietojumā uz šūnu kultūras plātes iedaļas virsmas – statiskajā magnētiskajā laukā SPION veidoja izteiktu svītrveida rakstu ar salīdzinoši lieliem bez SPION laukumiem starp svītrveida struktūrām, kamēr LM LFV gadījumā

SPION izvietojās vienmērīgāk un bez SPION laukumi praktiski novēroti netika. Šāds SPION sedimentācijas profils varētu būt izskaidrojams ar specifisko magnetofekcijas iekārtas *DynaFECTOR* magnētu rotācijas programmu, kas nodrošina magnētiskā lauka spēku nepārtrauktu mainību, kas saistīta ar trim dažādām fāzēm (magnētu pozīcija zem iedaļas) magnētu rotācijas procesā. Iegūtie rezultāti varētu norādīt uz to, ka magnētu orbitālās kustības laikā notiek nepārtraukta SPION pārvietošana aksiāli laterālā virzienā, nodrošinot to pakāpenisku sedimentāciju “soli pa solim” tā, iespējams, kavējot lineāru-ķēžveida struktūru veidošanos. Dažādu magnētisko lauku atšķirīgā ietekme uz magnētisko nanodaļiņu kustību šķīdumā novērota arī citos pētījumos. *Gravel* grupas pētījumā tika novērotas būtiskas atšķirības magnētisko nanodaļiņu izvietojumā tubulāra divpolu trīsfāžu elektromagnēta ģenerētu magnētisko lauku iedarbības rezultātā. *Rotējošā* magnētiskajā laukā magnētiskās nanodaļiņas veidoja apaļas formas virpuļveida struktūras, bet *oscilējoša* un *statiska* magnētiskā lauka gadījumā – lineāras struktūras, kas sakrīt ar šajā pētījumā novēroto attiecībā uz statisko magnētisko lauku.

Ja SPION sedimentācijas procesa laikā laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā daļiņu pārvietošanās notiek gan aksiālā, gan laterālā virzienā, tad sagaidāms, ka arī SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu kustība notiks ne tikai aksiālā, bet arī laterālā virzienā. Tas, iespējams, varētu sekmēt šo kompleksu iekļūšanu šūnās, kas attiecīgi rezultēsies paaugstinātā transfekcijas efektivitātē.

Optimālā pDNS-LIP-SPION savstarpējā attiecība gan magnetofekcijai statiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā abām šūnu līnijām bija identiska: 1:2:1. Pie $x < \text{pDNS-LIP-SPION savstarpējās attiecības tika novērota nukleīnskābju piegādes efektivitātes samazināšanās, savukārt pie } x > \text{pDNS-LIP-SPION savstarpējās attiecības paaugstinājās citotoksiskais efekts. Neskatoties uz identisku pDNS-LIP-SPION savstarpējo attiecību, kas tika$

pielietota magnetofekcijai statiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, transfekcijas efektivitāte laika-fāzes variējošā magnētiskā lauka gadījumā bija augstāka, nekā statiskajā magnētiskajā laukā. Tas varētu norādīt uz to, ka laika-fāzes variējoša lauka ietekmē paaugstinās internalizēto nukleīnskābju daudzums un tam ir saistība ar SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu laterālu kustību rotācijas ietekmē, jo visi citi parametri (magnētiskā lauka intensitāte, darbības ilgums), salīdzinot ar statisko magnētisko lauku, ir identiski.

Magnetofekcijas efektivitāte variē atkarībā no ekspozīcijas ilguma magnētiskajā laukā. Tika novērots, ka visefektīvākā LacZ gēna piegāde PC3 un HEPG2 šūnās (pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita) notiek pie 5 min ekspozīcijas gan statiskajā, gan laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā. Īsāka ekspozīcija noved pie samazinātas gēnu piegādes efektivitātes, kas liecina par to, ka ekspozīcijas ilgums < 5 min ir nepietiekams SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu koncentrēšanai uz šūnas virsmas. Iegūtie rezultāti sakrīt ar *Huth* grupas konstatēto – pētījumos ar HeLa šūnu līniju tika novērota SPION koncentrēšanās apkārt šūnas membrānai jau pēc 5 min ekspozīcijas magnētiskajā laukā. Arī mūsu iepriekšējos pētījumos transgēna ekspresija vēža šūnās, transficējot ar magnetofekcijas metodi, tika konstatēta jau pēc 4 stundām salīdzinājumā ar lipofekcijas metodi – 8 stundām, kas apstiprina citu autoru pētījumos konstatēto attiecībā uz magnetofekcijas kinētiku salīdzinājumā ar citām metodēm, piemēram, lipofekciju (*Mykhaylyk et al.*, 2009b, 2010).

Magnetofekcijas efektivitātes izmaiņas, atkarībā no ekspozīcijas ilguma magnētiskajā laukā, iepriekš novērojusi *Kamau* ar līdzautoriem. Savstarpēji salīdzinot reportējošā gēna ekspresiju vairākās šūnu līnijās, pēc 5 un 20 min ekspozīcijas kombinētā statiskā/oscilējošā magnētiskajā laukā, izmantojot divu veidu SPION, tika konstatēts, ka efektīvāka ir 20 min ekspozīcija magnētiskajā laukā. Pretēji mūsu grupas iegūtie rezultāti liecina, ka, izmantojot tikai 5 min ekspozīciju gan statiskajā, gan laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, ir

iespējams sasniegt augstu transfekcijas efektivitāti, bet jāatzīmē atšķirības pētījuma dizainā. *Kamau* grupas pētījumā gēnu piegāde HeLa un Cos7 šūnās tika nodrošināta ar magnetofekcijas metodi, izmantojot komerciālās *polyMAG* un autoru sintezētās ar PEI pārklātās SPION. Jebkurš no šiem faktoriem – gan SPION, gan reportējošo gēnu kodējoša plazmīdas DNS, gan izvēlēta šūnu līnija un visbeidzot transfekcijas metode var ietekmēt gēnu piegādes efektivitāti.

Maksimāli īss ekspozīcijas ilgums varētu būt kritisks faktors klīniskajos pētījumos, kur, lai panāktu vēlamu efektu, nepieciešams pielietot augstas intensitātes magnētisko lauku. Pierādīts, ka mērenas intensitātes (0,5–2 T) magnētiskā lauka iedarbība neizraisa blakusefektus (*Leszczynski*, 2005), bet ekspozīcija augstas intensitātes (200 T) magnētiskajā laukā var izraisīt DNS degradāciju (*Li and Chow*, 2001). Šajā pētījumā magnētu specifiskā izvietojuma rezultātā tiek radīts mērens (0,35 T) magnētiskais lauks, taču tas ir pietiekams efektīvam pielietojumam arī *in vivo* (*Chertok et al.*, 2011).

Interesanti rezultāti tika iegūti novērtējot magnetofekcijas efektivitātes izmaiņas atkarībā no magnētu apgriezīgu frekvences – nozīmīgākā laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka raksturojošā rādītāja. Datorsimulācijās tika parādīts, ka SPION sedimentācija uz virsmas ir atkarīga no magnētu apgriezīgu frekvences – palielinot magnētu apgriezīgu frekvenci ω līdz noteiktai robežai ($\omega = 40$), SPION sedimentācija uz virsmas kļūst vienmērīgāka un būtiski nemainās pie tālāka frekvences pieauguma. Eksperimentāli tika konstatēts, ka magnetofekcijas efektivitāte variē atkarībā no magnētu apgriezīgu frekvences, bet atšķirīgi dažādās šūnu līnijās. Vislielākais β -galaktozidāzi ekspresējošo PC3 šūnu skaits tika iegūts pie 5 apgr./min ar 5 min ekspozīciju magnētiskajā laukā, savukārt vislielākais β -galaktozidāzi ekspresējošo HEPG2 šūnu skaits – ar 5 min ekspozīciju magnētiskajā laukā pie magnētu apgriezīgu frekvences 50 apgr./min. Atšķirības starp datorsimulācijās un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem varētu norādīt uz šūnu membrānas lomu internalizācijas iznākumā,

bet lai to precīzi noteiktu ir nepieciešami papildu pētījumi. Eksperimentāli iegūtie rezultāti varētu būt skaidrojami pirmkārt ar PC3 un HEPG2 šūnu atšķirīgajām membrānas īpašībām, jo, zināms, ka SPION internalizācijas sekmes ir tieši atkarīgas no šūnu veida (*Kamau et al., 2006; Cromer Berman et al.; Schwarz et al., 2012*). PC3 šūnas ($d = 23 \mu\text{m}$) ir vairāk kā divas reizes lielākas par HEPG2 šūnām ($d = 10 \mu\text{m}$). Palielinot magnētu rotācijas ātrumu, paātrinās arī SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu kustība laterālā virzienā pa šūnas virsmu tā, iespējams, papildus stimulējot endocitozes procesus, kas varētu būt izšķirošs faktors neliela izmēra šūnām. Iegūtie rezultāti arī norāda uz to, ka rotējošā magnētu sistēmā iespējams pielāgot magnetofekcijas protokolu dažādu šūnu veidu transfekcijai, attiecīgi pielāgojot magnētu apgriezību frekvenci.

Dati, kas tika iegūti novērtējot magnētiskā lauka intensitātes izmaiņu ietekmi uz β -galaktozidāzes ekspresiju, ir likumsakarīgi, jo, zināms, ka, palielinoties attālumam no magnēta, samazinās magnētiskā lauka intensitāte un tas savukārt ietekmē efektivitāti. *Fouriki* pētījumā netika novērotas statistiski ticamas atšķirības transgēna ekspresijas rādītājos atkarībā no attāluma no magnēta – 3 mm (0,1 T), 4 (0,08 T) un 5 mm (0,06 T). Mūsu pētījumā attāluma izmaiņas ir daudz lielākas – 9 un 6 mm attiecībā pret kontroles attālumu 0 mm, kas attiecīgi nozīmē lielāku atšķirību magnētiskās intensitātes rādītājos – 0,1 T un 0,2 T attiecībā pret 0,35 T.

Magnetofekcijas efektivitāte pie 5 min ekspozīcijas magnētiskajā laukā ar magnētu apgriezību frekvenci 5 apgr./min PC3 un 50 apgr./min HEPG2 šūnās pēc β -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita sasniedz 79,6% un 87,7%. Šie ir ļoti augsti magnetofekcijas efektivitātes rādītāji, ņemot vērā to, ka gan PC3, gan HEPG2 šūnu līnijas pieder pie grūti transficējamām šūnu līnijām ar raksturīgu transfekcijas efektivitāti 30–40% robežās.

Analizējot gēnu piegādes efektivitāti, ir būtiski noskaidrot, gan cik šūnās, gan cik daudz vienā/visās šūnās ir notikusi rezultatīva gēna piegāde. Pēc

literatūras datiem šāda veida pētījumos, lai atspoguļotu gēnu piegādes efektivitāti pamatā izmanto luciferāzes aktivitātes kvantitatīvu detekciju, taču pēc šīs analīzes nevar spriest par transficēto šūnu skaitu. Šajā pētījumā ir analizēti abi indicējošie parametri.

Salīdzinošie dati, kas iegūti transficējot vēža šūnas ar trim dažādām metodēm, parādīja, ka laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē statistiski būtiski paaugstinās nukleīnskābju piegādes efektivitāte:

a) gan pēc reportējošo gēnu ekspresējošo šūnu skaita – par 21%, salīdzinot ar LM un par 42%, salīdzinot ar L PC3 šūnās, un par 51%, salīdzinot ar LM un 56%, salīdzinot ar L HEPG2 šūnās;

b) gan pēc kopējā proteīnu daudzuma – par 6%, salīdzinot ar LM un par 22%, salīdzinot ar L PC3 šūnās, un par 9%, salīdzinot ar LM un 15%, salīdzinot ar L HEPG2 šūnās.

Būtiski, ka uzlabota gēnu piegādes efektivitāte LM LFV gadījumā salīdzinājumā ar LM un L tika novērota arī gadījumos kad reportējošā gēna ekspresija nepārsniedza 50%, kas apstiprina laika-fāzes magnētiskā lauka prevalējošo iedarbību pār citiem transfekcijas efektivitāti ietekmējošiem faktoriem.

Pārliecinoši rezultāti tika iegūti pārbaudot siRNS inhibējošo efektu uz β -galaktozidāzes ekspresiju ar ko-transfekcijas metodi. Nosakot siRNS inhibējošo efektu attiecībā pret magnetofekcijas efektivitāti (bez siRNS), tika konstatēts statistiski nozīmīgs LM LFV (92,4%) pārkums, salīdzinot gan ar LM (86,3%), gan L (80,9%), kas norāda uz metodes potenciālu pielietošanai terapeitisko siRNS piegādei vēža šūnās.

Salīdzinot ar abām plaši pielietotajām konvencionālajām gēnu piegādes metodēm (L un LM), uzlabotā gēnu piegādes metode (LM LFV) ir mazāk citotoksiska, kas tika uzskatāmi parādīts, izmantojot PC3 šūnu līniju. Novērotais attiecībā uz SPION kustību sedimentācijas laikā laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā liecina, ka magnētu rotācijas rezultātā SPION izkļiedžas

vienmērīgi un tiek kavēta liela izmēra struktūru veidošanās šķīdumā un attiecīgi arī uz šūnu membrānām. Tas samazina šūnu bojājumus un tādā veidā ir saistīts ar mazāku citotoksisko efektu, salīdzinot ar LM. Savukārt novērojumi attiecībā uz specifisko SPION izkliedi statiskā magnētiskā lauka ietekmē izskaidro augstos LM citotoksicitātes rādītājus. SPION citotoksiskais efekts statiskā magnētiskā lauka ietekmē plaši analizēts *Bae* un līdzautoru pētījumā. Autori pierādījuši, ka mērena statiskā magnētiskā lauka ietekmē (vidēji 0,4 T) SPION veido agregātus, kas tiek koncentrēti uz NCTC 1469 (normālas peļu hepatocītu šūnas) šūnu virsmas. Tieši šādu agregātu koncentrēšanās uz šūnu virsmas, ne internalizācija šūnās būtiski ietekmē šūnu dzīvotspēju atkarībā gan no SPION sākotnējās koncentrācijas, gan ekspozīcijas ilguma magnētiskajā laukā.

SPION izkliede, iespējams, ir prevalējošais faktors attiecībā uz citotoksicitātes rādītājiem šajā pētījumā, ņemot vērā arī to, ka SPION ir salīdzinoši netoksiskas un to pielietojums dažādos savienojumos pēc literatūras datiem var pat samazināt kopējo citotoksicitāti (*Leung et al., 2013*).

Magnētiskā iezīmēšana ar SPION un sekojoša Fe^{2+} daudzuma noteikšana magnētiski iezīmētās šūnās apstiprināja, ka laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē šūnās iekļūst vairāk SPION. Tādējādi ir pamats uzskatīt, ka laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē šūnās vairāk iekļūst arī ar SPION saistītu nukleīnskābju.

Līdz šim šāda veida pētījumos, kur tikusi analizēta dažādu ne statisku magnētisko lauku ietekme, paaugstināta nukleīnskābju piegāde šūnās tiek saistīta tikai ar laterālas SPION kustības kā endocitozi stimulējoša faktora ietekmi. *Dobson* grupa (*Fouriki et al., 2010*) izstrādājusi oscilējošu magnētu sistēmu magnefect-nano™. Tās pamatā ir NdFeB magnētu sistēmas izraisītas 2 Hz laterālas oscilācijas 200µm amplitūdā. Ar šīs sistēmas palīdzību tiek nodrošināta SPION-kompleksu sedimentācija uz šūnu virsmas, kam seko kustība sānu virzienā pa šūnas virsmu, tā stimulējot SPION-kompleksu internalizāciju. *Kamau* ar līdzautoriem aprakstījuši dinamiskā lauka ģeneratora *Dynamic Marker*

pielietojumu gēnu piegādei šūnās. Šīs sistēmas pamatā ir elektromagnētu radīts 50 Hz magnētiskais lauks, kas darbojas Z ass virzienā un papildus 0,75 Hz magnētiskais lauks, kas darbojas X ass virzienā ar 1,5 cm amplitūdu, tādējādi izraisot SPION-kompleksu svārstības šūnu kultūras plaknei perpendikulārā un paralēlā virzienā, ar attiecīgu svārstību amplitūdu 50 un 0,75 Hz. Šīs laterālās svārstības kopā ar iespējamu rotējošu kustību uz šūnas virsmas stimulē SPION-kompleksu pārvietošanos caur šūnas membrānu.

Šajā pētījumā iegūtie rezultāti parāda, ka ticamāk paaugstināta SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu internalizācija šūnās varētu notikt multiplu faktoru iedarbības rezultātā. Viens no būtiskākajiem faktoriem, kas tika pierādīts arī praktiski ir SPION vienmērīgā izkliede uz šūnu kultūras plates iedaļas virsmas laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā laterālas SPION kustības ietekmē. Statiskajā magnētiskajā laukā īsā laikā uz šūnu virsmas koncentrējas ļoti daudz SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu, kas vienlaicīgi nevar tikt iekļauti šūnās. Tas var novest ķēžveida struktūru veidošanās. Sedimentācija “soli pa solim” aksiāli laterālā virzienā laika-fāzes variējošā laukā kavē vienlaicīgu SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu sedimentāciju uz šūnu virsmas un attiecīgi ķēžveida struktūru veidošanos kā rezultātā netiek traucēta to internalizācija.

Nevar izslēgt, ka arī laterāla SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu kustība pa šūnas virsmu veicina to ieslēgšanu šūnās – kustības rezultātā ar šūnas virsmu saskaras vairāk kompleksu – vairāk mehāniski tiek stimulēta šūnas membrāna. *Jenkins* ar līdzautoriem novērojuši, ka neirosfēru kultūrās, kuras tika pakļautas oscilējošām laterālām svārstībām, šūnu plazmatiskās membrānas ir ar izteiktāku reljefu. Citos pētījumos ir pierādīts, ka ārēja mehāniska spēka inducēta membrānas stimulācija sekmē gan endocitozes, gan eksocitozes procesus (*Apodaca*, 2002) un SPION-nukleīnskābju kompleksu pastiprinātu iekļūšanu šūnā primāri izraisa

mehāniski stimulēti endocitozes procesi (*Fouriki et al.*, 2010). Savukārt šo mehānisko stimulāciju var izraisīt gan svārstīga SPION-nukleīnskābju kompleksu kustība pa šūnas membrānas virsmu mainīga magnētiskā lauka ietekmē (*Lim et al.*, 2012) gan arī pagaidu poru veidošanās šūnas membrānā mainīga magnētiskā lauka izraisītu vibrāciju ietekmē (*Dahmani et al.*, 2013).

SECINĀJUMI

1. Atšķirības uz virsmas sedimentēto SPION izvietojumā statistiskajā un laika-fāzes magnētiskajā laukā liecina par atšķirīgu SPION kustību šķīdumā šo magnētisko lauku ietekmē. Iespējams, tā ir aksiāli laterāla SPION kustība, kas rodas laika-fāzes magnētiskā lauka ietekmē.

2. Magnētu apgriezīgu frekvence (apgr./min) ir viens no būtiskākajiem laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka raksturlielumiem. Atšķirīga optimālā magnētu apgriezīgu frekvence pie identiska ekspozīcijas ilguma magnētiskajā laukā PC3 šūnās (5 apgr./min) un HEPG2 šūnās (50 apgr./min) norāda uz to, ka magnētu apgriezīgu frekvencei ir būtiska loma gēnu piegādes efektivitātes paaugstināšanā.

3. Būtisks transficēto PC3 un HEPG2 šūnu skaita pieaugums līdz ar kopējā ekspresēto proteīnu līmeņa pieaugumu transficētajās PC3 un HEPG2 šūnās, kā arī būtisks gēnu piegādi inhibējoša efekta pieaugums un citotoksiskā efekta samazināšanās PC3 šūnās liecina par laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka pozitīvu ietekmi uz SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu piegādes efektivitāti vēža šūnās. Liposomālā magnetofekcija laika-fāzes variējoša magnētiskajā laukā ir efektīvāka nukleīnskābju piegādes metode vēža šūnās salīdzinot ar lipofekciju un liposomālo magnetofekciju.

4. Kopumā analizējot iegūtos rezultātus var secināt, ka laika-fāzes magnētiskā lauka ietekmē notiek SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu aksiāli laterāla kustība šķīdumā. Tā rezultātā → notiek vienmērīgāka SPION sedimentācija uz šūnu virsmas → paaugstinās šūnās ieslēgto SPION daudzums → paaugstinās arī šūnās ieslēgto

SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu daudzums → palielinās ne tikai magnetificēto šūnu skaits, bet arī paaugstinās piegādāto gēnu ekspresijas līmenis magnetificētās šūnās → samazinās citotoksicitāte.

PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

ZINĀTNISKIE RAKSTI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

1. Kozlov V., **Avotina D.**, Kasyanov V., Baryshev M. The Effect of Cyclic Movement of Magnets on the Sedimentation of Magnetic Nanoparticles in Magnetofection Devices: Computer Simulation // *Separat Sci Technol*, 2015; 50 (5): 767–771.
2. Karpov A., Kozireva S., **Avotiņa D.**, Chernobayeva L., Baryshev M. Investigation of nanoparticle distribution formed by the rotation of the magnetic system // *J Magn Magn Mater*, 2014; 369: 86–91.
3. **Avotina D.**, Kozireva S., Karpovs A., Chistyakovs M., Baryshev M. Dynamic magnetic field increases intracellular magnetic labelling of prostate carcinoma and Burkitt's lymphoma cells // *Collection of Scientific Papers 2012 RSU*, 2013; (2): 65–70.
4. **Vainauska D.**, Kozireva S., Karpovs A., Čistjakovs M., Bariševs M. A Novel Approach for Nucleic Acid Delivery Into Cancer Cells // *MEDICINA (Kaunas)*, 2012; 48 (6): 324–329. PMID: 22885367.

KONFERENČU TĒZES

1. Kozireva S., **Avotiņa D.**, Karpovs A., Čistjakovs M., Baryshev M. “Dynamic magnetic field increases transduction efficacy of GFP-modTAT into prostate carcinoma PC3 cells” *RSU 2013. gada Zinātniskā konference*, Rīga, 21.–22. marts, 2013.
2. Baryshev M., **Avotina D.**, Kozireva S. Use of Transducible Modified TAT Peptide for Simultaneous Protein and DNA Delivery into PC3 Cells. *1st International Conference on BioNano Innovation*, Brisbena, Austrālija, 18 – 20. jūlijs, 2012.

3. Kozireva S., **Avotiņa D.**, Baryshev M. Transduction of GFP-Tus-NLS and GFP-modTat Fusion Proteins into Prostate carcinoma and Burkitt's Lymphoma Cells. *1st International Conference on BioNano Innovation*, Brisbena, Austrālija, 18.–20. jūlijs, 2012.
4. **Avotiņa D.**, Kozireva S., Karpovs A., Chistyakovs M., Baryshev M. Enhanced Magnetic Cell Labeling Efficiency Using Dynafactor. *RSU 2012. gada Zinātniskā konference*, Rīga, 29.–30. marts, 2012. (stenda referāts)
5. **Vainauska D.**, Kozireva S., Karpovs A., Chistyakovs M., Baryshev M. Improved Technique of Nucleic Acid Delivery into Cancer cells. *RSU 2011. gada Zinātniskā konference*, Rīga, 14.–15. aprīlis, 2011. (mutisks referāts)
6. Karpovs A., **Vainauska D.**, Kozireva S., Chistyakovs M., Baryshev M. Dynafactor Is a New Device for the Enhancement of Liposomal Magnetofection. Efficiency of Cancer Cells under Dynamic Gradient Magnetic Field. *RSU 2011. gada Zinātniskā konference*, Rīga, 14.–15. aprīlis, 2011.

PATENTS

Kozlovs V., Karpovs A., Priedīte V., **Avotiņa D.**, Stradiņš P., Kalējs M., Kasjanovs V., Mironovs V. Telpiski sakārtotas šūnu struktūras izveidošanas paņēmiens no dzīvotspējīgām pieauguša cilvēka šūnām. LV-14595B, 20.02.2013.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Anson D.S. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery // *Genet Vaccines Ther*, 2004; 2 (1): 9.
2. Apodaca G. Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli // *Am J Physiol Ren Physiol*, 2002; 282 (2): F179–F190.
3. Bae J.E., Huh M.I., Ryu B.K., et al. The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2011; 3 (4): 343–355.
4. Brunner S., Furtbauer E., Sauer T., et al. Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation // *Mol Ther*, 2002; 5 (1): 80–86.
5. Bushman F.D. Retroviral integration and human gene therapy // *J Clin Invest*, 2007; 117 (8): 2083–2086.
6. Chertok B., David A.E., Yang V.C. Brain tumor targeting of magnetic nanoparticles for potential drug delivery: effect of administration route and magnetic field topography // *J Control Release*, 2011; 155 (3): 393–399.
7. Cromer Berman S.M., Walczak P., Bulte J.W. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles // *Biomaterials*, 2011; 32 (35): 9401–9414.
8. Dahmani C., Mykhaylyk O., Helling F., et al. Rotational magnetic pulses enhance the magnetofection efficiency in vitro in adherent and suspension cells // *J Mag Mater*, 2013; 332: 163–171.
9. Dick T., Hengst J., Yun J. *Gene Therapy // Reference Module in Biomedical Sciences*, 2015.
10. Fouriki A., Farrow N., Clements M.A., Dobson J. Evaluation of the magnetic field requirements for nanomagnetic gene transfection // *Nano Rev*, 2010; 1: 5167.
11. Fraley R., Subramani S., Berg P., Papahadjopoulos D. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells // *J Biol Chem*, 1980; 255 (21): 10431–10435.
12. Futreal P.A., Coin L., Marshall M., et al. A census of human cancer genes // *Nat Rev Cancer*, 2004; 4 (3): 177–183.
13. Goudy K.S., Wang B., Tisch R. Gene gun-mediated DNA vaccination enhances antigen-specific immunotherapy at a late preclinical stage of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice // *Clin Immunol*, 2008; 129 (1): 49–57.
14. Gravel O., Lauzon-Gauthier J., Duchesne C., Larachi F. Inception of vortical coherent structures from spinning magnetic nanoparticles in rotating magnetic fields—New nanofluid microscale mixing tool // *Chem Eng J*, 2015; 260: 338–346.
15. Hofmann-Antenbrink M., von Rechenberg B., Hofmann H. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications // *Nanostructured Materials for Biomedical Applications / Ed. by Tan M.C.*, 2009. – ISBN: 978-81-7895-397-7.
16. Hunter A.C. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity // *Adv Drug Deliv Rev*, 2006; 58 (14): 1523–1531.
17. Huth S., Lausier J., Gersting S.W., et al. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer // *J Gene Med*, 2004; 6 (8): 923–936.

18. Ibraheem D., Elaissari A., Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems // *Int J Pharm*, 2014; 459 (1-2): 70–83.
19. Jafari M., Soltani M., Naahidi S., et al. Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery // *Curr Med Chem*, 2012; 19 (2): 197–208.
20. Jenkins S.I., Pickard M.R., Granger N., Chari D.M. Magnetic nanoparticle-mediated gene transfer to oligodendrocyte precursor cell transplant populations is enhanced by magnetofection strategies // *ACS Nano*, 2011; 5 (8): 6527–6538.
21. Kamau S.W., Hassa P.O., Steitz B., et al. Enhancement of the efficiency of non-viral gene delivery by application of pulsed magnetic field // *Nucleic Acids Res*, 2006; 34 (5): e40.
22. Karpov A., Kozireva S., Avotiņa D., et al. Investigation of nanoparticle distribution formed by the rotation of the magnetic system // *J Magn Magn Mater*, 2014; 369: 86–91.
23. Kennedy M.T., Pozharski E.V., Rakhmanova V.A., MacDonald R.C. Factors governing the assembly of cationic phospholipid–DNA complexes // *Biophys J*, 2000; 78 (3): 1620–1633.
24. Lachmann P.J., Davies A. Complement and immunity to viruses // *Immunol Rev*, 1997; 159 (1): 69–77.
25. Laurent S., Forge D., Port M., et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physiochemical characterizations, and biological applications // *Chem Rev*, 2008; 108 (6): 2064–2110.
26. Leszczynski, D. Rapporteur report: cellular, animal and epidemiological studies of the effects of static magnetic fields relevant to human health // *Prog Biophys Mol Biol*, 2005; 87: 247–253.
27. Leung K.C., Wong C.H., Zhu X.M., et al. Ternary hybrid nanocomposites for gene delivery and magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma cells // *Quant Imaging Med Surg*, 2013; 3 (6): 302–307.
28. Li S.H., Chow K.C. Magnetic field exposure induces DNA degradation // *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 280 (5): 1385–1388.
29. Lim J., Clements M.A., Dobson J. Delivery of Short Interfering Ribonucleic Acid-Complexed Magnetic Nanoparticles in an Oscillating Field Occurs via Caveolae-Mediated Endocytosis // *Plos One*, 2012; 7 (12): e51350.
30. Lv H., Zhang S., Wang B., et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery // *J Control Release*, 2006; 114 (1): 100–109.
31. Mehier-Humbert S., Guy R.H. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells // *Adv Drug Deliv Rev*, 2005; 57 (5): 733–753.
32. Moghimi S.M., Symonds P., Murray J.C., et al. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy // *Mol Ther*, 2005; 11 (6): 990–995.
33. Mulligan R.C. The basic science of gene therapy // *Science*, 1993; 260 (5110): 926–932.
34. Mykhaylyk O., Sanchez-Antequera Y., Vlaskou D., et al. Liposomal magnetofection // *Meth Mol Biol*, 2010; 605: 487–525.
35. Mykhaylyk O., Zelphati O., Hammerschmid E., et al. Recent advances in magnetofection and its potential to deliver siRNAs *in vitro* // *Methods Mol Biol*, 2009 (b); 487: 111–146.

36. Oberle V., Bakowsky U., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Lipoplex formation under equilibrium conditions reveals a three-step mechanism // *Biophys J*, 2000; 79 (3): 1447–1454.
37. Ruß V., Wagner E. Cell and tissue targeting of nucleic acids for cancer gene therapy // *Pharm Res*, 2007; 24 (6): 1047–1057.
38. Sapet C., Laurent N., de Chevigny A., et al. High transfection efficiency of neural stem cells with magnetofection // *Biotechniques*, 2011; 50 (3): 187–189.
39. Schwarz S., Wong J.E., Bornemann J. Polyelectrolyte coating of iron oxide nanoparticles for MRI-based cell tracking // *Nanomed*, 2012; 8 (5): 682–691.
40. Somia N., Verma I.M. Gene therapy: trials and tribulations // *Nat Rev Genet*, 2000; 1: 91–99.
41. Teramoto S., Ishii T., Matsuse T. Crisis of adenoviruses in human gene therapy // *Lancet*, 2000; 355 (9218): 1911–1912.
42. Thrasher A.J., Gaspar H.B., Baum C., et al. Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity // *Nature*, 2006; 443 (7109): E5–7.
43. Wishart D.S. Is cancer a genetic disease or a metabolic disease? // *EbioMedicine*, 2015; 2 (6): 478–479.