

Dace Avotiņa

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

Promocijas darbs  
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – teorētiskā medicīna

Darba zinātniskie vadītāji:  
*Dr. biol. Mihails Bariševs*  
*Dr. biol. Svetlana Kozireva*



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Promocijas darbs izstrādāts ar ESF projekta “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” atbalstu

Rīga, 2016

## ANOTĀCIJA

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 ieslēgšanu šūnā un migrāciju šūnas iekšējā vidē līdz kodolam. Magnetofekcija ir viena no efektīvākajām fizikālajām gēnu piegādes metodēm, kuras pamatā ir ar superparamagnētiskajām nanodaļiņām (SPION) saistītu nukleīnskābju paātrināta koncentrēšana uz šūnu virsmas un piegāde šūnās, izmantojot spēcīgu ārējo magnētisko lauku.

Permanentu magnētu radītā statiskajā magnētiskajā laukā SPION kustība šķīdumā virzienā pret magnētu ir aksiāla. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka, kas tiek ģenerēts ar magnetofekcijas iekārtas *DynaVECTOR* palīdzību, pamatā ir permanentu magnētu plates orbitāla rotācija šūnu kultūras platei paralēlā plaknē.

Datormodelēšanas rezultātā tika noskaidrots, ka laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē notiek SPION aksiāli laterāla kustība magnētam paralēlā un perpendikulārā plaknē. Tas veicina SPION vienmērīgāku sedimentāciju uz virsmas un varētu būt par iemeslu paaugstinātai SPION-nukleīnskābju kompleksu ieslēgšanai šūnās.

Šajā pētījumā eksperimentāli tika pārbaudīta laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu piegādes efektivitāti vēža šūnās.

Iegūtie rezultāti parādīja, ka laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, salīdzinot ar statisko magnētisko lauku notiek vienmērīgāka SPION sedimentācija uz virsmas un paaugstinās šūnās ieslēgto SPION daudzums. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē paaugstinās arī SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu piegāde šūnās, par ko liecina būtiski paaugstināts gan transficēto šūnu skaits, gan arī kopējais ekspresētā proteīna līmenis transficētajās šūnās, salīdzinot ar citām gēnu piegādes metodēm. Savukārt vienmērīgāka sedimentācija uz virsmas laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē nodrošina SPION-nukleīnskābju-liposomālās komponentes kompleksu piegādi šūnās ar samazinātu citotoksisko efektu.

Šajā pētījumā aprakstīta uzlabota efektīva gēnu piegādes metode – liposomālā magnetofekcija laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, kuru varētu izmantot mutēto gēnu aizstāšanai un jaunu terapeitisku siRNA inhibējošā efekta pētījumiem *in vitro* šūnu līnijās. Metode perspektīvā varētu tikt pielietota arī terapeitisko gēnu pārnēsē vēža šūnās *in vivo*.

## ANNOTATION

### **Of the Thesis “Influence of the time-phase varied magnetic field on the nucleic acids delivery into the cancer cells”**

Gene delivery is one of the critical steps in gene therapy, including both efficient delivery of the therapeutic gene to the target cells and attachment to the cell membrane with following internalization and transfer to the nucleus.

Magnetofection is one of the most effective physical gene delivery methods based on the increased delivery and concentration of nucleic acids coupling superparamagnetic iron oxide particles (SPION) onto the cell surface by the influence of an external magnetic field.

In the static magnetic field generated by permanent magnets the movement of SPION in solution is axial towards the magnet. The time-phase varied magnetic field which is generated with the magnetofection device DynaFECTOR is based on the orbital rotation of the permanent magnets plate in the parallel plane of the cell culture plate.

In the result of computer modelling it was shown that the orbital rotation of magnets causes the axial-lateral movement of SPION in parallel and perpendicular plane against the magnet. This led to the more uniform distribution of SPION onto the surface and could be a cause of the enhanced SPION-nucleic acids complexes internalization.

In this study the influence of the time-phase varied magnetic field on the delivery efficiency of SPION-nucleic acids-liposomal component complexes into the cancer cells was experimentally investigated.

Obtained results showed that in the time-phase varied magnetic field the SPION sedimentation onto the surface is more uniform and the amount of internalized SPION increases when compared to static magnetic field. Under the influence of the time-phase varied magnetic field, the delivery of SPION-nucleic acids-liposomal component complexes also increases, as evidenced by the significant increase in both the number of transfected cells and the total amount of an expressed protein in transfected cells in comparison with other gene delivery methods. While SPION-nucleic acids-liposomal component complexes delivery into the cells with less cytotoxic effect is provided by more uniform sedimentation onto the surface.

In this study enhanced effective gene delivery method – the liposomal magnetofection in the time-phase varied magnetic field is reported. The method could be used for the replacement of mutated genes and for the investigation of the inhibition effect of novel therapeutic siRNAs *in vitro* cell lines. The method could potentially used also for the therapeutic gene delivery into the cancer cells *in vivo*.

# SATURS

ANOTĀCIJA.....	2
ANNOTATION.....	3
DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI .....	5
IEVADS .....	8
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	12
1.1. Gēnu terapijas attīstība un pielietojums vēža terapijā .....	12
1.2. Gēnu terapijas stratēģijas, terapeitisko gēnu veidi .....	13
1.3. Terapeitisko gēnu piegādes metodes .....	13
1.3.1. Vīrusu gēnu piegādes metodes.....	14
1.3.2. Bezvīrusu gēnu piegādes metodes .....	15
1.3.2.1. Ķīmiskās gēnu piegādes metodes .....	16
1.3.2.2. Fizikālās gēnu piegādes metodes .....	17
2. MATERIĀLS UN METODEDES .....	36
2.1. Materiāls .....	36
2.1.1. Šūnu līnijas.....	36
2.2. Metodes.....	36
2.2.1. SPION sedimentācijas profila noteikšana.....	38
2.2.2. Plazmīdu DNS iegūšana .....	38
2.2.3. Transfekcija ar plazmīdu DNS un siRNS .....	39
2.2.4. Transgēna ekspresijas detekcija un analīze.....	43
2.2.5. Citotoksicitātes noteikšana.....	45
2.2.6. Dzelzs satura noteikšana šūnās .....	46
2.2.7. Datu statistiskā analīze.....	47
3. REZULTĀTI .....	48
3.1. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz SPION sedimentāciju .....	48
3.2. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz gēnu piegādi vēža šūnās .....	48
3.2.1. LM LFV – reakcijas optimālie apstākļi .....	48
3.2.2. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz nukleīnskābju piegādes efektivitāti šūnās .....	55
3.2.3. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka pielietojuma citotoksiskais efekts .....	62
3.3. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekme uz SPION piegādes efektivitāti vēža šūnās .....	63
DISKUSIJA .....	66
SECINĀJUMI .....	72
IZMANTOTĀ LITERATŪRA .....	73
PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU .....	81
PATEICĪBAS .....	83
PIELIKUMI.....	84

## DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

SAĪSINĀJUMS	SKAIDROJUMS ANĢĻU VALODĀ	SKAIDROJUMS LATVIEŠU VALODĀ
<b>9L</b>	<i>Rattus norvegicus brain glioma cell line</i>	<i>Rattus norvegicus</i> smadzeņu gliomas šūnu līnija
<b>A549</b>	<i>human lung adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka plaušu adenokarcinomas šūnu līnija
<b>AAV</b>	<i>adeno asociated virus</i>	adenoasociētais vīruss
<b>ADA-SCID</b>	<i>adenosine deaminase severe combined immunodeficiency</i>	iedzimts adenozinā deamināzes trūkums, kas izraisa imūndeficītu
<b>Ag</b>	<i>silver</i>	sudrabs
<b>AO/EB</b>	<i>Acridine Orange/Ethidium Bromide staining</i>	atkrāsošana ar etīdija bromīda/akridīna oranža maisījumu
<b>ASV</b>	<i>United States of America</i>	Amerikas Savienotās Valstis
<b>Au</b>	<i>gold</i>	zelts
<b>BCL2</b>	<i>apoptosis regulator BCL-2</i>	apoptozes regulators BCL-2
<b>BIRC5</b>	<i>baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5</i>	bakulovīrusa apoptozo atkārtojumu motīva inhibitors 5
<b>BT-20</b>	<i>human breast adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka krūts adenokarcinomas šūnu līnija
<b>C6</b>	<i>Rattus norvegicus brain glioma cell line</i>	<i>Rattus norvegicus</i> smadzeņu gliomas šūnu līnija
<b>Caco-2</b>	<i>human colorectal adenocarcinoma</i>	cilvēka kolorektālās adenokarcinomas šūnu līnija
<b>CAPAN-2</b>	<i>human pancreas adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka aizkuņģa dziedzera adenokarcinomas šūnu līnija
<b>CM</b>	<i>CombiMAG magnetic nanoparticles</i>	<i>CombiMAG</i> magnētiskās nanodaļiņas
<b>CoO</b>	<i>cobalt oxide</i>	kobalta oksīds
<b>Cos7</b>	<i>African green monkey kidney fibroblast-like cell line</i>	Āfrikas zaļā pērtiķa nieru fibroblastu šūnu līnija
<b>DEAE-DEXTRAN</b>	<i>diethylaminoethyl dextrane</i>	dietilaminoetildekstrāns
<b>DNS</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>	dezoksiribonukleīnskābe
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>	Dulbeko fosfātbufferis
<b>E. Coli</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (zarnu nūjiņa)
<b>ECFP-ERp29pDNS</b>	<i>plasmid DNA containing ECFP-ERp29 gene</i>	ECFP-ERp29 gēnu saturošas plazmīdas DNS
<b>EDTA</b>	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	etilēndiamīntetraetiķskābe
<b>EPR</b>	<i>enhanced permeability and retention effect</i>	pastiprinātas caurlaidības un aiztures efekts
<b>ES</b>	<i>European Union</i>	Eiropas Savienība
<b>FBS</b>	<i>fetal bovine serum</i>	teļa embrionālais serums
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug administration</i>	Pārtikas un zāļu pārvalde
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	<i>ferrum (II) ion</i>	dzelzs (II) jons
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	<i>ferrum (III) ion</i>	dzelzs (III) jons

<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	<i>magnetite</i>	magnetīts
<b>FIX</b>	<i>fixative</i>	fiksatīvs
<b>GM-CSF</b>	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>	granulocītu-makrofāgu koloniju stimulējošais faktors
<b>HeLa</b>	<i>human cervix adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka dzemdes kakla adenokarcinomas šūnu līnija
<b>HEPG2</b>	<i>human hepatocellular adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka hepatocelulārās adenokarcinomas šūnu līnija
<b>HER-2/neu</b>	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>	cilvēka epidermālā augšanas faktora receptors 2
<b>HPRT</b>	<i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	hipoksantīna-guanīna-fosforiboziltransferāze
<b>IL-12</b>	<i>interleukin-12</i>	interleikīns-12
<b>Jurkat</b>	<i>human acute T cell lymphoma cell line</i>	cilvēka akūtas T šūnu limfomas šūnu līnija
<b>L</b>	<i>lipofection</i>	lipofekcija
<b>L siRNS</b>	<i>co-lipofection with siRNA</i>	ko-lipofekcija ar siRNS
<b>LacZpDNS</b>	<i>plasmid DNA containing LacZ gene</i>	LacZ gēnu saturošas plazmīdas DNS
<b>LB</b>	<i>Luria Bertrani medium</i>	<i>Luria Bertrani</i> barotne
<b>LIP</b>	<i>Lipofectamine2000 transfection reagent</i>	<i>Lipofectamine2000</i> transfekcijas reaģents
<b>LM</b>	<i>liposomal magnetofection</i>	liposomālā magnetofekcija
<b>LM LFV</b>	<i>liposomal magnetofection in time-varied magnetic field</i>	liposomālā magnetofekcija laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā
<b>LM LFV siRNS</b>	<i>co-liposomal magnetofection in time-varied magnetic field with siRNA</i>	ko-liposomālā magnetofekcija laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā ar siRNS
<b>LM siRNS</b>	<i>co-liposomal magnetofection with siRNA</i>	ko-liposomālā magnetofekcija ar siRNS
<b>LS-174T</b>	<i>human colorectal adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka kolorektālās adenokarcinomas šūnu līnija
<b>miRNS</b>	<i>micro ribonucleic acid</i>	mikro ribonukleīnskābe
<b>mRNS</b>	<i>messenger ribonucleic acid</i>	matricas ribonukleīnskābe
<b>NCI-H441</b>	<i>human lung adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka plaušu adenokarcinomas šūnu līnija
<b>NCTC 1469</b>	<i>mouse hepatoma cell line</i>	peļu hepatomas šūnu līnija
<b>NdFeB</b>	<i>neodymium-iron-boron</i>	neodīms-dzelzs-bors
<b>NM23-H1</b>	<i>tumor metastasis suppressor NM23-H1</i>	audzēja metastāžu supresors NM23-H1
<b>OTD</b>	<i>ornithine transcarbamylase deficiency</i>	ornitīna transkarbamilāzes trūkums
<b>p53</b>	<i>tumor suppressor proreïn p53</i>	audzēja supresorproteīns p53
<b>PAMAM DENDRIMERS</b>	<i>polyamidoamine dendrimers</i>	poliamidoamīna dendrimēri
<b>PB</b>	<i>Prussian blue staining</i>	prūšu zilā atkrāsošanas metode
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>	fosfātbuferis
<b>PC3</b>	<i>human prostate adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka prostatas karcinomas šūnu līnija

<b>pcDNA3.1<sup>TM</sup>/His/LacZ</b>	<i>mammalian expression vector containing LacZ gene coding for enzyme <math>\beta</math>-galactosidase</i>	B-galaktozidāzes ekspresiju kodējošs LacZ gēnu saturošs vektors ekspresijai zīdītāju šūnās
<b>pDNS</b>	<i>plasmid DNA</i>	plazmīdas DNS
<b>pECFP-ERp29</b>	<i>mammalian expression vector containing ECFP-ERp29 gene coding for fusion enhanced cyan fluorescent protein-endoplasmatic reticulum protein 29</i>	sapludinātā zaļi fluorescējošā proteīna-endoplazmatiskā tīkla proteīna 29 ekspresiju kodējošs ECFP-ERp29 gēnu saturošs vektors ekspresijai zīdītāju šūnās
<b>PEG</b>	<i>polyethylene glycol</i>	polietilēnglikols
<b>PEI</b>	<i>polyethylenimine</i>	polietilēnimīns
<b>PLL</b>	<i>poly-L-lysine</i>	polilizīns
<b>PSMA</b>	<i>prostate specific membrane antigen</i>	prostatas specifiskais membrānas antigēns
<b>PVA</b>	<i>polyvinyl alcohol</i>	polivinilspirts
<b>RNS</b>	<i>ribonucleic acid</i>	ribonukleīnskābe
<b>SDS-PAGE</b>	<i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>	nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gela elektroforēze
<b>SiO<sub>2</sub></b>	<i>silicon dioxide</i>	silīcija dioksīds
<b>siRNS</b>	<i>small interference ribonucleic acid</i>	mazā interferences ribonukleīnskābe
<b>SKOV-3</b>	<i>human ovary adenocarcinoma cell line</i>	cilvēka olnīcas adenokarcinomas šūnu līnija
<b>SN</b>	<i>standard deviation</i>	standartnovirze
<b>SPION</b>	<i>superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i>	superparamagnētiskā dzelzs oksīda nanodaļiņa
<b>TNF</b>	<i>tumor necrosis factor</i>	tumora nekrozes faktors
<b>X-SCID</b>	<i>X-linked severe combined immunodeficiency</i>	ar X hromosomu saistīts smags kombinēts imūndeficīts
<b><math>\alpha</math>-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	<i>hematite</i>	hematīts
<b><math>\gamma</math>-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<i>maghemite</i>	maghemīts

## IEVADS

### Tēmas aktualitāte un problēmas nostādne

**Vēzis** ir nekontrolēta šūnu augšana, kas rodas vairāku gēnu somatisku mutāciju un epiģenētisku 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 hidrofilitātes dēļ (*Jafari et al., 2012*). Gēnu piegādes iznākums ir tieši atkarīgs no izvēlētas 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 piemītošās 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 mutaģenēzes risks, kas var



novest pie onkogēnu aktivācijas, kā arī nejauša 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 sekvences un tiem ir zema imunogenitāte (*Ruß 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 (*Fralely 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, temperatūrā 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 necaurļaidīgu molekulu, un šāda pieeja vienlaicīgi paaugstina gan gēnu piegādes kinētiku, 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 variējoša magnētiskā lauka, kas tiek ģenerēts ar magnetofekcijas iekārtas *DynaFECTOR* palīdzību, pamatā ir permanentu magnētu plates orbitāla rotācija šūnu kultūrai paralēlā plaknē. Datormodelēšanas rezultātā tika noskaidrots, ka laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē notiek SPION aksiāli laterāla kustība. Tā 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*.

## **Promocijas darba struktūra un autora personīgais ieguldījums**

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā uz 86 lpp. un sastāv no šādām sadaļām: ievads, literatūras apskats, metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, publikāciju saraksts, pateicības, izmantotā literatūra un pielikums. Promocijas darbs satur 29 attēlus un 14 tabulas.

Autore patstāvīgi veikusi visu eksperimentālo darbu, kā arī patstāvīgi apkopojusi un analizējusi rezultātus un veikusi datu statistisko analīzi.

Pētījums izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā laikā no 2010.–2013. gadam.

## **Pētījuma finansējuma avoti**

1. ESF projekts “Jaunas starpnozaru zinātniskās grupas izveide uz nanotehnoloģijām bāzētu pieeju izstrādei šūnu bioloģijā ar pielietojumu medicīnā”, vienošanās Nr. 2009/0221/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/074.
2. ESF projekts “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē”, vienošanās Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Gēnu terapijas attīstība un pielietojums vēža terapijā

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

**Gēnu terapija** ir terapijas veids, kas balstīts uz viena vai vairāku gēnu vai gēnu fragmentu, kas kodē normālus, funkcionālus proteīnus ievadīšanu pacienta šūnu ģenētiskajā materiālā ar mērķi modificēt 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*).

Praktiskās gēnu terapijas pirmsākumi datējami ar 20. gs. 40. gadiem, kad *Avery, McLeod* un *McCarty* eksperimentāli demonstrēja baktēriju *Pneumococcus* transformāciju ar DNS. Pirmo reizi DNS ievadīšana eikariotu šūnās tika aprakstīta 1962. gadā, kad *Szybalska* un *Szybalski* publicēja rezultātus par HPRT kodējoša gēna pārneši cilvēka kaulu smadzeņu šūnu mutantos, kas zaudējuši HPRT aktivitāti. Līdz ar šiem pētījumiem sākās strauja gēnu terapijas virziena attīstība un 60. gados oficiāli tika formulēta “gēnu terapijas”, tolaik “gēnu ķirurģijas” koncepcija tādu slimību ārstēšanai, kuras izraisa bojājumi gēnos (*Tatum, 1966*). 1990. gadā ASV FDA apstiprināja pirmo gēnu terapijas izmēģinājumu pacientei ar ADA-SCID – iedzimtu adenoziņa deamināzes trūkumu, kas izraisa imūndeficītu (*Blaese et al., 1995*). Drīz pēc tam 1992. gadā *Rosenberg* ar līdzautoriem ziņoja par pirmo gēnu terapijas izmēģinājumu vēža slimniekiem. Terapijas ietvaros metastātiskas melanomas slimniekiem tika injicēti *ex vivo* modificēti TNF ekspresējoši, tumoru infiltrējoši limfocīti. Veicot ādas paraugu analīzi injekciju vietās pēc trim nedēļām, tajās netika atrastas audzēja šūnas. Pēc 10 gadiem tika apstiprināts pirmais gēnu terapijas līdzeklis *Gendicine™* (Ķīna, 2003. gads), kas bāzēts uz adenovīrusu saturošu, p53 ekspresējošu gēnu un aprobēts galvas un kakla plakanšūnu vēža slimnieku terapijai (*Pearson et al., 2004*). Pēc gada tika apstiprināts arī pirmais gēnu terapijas līdzeklis ES – *Cerepro™*, kas bāzēts uz adenovīrusu saturošu, timīna kināzi ekspresējošu gēnu un aprobēts gliomas slimnieku terapijai (*Osborne, 2008*).

Pēdējos gados gēnu terapijas pielietojums vēža ārstēšanā arvien pieaug un turpinās jaunu pretvēža preparātu izstrādi. Pēc jaunākajiem datiem, vairāk kā 60% no visiem uzsāktajiem klīniskajiem gēnu terapijas izmēģinājumiem ir saistīti tieši ar vēža terapiju (*Wirth and Ylä-Herttuala, 2014*).

Gēnu terapija pieder pie t.s. mērķterapijas. Mērķterapijas pamatā ir iedarbība uz specifiskiem, ar vēža šūnām asociētiem molekulāriem mehānismiem (pamatā receptori), tādējādi samazinot iedarbību uz veselajām šūnām un attiecīgi arī terapijas blakusefektus (*Cassidy and Schätzlein, 2004*). Turklāt, pateicoties spēcīgai amplifikācijas kaskādei (no dažām nukleīnskābju molekulām gēnu ekspresijas rezultātā iespējams iegūt ievērojamu daudzumu terapeitisko proteīnu), iespējams panākt augstu terapeitisko efektu.

## **1.2. Gēnu terapijas stratēģijas, terapeitisko gēnu veidi**

Izšķir vairākas gēnu terapijas stratēģijas. Tā var būt tieša terapeitisko gēnu ietekme, inhibējot vēža šūnu augšanu, apgrūtinot vēža vaskularizāciju un veicinot vēža šūnu bojāeju, vai arī netieša ietekme, kas izpaužas kā imūnsistēmas stimulācija, iedarboties uz konkrētām mērķa šūnām (*Palmer et al., 2003; Tangney et al., 2006*). Mutēto gēnu var atjaunot, pievienojot tam funkcionāla gēna kopiju, aizstāt ar normālu gēnu vai inhibēt tā ekspresiju. Vēža terapijai vispiemērotākie ir gēnu ekspresijas inhibitori. Tā ir plaša terapeitisko gēnu grupa, kuras funkcija ir mutētā gēna transkripcijas inhibēšana, iedarbojoties uz mRNS (*Zhang et al., 2012*). Pie tiem pieder antisēna oligonukleotīdi, kas inaktivē mutēto gēnu, hibridizējoties ar mutētā gēna mRNS; siRNS un miRNS, kas nomāc mutēto gēnu ekspresiju (klusināšana), izraisot mRNS sadalīšanos, un ribozīmi – katalītiskas RNS, kas šķeļ mērķa mRNS sekvenču specifiskā veidā. Terapeitisko gēnu piegāde mērķa šūnās notiek ar nesēju jeb vektoru palīdzību. Pamatā gēnu piegādes vektori ir rekombinantās plazmīdas DNS (pDNS) formā. Rekombinantu pDNS sastāv no divām komponentēm: prokariotiskas, kas satur antibiotiku rezistenci un plazmīdas replikāciju regulējošus gēnus un eikariotiskas, kas satur transgēnu/-s un tā ekspresiju regulējošas sekvenču. Jaunākajos pētījumos aprakstīta gēnu piegāde izmantojot DNS minisfēras un lineārus, kovalenti slēgtus DNS minivektorus – struktūras, kas nesatur prokariotiskās sekvenču. Šāda vektora struktūra paaugstina gan ekstracelulāro, gan intracelulāro biopieejamību un tas savukārt rezultējas paaugstinātā gēnu pārneses efektivitātē (*Mayrhofer et al., 2009; Sum et al., 2014*).

## **1.3. Terapeitisko gēnu piegādes metodes**

Gēnu piegāde ir viens no problemātiskākajiem posmiem gēnu terapijā, jo ietver ne tikai terapeitiskā gēna aizvadišanu līdz šūnām, bet arī efektīvu piesaisti šūnas membrānai ar sekojošu endocitozi un migrāciju šūnas iekšējā vidē līdz kodolam. Turklāt šo procesu apgrūstina pašu

terapeitisko līdzekļu – nukleīnskābju īpašības – sliktā difundētspēja caur šūnas membrānu to izmēru, negatīvā lādiņa un hidrofilitātes 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.

Pateicoties specifiskai un lokalizētai pieejai, ko iespējams panākt pielietojot atbilstošas vektorsistēmas – gēnu piegādes metodes, var samazināt gan nepieciešamo terapeitiskā gēna daudzumu, gan arī tā sistēmisku izplatību, tā samazinot terapijas blakusefektus. Gēnu piegādes metodes klasiski iedala vīrusu (bioloģiskās) un bezvīrusu metodēs (*Cevher et al.*, 2012).

### 1.3.1. Vīrusu gēnu piegādes metodes

Gēnu piegāde šūnās, izmantojot vīrusu vektorsistēmas, ir visbiežāk pielietotais un attīstītākais gēnu piegādes veids. Pēc *Temin* atklājuma 1961. gadā, ka vīrusu infekcijas var ierosināt ģenētiskas mutācijas saimniekšūnās, *Rogers* un *Pfuderer* 1968. gadā pirmo reizi veica gēnu pārnēsī šūnās, izmantojot Tabakas mozaīkas vīrusa vektoru. 1984. gadā tika izstrādāta pirmā retrovīrusu vektorsistēma gēnu piegādei zīdītāju šūnās (*Cepko et al.*, 1984) un pēc vairākiem gadiem veikti arī pirmie gēnu terapijas klīniskie izmēģinājumi, izmantojot retrovīrusu vektorus. Vīrusiem piemītošās 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 instrumentiem (*Mulligan*, 1993). Literatūrā plaši aprakstīts adenovīrusu (*Palmer et al.*, 2002), AAV (*Hareendran et al.*, 2013), retrovīrusu (*Tai and Kasahara*, 2008), lentivīrusu (*Durand and Cimorelli*, 2011), *Herpes simplex* vīrusa (*Glorioso*, 2014), *Vaccinia* ģints vīrusu (*Puhmann et al.*, 2000), bakulovīrusu (*Makkonen et al.*, 2015) un Epšteina Barra vīrusa (*Hellebrand et al.*, 2006) kā gēnu piegādes vektoru pielietojums. Uz adenovīrusu bāzes konstruētie ir vieni no efektīvākajiem un visbiežāk pielietotajiem vīrusu vektoriem gēnu

piegādē, galvenokārt pateicoties to tropismam pret dažādu veidu šūnām un spējai pārnest relatīvi lielus ģenētiskā materiāla fragmentus. Neskatoties uz to, tiem tāpat kā citiem vīrusu vektoriem 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 nejauša infekciozu vīrusa daļiņu veidošanās (Lachmann and Davies, 1997; Thrasher *et al.*, 2006; Bushman, 2007). Ir aprakstīti gadījumi, kad pēc retrovīrusu gēnu terapijas, kas tika pielietota X-SCID slimniekiem attīstījās leukēmija (Kohn *et al.*, 2003; Marshall 2003). 1999. gadā pēc adenovīrusu saturoša vektora gēnu terapijas uzsākšanas OTD sindroma ārstēšanai iestājās pacienta nāve, ko izraisīja masīva imūnās atbildes reakcija uz adenovīrusu (Hollon, 2000). Pēc šī gadījuma tika apstādināta vairāku desmitu uz vīrusiem bāzētu gēnu terapijas līdzekļu klīnisko pētījumu darbība un būtiski pieauga jaunu gēnu piegādes metožu attīstība.

### 1.3.2. Bezvīrusu gēnu piegādes metodes

Vienkāršākais bezvīrusu gēnu piegādes veids ir nukleīnskābju piegāde šūnās bez vektora. Taču šāda nukleīnskābe ir neaizsargāta un pakļauta mononukleāro fagocītu ietekmei pirms nonākšanas mērķa šūnās un endonukleāžu ietekmei mērķa šūnu iekšējā vidē (Zhang *et al.*, 2012). Atkarībā no tā, kādā veidā tiek nodrošināta nukleīnskābju aizsardzība un veicināta efektīvāka gēnu pārnese mērķa šūnās, bezvīrusu gēnu piegādes metodes klasiski iedala ķīmiskās un fizikālās metodēs (Nayerossadat *et al.*, 2012). Ķīmisku pieeju pamatā ir vektori, kas nodrošina nukleīnskābju aizsardzību un piegādi enzimatisku procesu rezultātā, bet fizikāli vektori ir balstīti uz mehānisku pieeju un to pielietošanā parasti nepieciešams specifisks aprīkojums (Villemejeane and Mir, 2009). Jāpiezīmē, ka, lai sasniegtu augstāku gēnu piegādes efektivitāti un novērstu monometožu trūkumus, arvien biežāk gēnu piegādei izmanto kombinētu pieeju, kas ietver gan ķīmiskus, gan fizikālus un dažos gadījumos arī vīrusu vektorus.

Bezvīrusu vektoriem ir vairākas priekšrocības, salīdzinot ar vīrusu vektoriem. Tie ir viegli sintezējami un ekspluatējami, spēj pārnest neierobežota garuma un daudzuma kodējošās sekvences un tiem ir zema imunogenitāte (Ruß and Wagner, 2007). Taču gēnu pārneses efektivitāte, vērtējot pēc dažādiem ekspresijas rādītājiem, visām šobrīd zināmajām bezvīrusu metodēm ir būtiski zemāka salīdzinot ar vīrusiem (He *et al.*, 2010). Kamēr vīrusi šūnā iekļūst izmantojot dabiskus mehānismus, ķīmiskajiem un fizikālajiem vektoriem ir specifiski jāiedarbojas uz plazmatisko membrānu un/vai iekšējām vezikulārajām membrānām

(Luo and Saltzman, 2000). Šis trūkums kavē bezvīrusu metožu aktīvu pielietošanu klīniskajos pētījumos.

### 1.3.2.1. Ķīmiskās gēnu piegādes metodes

Ķīmiskie gēnu piegādes vektori veido visplašāko bezvīrusu gēnu piegādes grupu un pirmais literatūrā aprakstītais gadījums datējams jau ar 1965. gadu, kad *Vaheri* un *Pagano* demonstrēja mūsdienās šīm mērķim plaši pielietotā polimēra atvasinājuma DEAE-dekstrāna asistētu nukleīnskābju piegādi peļu un žurku fibroblastos. Pie ķīmiskiem gēnu piegādes vektoriem pieder gan atsevišķi savienojumi kā DEAE-dekstrāns (*Onishi et al.*, 2007), kalcija fosfāts (*Renzing and Lane*, 1995), gan arī dažādu savienojumu grupas, kā katjoniski polimēri (*Magin-Lachmann et al.*, 2004, *Luten et al.*, 2008), kas ietver PEI, PEG, PLL, čitosānu, dendrimērus u.c. Plaši pielieto arī katjoniskus lipīdus (*Wasungu and Hoekstra* 2006), kā arī proteīnus un peptīdus (*Bolhassani*, 2011; *Ahmed et al.*, 2012).

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.

Svarīgs ir veids, kā terapeitiskā nukleīnskābe tiek sasaistīta ar vektoru, lai nodrošinātu tās aizsardzību pret endonukleāžu degradatīvo ietekmi. Piemēram, katjoniski lipīdi veido sfēriskas, hidrofobas struktūras – liposomas, kur terapeitiskais gēns ir iekapsulēts lipīdu dubultslānī (*Fraleley et al.*, 1980). Liposomu formēšanās procesā lipīda pozitīvi lādētā hidrofilā daļa piesaistās nukleīnskābes ķēdes skeleta garumā, bet hidrofobās daļas, savstarpēji mijiedarbojoties, aizkavē hidrofīlās 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.

Vairāku ķīmisko vektoru (katjoniski polimēri) struktūra pieļauj to modifikācijas, piemēram, dažādu funkcionālu biomolekulu piesaisti, kas paaugstina to difundētspēju caur šūnas membrānu. Savukārt transdukcijas peptīdi ir dažādu proteīnu saimju īssekvenču (< 30 aminoskābes) peptīdi, kas spēj pastāvīgi iekļūt šūnās, iespiežoties šūnu membrānās (*Lehner et al.*, 2013).

Būtisks vektora efektivitāti raksturojošs rādītājs ir tā intracelulārā aktivitāte. PEI satur lielu skaitu protonējamo aminogrupu, kas nodrošina augstu buferizācijas kapacitāti pie jebkura vides pH un izraisa t.s. “protonu sūkņa efektu” (*Bousiff et al.*, 1995). Nonākot endosomās, PEI



ierosina pastiprinātu hlorīda jonu ieplūšanu tajās, kas savukārt ierosina ūdens ieplūšanu, lai normalizētu jonu koncentrāciju endosomu iekšējā vidē. Osmotiskā spiediena rezultātā endosomas membrāna plīst un terapeitiskais materiāls nonāk citoplazmā.

Ķīmisko gēnu piegādes vektoru, īpaši DEAE-dekstrāna, PEI un PAMAM dendrimēru galvenais trūkums ir augstā citotoksicitāte (*Moghimi et al.*, 2005; *Hunter; Lv et al.*, 2006). Savukārt citi vektori, kā kalcija fosfāts, ir ļoti jutīgi pat pret nelielām izmaiņām vides pH, temperatūrā un sāļu koncentrācijā, tāpēc ir problemātisks to pielietojums *in vivo* pētījumos.

### **1.3.2.2. Fizikālās gēnu piegādes metodes**

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). Mehānisma pamatā lielākoties ir mākslīga pagaidu poru izveidošana šūnas membrānā, kas kalpo kā dominējošais gēnu pārneses ceļš šūnas iekšējā vidē (*Alsaggar and Liu*, 2015). 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.

### **Mikroinjekcija**

Metodes pamatā ir nukleīnskābju tieša ievadīšana mērķa šūnu kodolā ar smalkas > 0,2 μm diametra adatas palīdzību (*Dean*, 2014). Mikroinjekcija ir visefektīvākā fizikālās gēnu piegādes metode, un transfekcijas efektivitāte ir pielīdzināma vīrusu gēnu piegādes iznākumam, sasniedzot 100%. Metode ir laukietilpīga un tās kapacitāte aprobežojas ar nelielu šūnu populāciju (> 500 šūnu) transficēšanu vienā pielietojuma reizē, tādēļ tā vairāk piemērota laboratoriskiem eksperimentiem vai nelielu, lokālu šūnu populāciju (piemēram, limfmezglu robežās) transficēšanai *in vivo* (*Klinghoffer et al.*, 2015).

### **Ballistiskā gēnu piegāde jeb “gēnu pistole”**

Metodes pamatā ir 1 μm lielu metāla (zelta, volframa, sudraba) mikrodaļiņu, uz kuru virsmas adsorbētas nukleīnskābes ievadīšana mērķa šūnās ar elektrostatiska spēka vai gāzes spiediena palīdzību. Ballistiskā gēnu piegāde ir piemērota dažādu, tai skaitā grūti transficējamo šūnu transficēšanai. Metodei ir potenciāls pielietojumam pretvēža vakcīnu terapijā, ko apliecina vairāku pētījumu rezultāti. Pelēm ar *Her2/neu* gēnu pārekspresējošu metastātisku melanomu

pēc *Her2/neu* saturošas DNS vakcīnas ievadīšanas novēroja strauju audzēja masas samazināšanos un palielinātu dzīvildzi (*Sun et al.*, 2006). Ballistiskās gēnu piegādes vektorsistēma nodrošina neierobežota izmēra un daudzuma nukleīnskābju pārnesi šūnās, taču jābrīnās, ka tādējādi tiek izraisīti lieli mehāniska rakstura šūnu bojājumi un līdz ar to pieaug metodes citotoksiskais efekts (*Uchida et al.*, 2009).

## Sonoporācija

Sonoporācijas pamatā ir ultraskaņas radītas ar gāzi pildītu daļiņu jeb mikropūslišu oscilācijas, kas izraisa pagaidu poru veidošanos šūnas membrānā. Šādi, paaugstinot šūnas membrānas caurlaidību, tiek veicināta nukleīnskābju pārnese šūnā (*Miller et al.*, 2002; *Delalande et al.*, 2013). Metodes efektivitāte pamatā ir atkarīga no uzstādītajiem ultraskaņas parametriem, taču ne mazāk svarīgs ir mikropūslišu sastāvs, īpaši apvalks, no kura atkarīga mikropūslišu stabilitāte un izturība pret ultraskaņas radīto spiedienu. Mikropūsliši sastāv no gāzu, piemēram, oglekļa dioksīda, sēra heksafluorīda u.c. kodola un lipīdu, polimēru vai proteīnu apvalka, kas var tikt papildināts ar virsmaktīvo vielu papildslāni (*Fan et al.*, 2014). Jaunākajos pētījumos ir aprakstīta modificēta sonoporācijas metode, mikropūslišu vietā izmantojot nanopūslišus, kas vairāk piemēroti terapeitiskiem mērķiem. Atšķirībā no mikropūslišiem, kuriem raksturīgs īss cirkulēšanas laiks un to izmēri nepieļauj ekstravazāciju no asinsrites, nanopūslišus iespējams akumulēt vēža šūnās, jo to nelielais izmērs ļauj migrēt caur audzēja asinsvadu porām (*Yin et al.*, 2012).

Šī metode ir neinvazīva un līdz ar to ar zemu citotoksicitāti, taču ir grūti reproducējama – jāņem vērā vairāki būtiski parametri, kas katrā individuālajā pētījumā ir atšķirīgi.

## Elektroporācija

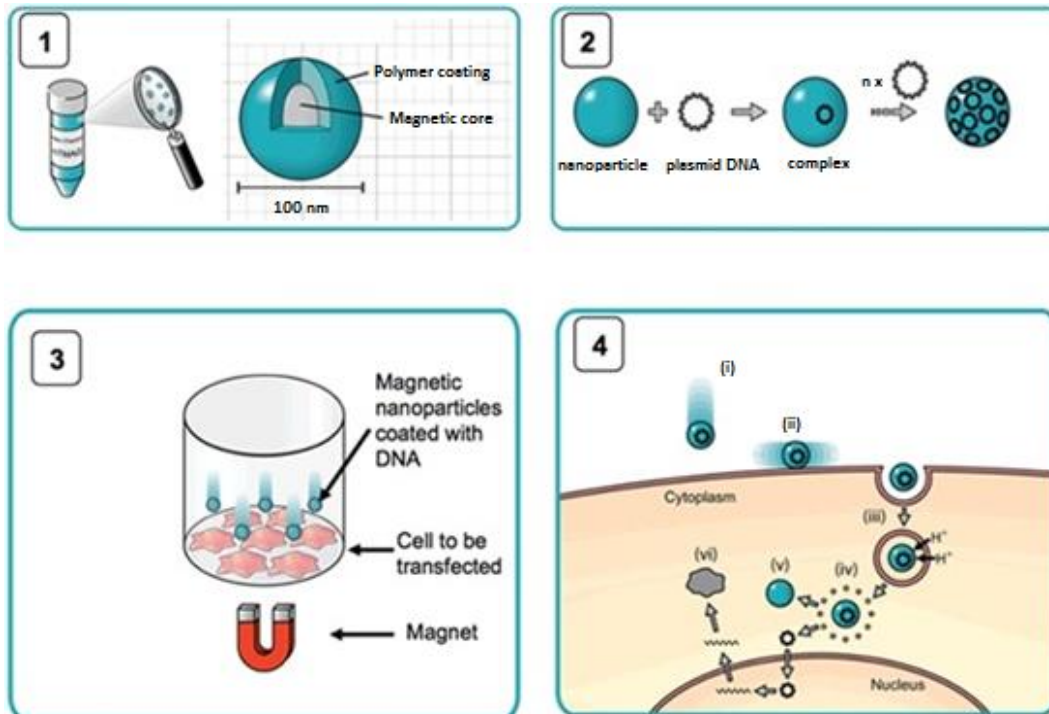
Elektroporācija ir nukleīnskābju piegāde šūnās ar elektrisku impulsu palīdzību. Elektriskie impulsi destabilizē šūnas membrānu un tajā veidojas īslaicīgas nanoizmēra poras, kā rezultātā nukleīnskābes brīvi iekļūst citoplazmā, apejot endocitozes ceļu (*Wells*, 2004). Elektroporācijas tehniku biomedicīnas pētījumos sāka izmantot pirms vairāk kā 30 gadiem, (*Neumann et al.*, 1982) un mūsdienās ir iespējams transficēt visu veidu šūnas. Pielietojot elektroporācijas metodi, iespējams panākt pat 1000-kārtīgu gēnu piegādes efektivitātes uzlabojumu (*Sardesai and Weiner*, 2011). Šīs īpašības ir priekšnosacījums elektroporācijas veiksmīgam pielietojumam vēža terapijas klīniskajos pētījumos. Ir dati par efektīvu DNS vakcīnu pielietojumu un gēnu terapijas stimulētu imunoterapiju metastātiskas melanomas

slimniekiem un prostatas vēža slimniekiem. Pastāvīga antivielu atbildes reakcija tika novērota rekurenta prostatas vēža pacientiem 18 mēnešus pēc vakcinācijas ar DNS vācīnu, kas kodē ar PSMA epitopu saistītu *tetanus* toksīna C fragmenta domēnu (Low *et al.*, 2009). Terapijas gaitā netika novērotas ne bioķīmiskas, ne hematoloģiskas izmaiņas asins rādītājos. Metastātiskas melanomas un rekurentas metastātiskās melanomas slimniekiem tika ievadīta citokīna IL-12 ekspresiju kodējoša pDNS. Biopsiju materiālā, kas tika ņemts no injekciju vietām tika konstatēts paaugstināts IL-12 proteīna līmenis, audzēja šūnu nekroze un limfocītu infiltrācija (Cha and Daud, 2012).

Elektroporācijas efektivitāti būtiski ietekmē elektriskā lauka parametri – elektriskā sprieguma svārstības un impulsu garums, kuriem jābūt sabalansētiem, lai neizraisītu neatgriezeniskus šūnas membrānas bojājumus (de Baere and Deschamps, 2014).

## Magnetofekcija

Magnetofekcijas pamatā ir ar magnētiskajām nanodaļiņām saistītu nukleīnskābju koncentrēšana uz šūnu virsmas un piegāde šūnās, izmantojot spēcīgu ārējo magnētisko lauku (1.1. att.).



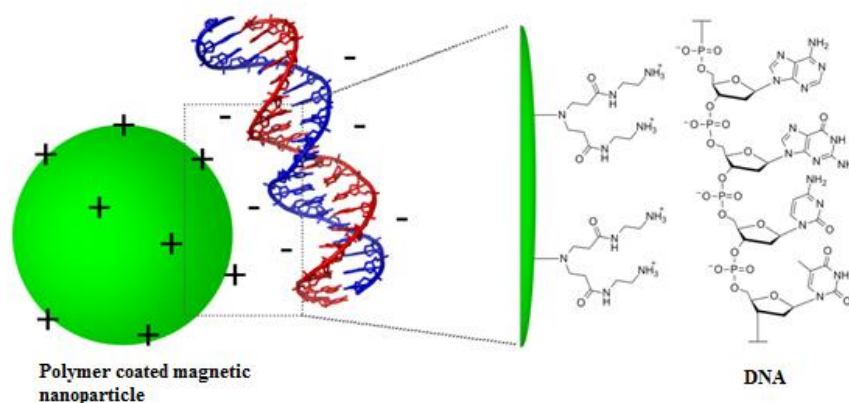
1.1. attēls. Magnetofekcijas mehānisms: (1) SPION struktūra, (2) SPION-nukleīnskābju kompleksu veidošanās, (3) SPION kompleksu piegāde uz šūnu virsmas, (4) SPION kompleksu ieslēgšana šūnās un terapeitiskā gēna ekspresija (Adaptēts no Fouriki *et al.*, 2010)

Magnetofekcijai parasti izmanto superparamagnētiskās dzelzs oksīda nanodaļiņas (SPION). Tās ir pozitīvi lādētas struktūras, kas sastāv no metālu oksīdu – magnetītu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , mehemītu  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  vai hematītu  $\alpha\text{-Fe}_3\text{O}_4$  saturoša kodola un magnētiski inerta pārklājuma (*Mahmoudi et al., 2011*). SPION kodola izmērs variē no dažiem līdz vairākiem desmitiem nanometru (dažādos literatūras avotos no  $\leq 20$  līdz  $\leq 50$ ). Kamēr kodola uzbūve nosaka daļiņu magnētiskās īpašības un ļauj manipulēt ar tām, izmantojot ārējo magnētisko lauku, no pārklājuma ir atkarīgi tādi SPION parametri kā izmērs, šķīdība, dispersijas un magnetizācijas pakāpe, koloidālā stabilitāte (*Wilhelm et al., 2003; Yin and Feng, 2005, Easo and Mohanan, 2013*). Atbilstošs pārklājums palīdz aizkavēt daļiņu agregāciju, nodrošināt vienmērīgu izkliedi un saderību ar negatīvi lādēto šūnas virsmu, tā sekmējot internalizācijas efektivitāti mērķa šūnās un samazinot citotoksicitāti (*Santhosh and Ulrih; Singh and Sahoo, 2013*). Konstatēts, ka visefektīvākais pārklājuma veids ir hidrofilī katjoniski elementi. Literatūrā ir dati par organiskas izcelsmes savienojumu (dekstrāns, PEI, PEG, PVA, čitosāns u.c.), tā arī neorganiskas izcelsmes (ogleklis, dārgmetāli (Au, Ag) un to sakausējumu, oksīdi ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CoO}$ )) elementu pielietojumu SPION pārklāšanai, kā rezultātā iespējams uzlabot magnetofekcijas efektivitāti (*Lam et al., 2013*).

Superparamagnētiskas nanodaļiņas magnetizējas tikai magnētiskā lauka iedarbībā un zaudē magnetizācijas spēju, kad magnētiskā lauka iedarbība beidzas (*Silva et al., 2007*). Superparamagnētisms ir būtisks SPION pielietošanai pētījumos *in vivo*. Šādām SPION ir daudz mazāka tendence agregēties magnētisko dipolu savstarpējās mijiedarbības dēļ un tas savukārt samazina embolizācijas risku organisma iekšējā vidē, kā arī palīdz izvairīties no strauja renālā klīrensa un deponēšanas imūnās sistēmas orgānos (*Gupta and Gupta 2005; Shubayev et al., 2009*).

Visbiežāk pielietotā SPION sintēzes tehnika ir ko-precipitācija, bet izmanto arī citas metodes, kā, piemēram, termiskā sadalīšana, mikroemulsijas, hidrotermālā sintēze u.c. Ko-precipitācijas metodes pamatā ir SPION sintēze no  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  sāļu ūdens šķīdumiem sārmainā vidē pH 8–14 (*Massart, 1981*). Sintēze notiek istabas, retāk paaugstinātā temperatūrā bezskābekļa apstākļos, lai kavētu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  oksidēšanos par  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Lai gan sintezētās daļiņas ir ar plašu izmēru amplitūdu un augstu tendenci agregēties (*Teja and Koh, 2009*) metode ir ātra, ekonomiska un ar augstu produktīvo iznākumu (*Laurent et al., 2008, Stephen et al., 2011*).

Ar negatīvi lādētajām nukleīnskābēm SPION saistās elektrostatisks mijiedarbības rezultātā, veidojot stabilus kompleksus (1.2. att.).



1.2. attēls. SPION-nukleīnskābes kompleksa veidošanās princips  
(Adaptēts no *Dennig and Duncan, 2002*)

Pielietojot magnētisko lauku, iespējams vieglāk pārvarēt šķīduma difūzijas barjeru un paātrināti koncentrēt jaunizveidotos kompleksus uz šūnu virsmas (*Mykhaylyk et al., 2009b; 2010*), kur tie šūnās tiek ieslēgti endocitozes vai makropinocitozes ceļā. Tā pie identiskas koncentrācijas šķīdumā noteiktā laika intervālā uz šūnu virsmas un pēc tam arī šūnā nonāk vairāk kompleksu, kas rezultējas paaugstinātā transfekcijas efektivitātē (*Gersting et al., 2004; Plank et al., 2011*). Šī īpatnība ir būtiska pielietojumam šūnās, kas ir jutīgas pret transfcēšanu, jo ļauj sasniegt augstu transgēnu ekspresijas līmeni, pielietojot samazinātu terapeitiskā līdzekļa devu un saīsinot ekspozīcijas periodu (*Krötz et al., 2003*).

Magnetofekcija ir salīdzinoši jauna metode, kas pirmo reizi aprakstīta 2002. gadā (*Scherer et al., 2002*), lai gan pētījumi par terapeitisko līdzekļu piegādi šūnās, izmantojot magnētisko lauku, aizsākās jau vairāk kā 40 gadus atpakaļ, kad *Widder* publicēja rezultātus par magnētisku mikrosfēru sintēzi pretvēža terapeitisko līdzekļu piegādei.

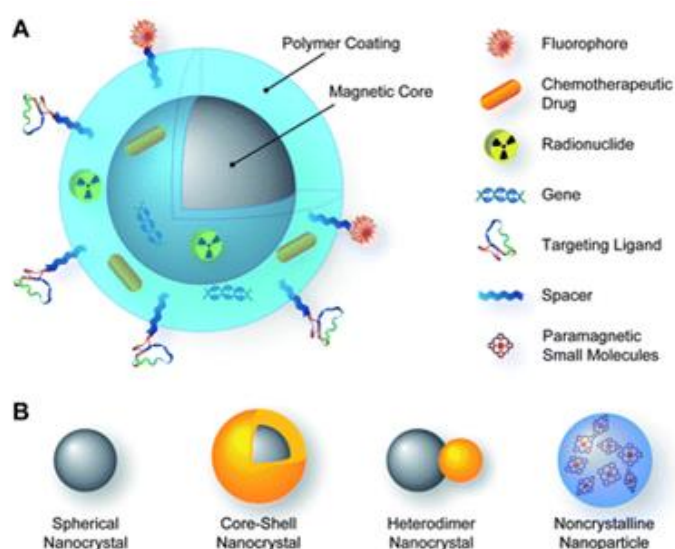
Magnetofekcija ir viena no šobrīd perspektīvākajām gēnu piegādes metodēm un tās efektivitāte pēc atsevišķu transgēnu ekspresijas rādītājiem var sasniegt vairākus tūkstošus reižu (*Scherer et al., 2002*). Tā ir efektīvāka gēnu piegādes metode dažādās vēža šūnu līnijās, salīdzinot ar ķīmiskajām gēnu piegādes metodēm (*Li et al., 2008; Liu et al., 2012*), īpaši lipofekciju (*Xiang et al. 2003; Xenariou et al., 2006; Yang et al., 2007; Kievit et al., 2010*) un fizikālajām gēnu piegādes metodēm, piemēram, elektroporāciju (*Prosen et al., 2014*).

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 atšķirībā no ballistiskās gēnu piegādes, kas skar tikai virsējos šūnu slāņus (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. Optimizējot šos parametrus, iespējams paaugstināt magnetofekcijas efektivitāti.

Nemot vērā SPION uzbūves īpatnības, kuru pamatā ir liela virsmas laukuma attiecība pret tilpumu, kā arī pozitīvi lādēto kompleksu potenciālo mijiedarbību ne tikai ar negatīvi lādēto šūnas membrānu, bet arī ar negatīvi lādētajiem ekstracelulārā matricsa proteīniem, viena no stratēģijām ir SPION funkcionalizācija (1.3. att.).



1.3. attēls. Multifunkcionāla SPION  
(Adaptēts no Fang and Zhang, 2009)

Lai uzlabotu SPION-terapeitisko gēnu piegādi vēža šūnās, tām var piesaistīt mērķēšanas ligandus. Antivielas, aptamēri u.c. biomolekulas nodrošina SPION atpazīstamību mērķa šūnās un līdz ar to efektīvāku mijiedarbību ar tām (Mahmoudi *et al.*, 2014).

Lai nodrošinātu SPION-terapeitisko gēnu optisku detektējamību, bieži vien tiek pielietota kombinēta pieeja, kompleksi pievienojot fluorohromus (Bumb *et al.*, 2010).

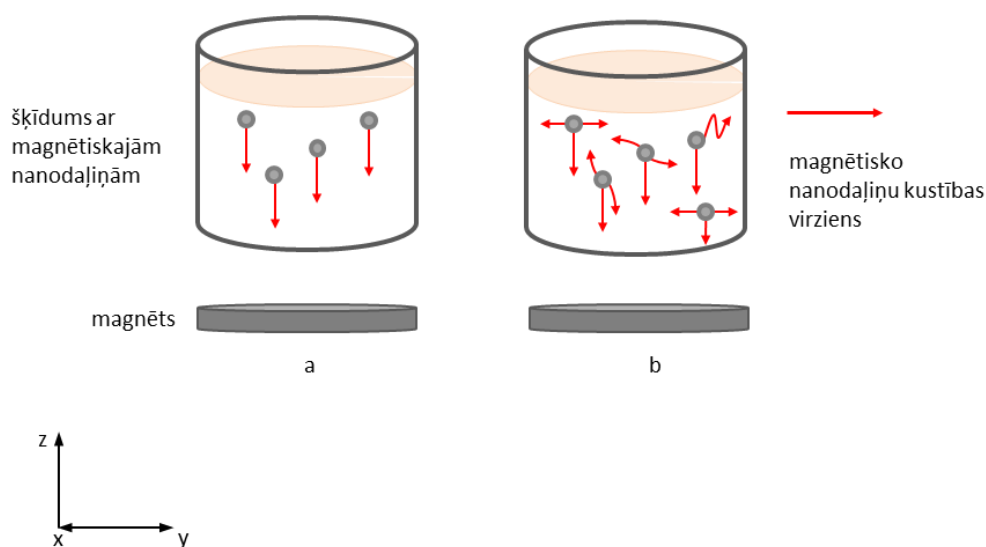
Literatūrā plaši aprakstīta SPION-ķīmijterapijas līdzekļu piegāde audzēju šūnās (Wilson *et al.*, 2004, Gautier *et al.*, 2012).

SPION kā nanoizmēra vektorus ūdens vai organiskos ne-magnetizētos nesējos (ferrošķīdumos) būtiski ietekmē dažādi vides fizikāli procesi – difūzija, šķīduma plūsma un permeācija (Luo and Saltzman 2000; Plank *et al.*, 2003). Pierādīts, ka vides pretestības spēks korelē ar SPION nosēdināšanas ātrumu (Babincova and Babinec, 2009). Turklāt šajā pētījumā tika konstatēts, ka 50 nm lielu SPION pārvietošanās ātrumu var palielināt, paaugstinot

magnētiskā lauka intensitāti, kā arī izmainot magnētu konfigurāciju, proti, permanentus magnētus aizvieto ar elektromagnētiem, kas ģenerē pulsējošo magnētisko lauku. Līdzīgu pētījumu izstrādājis *Krafčik* ar līdzautoriem, modelējot magnētisku aerosolu piegādi plaušās ar kvadripolāru permanentu magnētu sistēmas *Hallbach* palīdzību. Rezultātā tika konstatēts, ka magnētiskais spēks būtiski prevalē pār citiem faktoriem, veicinot ātru SPION sedimentāciju, pie kam SPION sedimentācijas trajektorijā netika konstatētas nozīmīgas izmaiņas aerodinamisko un gravitācijas spēku ietekmē, kas radās elpošanas simulācijas rezultātā. Citā pētījumā, palielinot magnētiskā lauka intensitāti no 150 mT līdz 350 mT, tika samazināta SPION agregācija un pieauga akumulācija gliomas šūnās (*Chertok et al.*, 2011).

Zināms, ka magnētiskā lauka indukcijas vērtību būtiski ietekmē attālums no magnēta. Modelējot magnētiskā lauka amplitūdu un gradientu tipiskam cilindriskas formas permanentam NdFeSm magnētam ( $d = 2 \text{ cm}$ ,  $h = 1 \text{ cm}$ ), tika konstatēts, ka magnētiskā lauka indukcija un līdz ar to arī magnētiskā spēka vērtība krītas par 25% no maksimālās vērtības jau 1 cm attālumā no magnēta virsmas, (*Schwerdt et al.*, 2012).

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 (1.4. att. (a)). 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 (1.4. attēls (b)).



1.4. attēls. SPION kustība šķīdumā virzienā pret magnētu statiskā magnētiskajā laukā (a) un cita veida ne statiskos magnētiskajos laukos (b)

Pulsējošs magnētiskais lauks, kura pamatā ir pastāvīga sinusveida viļņa iedarbība uz šūnām perpendikulārā plaknē, kas izraisa SPION svārstības paralēli un perpendikulāri virsmai ar atšķirīgu svārstību amplitūdu, pirmo reizi aprakstīts *Kamau* grupas pētījumā. Pielietojot vēža šūnu līnijās, visaugstākā reportējošā gēna ekspresija tika sasniegta, secīgi kombinējot statisko un pulsējošo magnētisko lauku. Autori pieļauj, ka SPION pārvietošanos caur šūnas membrānu sekmē statiskā un pulsējošā magnētiskā lauka radītās aksiālas, laterālas un papildus oscilējošas daļiņu kustības. Iedarbojoties uz adherentajām šūnu kultūrām ar pulsējošu magnētisko lauku, kura pamatā ir īsu (milisekundes), atkārtotu impulsu ģenerēšana, iespējams panākt divkārtīgu transgēna ekspresijas paaugstināšanos; novērotas transfekcijas efektivitātes izmaiņas atkarībā no magnētiskā lauka stiprums un pulsu skaita (*Chen et al.*, 2009). *McBain* ar līdzautoriem izstrādājuši oscilējošās magnetofekcijas metodi, kuras pamatā ir SPION kustība ne tikai aksiālā, bet arī laterālā virzienā, ko nodrošina zemas frekvences svārstību ģenerēšana x-y plaknē (*McBain et al.*, 2008). Ar metodes palīdzību iespējams ievērojami paaugstināt reportējošo gēnu ekspresijas rādītājus dažādās grūti transficējamās šūnu līnijās, piemēram, elpceļu epiteliālajās šūnās, primārajos astrocītos (*Pickard and Chari*, 2010; *Tickle et al.*, 2015), žurku oligodendrocītu prekursoru šūnās (*Jenkins et al.*, 2011), neirālajās cilmes šūnās (*Adams et al.*, 2013), salīdzinot ar konvencionālajām metodēm. Būtiski, ka oscilējošā magnētiskā lauka pielietojums neietekmē šūnu dzīvotspēju un proliferāciju (*Jenkins et al.*, 2011). Autoru novērojums, ka neirosfēru kultūrās, kuras tika pakļautas oscilējošajām svārstībām, šūnu plazmatiskās membrānas ir ar izteiktāku "krokojumu", salīdzinot ar neapstrādātām kultūrām noveda pie hipotēzes, ka oscilējošā magnētiskā lauka iedarbība izraisa lielāku šūnas membrānas kairinājumu tā, iespējams, stimulējot endocitozi.

*Dahmani* grupa aprakstījusi magnētu sistēmu, kas sastāv no diviem permanentiem magnētiem, starp kuriem ievietota šūnu kultūra. Šo magnētu rotācijas kustības ietekmē pie noteiktas magnētiskās indukcijas tika ģenerēti impulsi līdz pat 400 apgr./min. Rezultātā reportējošā gēna ekspresija suspensiju šūnu līnijā šī magnētiskā lauka ietekmē, salīdzinot ar konvencionālajām metodēm, paaugstinājās 1,7–1,9 reizes, kas ir būtisks rādītājs, jo vairums suspensiju šūnu līniju ir praktiski netransficējamās. Autori pieļauj, ka rotējošo magnētu radītie spēki, kas uz SPION iedarbojas x-y plaknē izraisa to laterālu kustību, tā palielinot saskari ar šūnām. *Hajiani* un *Larachi* pētījumā aprakstītas SPION molekulārā transporta īpatnības statiskā, oscilējošā un rotējošā magnētiskā lauka ietekmē. Pētot daļiņu izkliedi šķīdumā vidēja stipruma zemu frekvenču magnētisko lauku iedarbībā, autori konstatējuši, ka permanentais un rotējošais magnētiskais lauks ietekmē to laterālo difūziju, atšķirībā no oscilējošā magnētiskā lauka, kam netika konstatēta ietekme uz SPION laterālo difūziju. Interesanti rezultāti iegūti



analizējot SPION strukturālo izvietojumu šķīdumā dažādu magnētisko lauku ietekmē. Konstatēts, ka rotējošā magnētiskā lauka iedarbībā SPION veido apaļas formas virpuļveida struktūras, kamēr oscilējošā un statiskā magnētiskā lauka iedarbībā – lineāras, kvazistatiskas struktūras (Gravel *et al.*, 2015).

SPION kompleksu internalizācijas efektivitāti šūnās galvenokārt ietekmē to izmērs, ņemot vērā to, ka tipisks endosomu izmērs klatrīnmediētas endocitozes gadījumā ir 100 nm un attiecīgi kaveolu mediētas endocitozes gadījumā 50–80 nm (Bareford and Swaan, 2007). Ir pierādīts, ka SPION, kuru izmēri nepārsniedz 200 nm ieslēgšana šūnās notiek klatrīna vai kaveolu mediētas endocitozes ceļā, savukārt makropinocitoze ir dominējošais ceļš > 500 nm lielām SPION (Rejman *et al.*, 2004; Prijic *et al.*, 2010). Jāpiezīmē, ka bieži SPION kompleksu ieslēgšanas procesā vienlaicīgi iesaistīti vairāki endocitotiskie mehānismi (Hillaireau and Couvreur, 2009) un endocitozes ceļš ir tieši atkarīgs no mērķa šūnu veida (Huth *et al.*, 2004). Endocitozes iznākumu magnetofekcijas rezultātā ietekmē arī tādi faktori kā SPION forma un zeta potenciāls – lādiņš. Piemēram, šūnās tiek efektīvāk ieslēgtas sfēriskas formas SPION, salīdzinot ar stienīšveida vai diskveida SPION (Chithrani *et al.*, 2006; Muro *et al.*, 2008). Pozitīvi lādētas SPION parasti tiek labāk ieslēgtas, salīdzinot ar neitrāli lādētām SPION, tāpat kā katjoniskas SPION salīdzinot ar anjoniskām (Huang *et al.*, 2010).

Audzēju šūnu membrānu īpatnības ir būtisks faktors SPION transporta nodrošināšanā, ņemot vērā to, ka malignizācijas procesa rezultātā tiek izmainīta membrānu veidojošā lipīdu slāņa struktūra, lai pielāgotos hipoksijas un pastiprināta metabolisma apstākļiem (Sincai *et al.*, 2005; Yameen *et al.*, 2014). Tāpēc ļaundabīgām šūnām piemīt augstāks endocitozes potenciāls salīdzinājumā ar normālām šūnām.

Magnetofekcija ir aprobēta pielietojumam *in vitro* dažādās, tai skaitā ļoti grūti transficējamās šūnu līnijās, *ex vivo* (Svingen *et al.*, 2009) un *in vivo* pētījumos.

Nozīmīgi ir RNS interferences pētījumi, ņemot vērā siRNS potenciālu audzēju ģenēzes procesos iesaistīto gēnu ekspresijas inhibēšanai pat viena oligonukleotīda mutācijas robežās.

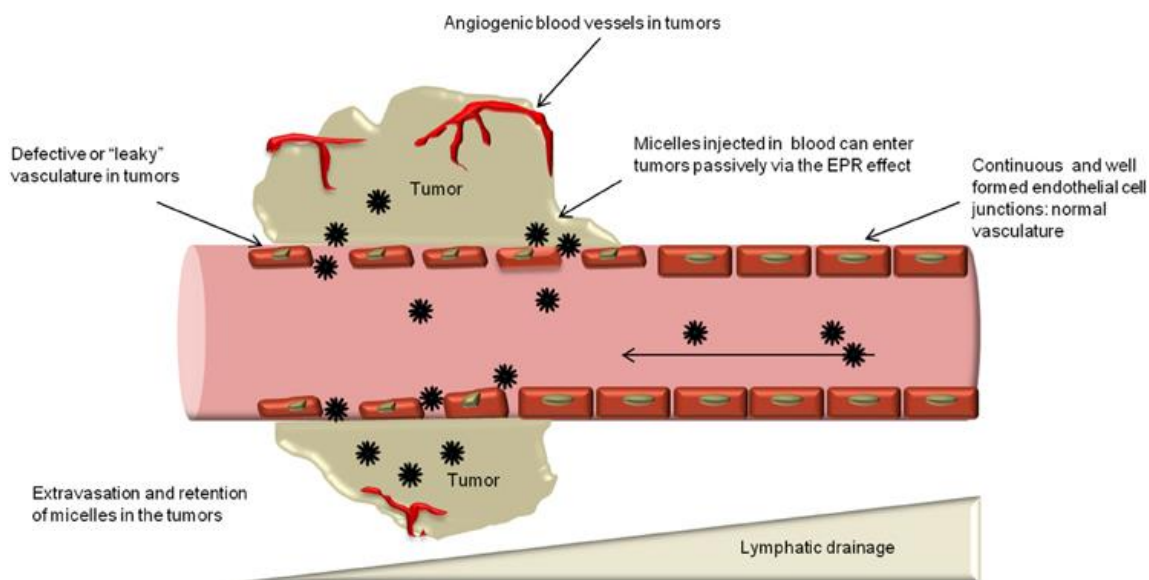
*Plank* grupa ir publicējuši visaptverošus pārskatus un protokolus siRNS magnetofekcijai tai skaitā cilvēka vēža šūnu līnijās HeLa, NCI-H441 un Jurkat, Caco-2 (Mykhaylyk *et al.*, 2007–2010, 2015). *Namiki* grupa demonstrējuši efektīvu SPION-siRNS piegādi pēc reportējošā gēna ekspresijas 10 dažādās kuņģa vēža šūnu līnijās un HeLa šūnu līnijā.

Vairākos pētījumos pārbaudīts arī potenciāli terapeitisku siRNS efekts. *Birc5* gēna, kas saistīts ar ķīmijterapijas rezistenci, paaugstinātu audzēja rekurenci un mazāku dzīvildzi pārekspresiju konstatē lielai daļai audzēju. Būtisks siRNS inhibējošais efekts uz *birc5* gēna

ekspresiju, izmantojot magnetofekciju, tika panākts BT-20, CAPAN-2 un LS-174T šūnu līnijās (Kumar *et al.*, 2010). BCL2 gēna pārekspressija inhibē apoptozes procesus. Pielietojot kompleksus SPION-siRNS savienojumus, tika būtiski inhibēta BCL2 gēna ekspresija A549 un SKOV-3 šūnās (Taratula *et al.*, 2008).

Magnetītu saturošas SPION pagaidām ir vienīgais magnētisko nanodaļiņu veids, kas aprobēts pielietošanai klīniskos pētījumos (pēc ASV FDA datiem) (Rudolf *et al.*, 2014). Tās ir fizioloģiski inertas ar zemu toksicitāti (Breimer, 1998; Torchilin, 2000) un noārdīšanās līdz dzelzij un skābeklim organismā notiek dabiskos metabolisma ceļos (Weissleder *et al.*, 1995). Magnētiskiem šķīdumiem piemīt laba kardiovaskulārā panesamība (Lübbe *et al.*, 2001).

SPION ir piemērotas pielietošanai vēža ārstēšanā. Savu izmēru un struktūras dēļ tās spēj izvairīties no mononukleāro fagocītu iedarbības asinsritē un migrēt audzēja mikrovidē (ekstravazācija no asinsrites) un uzkrājas tur pastiprinātas caurlaidības un aiztures (*enhanced permeability and retention effect* – EPR) efekta ietekmē. EPR efekts izskaidro audzēju angiogēneses īpatnības – audzēju asinsvadi ir deformēti un tajos veidojas poras, jo endoteliālās šūnas neveido normālu monoslāni (McDonald and Foss, 2000), savukārt vājā limfas atcece no audzēja audiem dēļ paaugstināta intersticiālā spiediena audzēja centrā kavē nanodaļiņu aizplūšanu (1.5. att.). Pētījumos apstiprināts, ka SPION labāk akumulējas audzēja, nekā normālos audos (Byrne *et al.*, 2008).



1.5. attēls. Nanonesēju akumulācija audzēja audos EPR efekta ietekmē (Adaptēts no Jhaveri and Torchilin, 2014)

Ārējā magnētiskā lauka pielietojums nodrošina SPION kompleksu piegādi un koncentrēšanos mērķa vietā bez specifiskas SPION funkcionalizācijas, kas savukārt paaugstina

SPION internalizācijas iznākumu audzēja audos. Šis efekts plaši demonstrēts pētījumos ar dzīvniekiem, pielietojot gan sistēmisku, gan lokālu terapeitisko gēnu ievadīšanas pieeju.

*Schillinger* grupas pētījumā SPION-reportējošā gēna kompleksi tika ievadīti kāmjā krūts audzēja šūnās un virs ievades vietas uz 1 stundu fiksēts permanents magnēts. Pēc 40 stundām audzēja audos tika konstatēta reportējošā gēna ekspresija, kamēr dažādos orgānos – sirdī, plaušās, aknās, liesā un ādā virs audzēja gēnu ekspresiju nekonstatēja. *Scherer* ar līdzautoriem veica SPION-reportējošā gēna kompleksu injekcijas cūku labās un kreisās auss vēnās, bet permanents magnēts tika fokusēts virs labās auss injekciju vietā. Rezultātā gēnu ekspresija visos paraugos tika konstatēta vietās, kas pakļautas tiešai magnētiskā lauka ietekmei, bet kontroles paraugos (kreisās auss vēnas), kā arī attālās vietās labās auss vēnās reportējošo gēnu ekspresija netika novērota. Būtiski, ka reportējošā gēna signāli netika novēroti citos orgānos.

Viens no svarīgākajiem aspektiem ir novērtēt SPION kompleksu sistēmiskas ievadīšanas efektivitāti, jo tas parāda gēnu piegādes vektorsistēmas spēju pārvarēt vairākas organisma iekšējās vides barjeras un atspoguļo terapijai pietuvinātus apstākļus. Reportējošo gēnu saturoši SPION kompleksi tika injicēti pelēm caur astes vēnu un ar permanentu magnētu radīta ārējā magnētiskā lauka palīdzību virzīti uz sirdi un nierēm 6 stundu periodā. Pēc inkubācijas SPION kompleksu klātbūtne pēc reportējošā gēna ekspresijas tika konstatēta mērķa vietās – plaušās, sirdī un nierēs, taču SPION zudumi sasniedza 30% (*Kumar et al.*, 2010). Sistēmiska piegāde uzrādīja lielāku SPION akumulāciju aknās nekā audzējā, lai gan, veicot SPION virsmas modifikāciju, iespējams paaugstināt to akumulāciju audzējā (*Prabha et al.*, 2012).

Magnetofekcijas pielietojums neizraisa būtiskus blakusefektus (*Schillinger et al.*, 2005; *Hüttinger et al.*, 2008; *Sharma et al.*, 2011).

Vairākos pētījumos pierādīts, ka magnetofekcijas pielietojumam ir ietekme arī uz terapeitisko efektu – izraisa audzēja samazināšanos, samazina recidīvus/vēli recidīvi, kā arī paaugstina dzīvildzi. Piemēram, pēc kaķu fibrosarkomas audu magnetofekcijas ar cilvēka GM-CSF gēnu tika novērots būtisks stabilas remisijas gadījumu pieaugums 1 gada periodā. Identiskus novērojumus attiecībā uz remisijas gadījumiem publicējuši arī citi autori (*Jahnke et al.*, 2007; *Hüttinger et al.*, 2008) imunostimulējošas gēnu terapijas pētījumos. *Sharma* grupas pētījumā tika konstatēts, ka intratumorālas SPION-p53 gēna kompleksu injekcijas inhibē audzēja augšanu pelēm, kurās pārnestas PC3 p53 neekspresējošas šūnas. Veicot audzēja audu analīzi, lielāks skaits p53 pozitīvu šūnu tika konstatēts gadījumos, kad tika pielietota SPION-p53 terapija, salīdzinot ar p53DNS terapiju bez SPION. Pielietojot SPION-p53 terapiju, tika novērota audzēja samazināšanās par 41%, kamēr p53DNS pielietojums

izraisīja audzēja samazināšanos par 20%, salīdzinot ar kontroles grupu. Interesanti rezultāti tika iegūti veicot reālā laika novērošanu pēc SPION-fluorohroma intravenozas ievadīšanas. Sākotnēji augsts signāls tika novērots aknās, bet pēc vairākām stundām signāla intensitāte paaugstinājās audzējā un signālu bija iespējams detektēt vēl 4 dienas. SPION-p53 terapijas gadījumā būtiski palielinājās dzīvildze – vidēji 39 dienas, salīdzinot ar vidēji 27 dienām pēc p53DNS terapijas. Pēc SPION-p53 terapijas autori konstatēja būtisku asinsvadu blīvuma samazināšanos audzēja audos, tāpat tika novērots augstāks apoptozes indekss, salīdzinot ar kontroles grupu. Lielākajai daļai dzīvnieku (6 no 8) pēc p53DNS terapijas attiecīgā laika posmā tika konstatētas metastāzes limfmezglos un peritoneālajā dobumā, kamēr SPION-p53 gadījumā metastātisks process tika konstatēts 1 no 7 dzīvniekiem, kas liek domāt, ka SPION-p53 ietekmē ne tikai audzēja augšanu, bet arī metastātiska procesa attīstību.

Audzēja angiogēneses samazināšanos un attiecīgi būtisku audzēja masas samazinājumu par 48% kā rezultātā palielinājās dzīvildze sistēmiskas SPION-p53 terapijas ietekmē pelēm novēroja arī *Prabha* ar līdzautoriem.

Magnetofekcija veiksmīgi pielietota melanomas metastāžu inhibēšanai – pētījuma ietvaros pelēm tika injicēti metastāžu supresorgēnu NM23-H1 saturoši SPION kompleksi un tika novērtēta gan magnetofekcijas, gan kombinētas (magnetofekcija/ķīmijterapija) pieejas efektivitāte salīdzinājumā ar ķīmijterapiju. Tika konstatēts, ka gēnu terapija ar SPION dod līdzvērtīgu rezultātu kā ķīmijterapija, bet visaugstāko efektivitāti iespējams sasniegt, pielietojot kombinētu pieeju. Tika novērota ne tikai metastāžu samazināšanās līdz pilnīgai izzušanai, bet arī būtiski palielinājās dzīvildze (*Li et al.*, 2009).

Ir vairāki sekundāri aspekti, kas parāda magnetofekcijas kā vektorsistēmas potenciālu ne tikai gēnu pārnesei un perspektīvā varētu tikt pielietoti kombinētas terapijas izstrādei.

Magnetofekcija nodrošina efektīvāku ķīmijterapijas līdzekļu piegādi šūnās. *Alexiou* grupas pētījumā pelēm ar plakanšūnu karcinomu cirkšņa artērijā vai auss vēnā tika ievadīti SPION-mitoksantrona kompleksi, kamēr ārējais magnētiskais lauks tika fokusēts uz ādas virs audzēja. Visaugstākā SPION-mitoksantrona akumulācija tika konstatēta audzēja audos un nelielos daudzumos arī aknās, plaušās un liesā. Taču, salīdzinot ar kontroli bez magnētiskā lauka iedarbības, audzējā un apkārtējos audos dzelzs rādītāji bija vairākus simtus reižu augstāki. Intraarteriāla ievadīšana rezultējās pilnīgā un stabilā remisijā, salīdzinot ar bez terapijas un intravenozo terapiju. Būtiski, ka šis efekts tika sasniegts pielietojot samazinātu devu – 20 līdz 50% no sistēmiskās devas, pie kuras mitoksantrona koncentrācija audzēja šūnās un apkārtējos audos pieauga 44 reizes. Piemērotā terapija neizraisīja blakusefektus un novērošanas periodā netika novērota metastāžu attīstība. Vēlāk šī pati grupa konstatēja, ka magnētiskā lauka

iedarbība izraisa ne tikai terapeitisko kompleksu pastiprinātu koncentrēšanos uz audzēja šūnu virsmas, bet arī stimulē SPION iekļūšanu tā šūnās. Citā pētījumā ar pelēm, kurās pārnestas krūts audzēja šūnas pēc intravenozas ievadīšanas parādīta efektīva SPION-liposomu-paklitaksela akumulācija audzēja šūnās ārējā magnētiskā lauka ietekmē (*Zhang et al.*, 2005).

Liela daļa magnetofekcijas pētījumu ir veltīti smadzeņu audzēju terapijai, jo smadzeņu audzēji bieži vien ir neoperējami izmēru un sarežģītas lokalizācijas vietas dēļ un slikti reaģē uz ķīmijterapiju hematoencefalītiskās barjeras dēļ (*Juratli et al.*, 2013). Ir pierādīts, ka SPION spēj šķērsot hematoencefalītisko barjeru un to būtiski ietekmē SPION izmērs (*Pulfer and Gallo*, 1998). *Kievit* grupa pētījumā ar pelēm ar C6 žurku gliomas audzējiem tika pierādīta SPION kompleksu akumulācija gliomas šūnās pēc sistēmiskas ievadīšanas astes vēnā. Citā pētījumā SPION akumulācija 9L-gliomas šūnās žurkām pēc intravaskulāras ievadīšanas palielinājās pieckārt fokusēta ārējā magnētiskā lauka ietekmē, salīdzinot ar kontroles grupu bez ārējā magnētiskā lauka pievadīšanas ar SPION pasīvu akumulāciju gliomas šūnās (*Chertok et al.*, 2008).

Vēl viens interesants magnetofekcijas pielietojuma virziens ir šūnu pielāde ar SPION ar mērķi tās padarīt magnetovadāmas, jo magnētiskā lauka iedarbība izraisa ne tikai SPION kustību, bet arī ar SPION pielādētu šūnu kustību. *Muthana* grupas pētījumā reportējošo gēnu ekspresējoši monocīti tika pielādēti ar SPION. Veicot intravenozas injekcijas *nude* pelēm, tika novērots, ka būtiski vairāk SPION saturošu monocītu tiek koncentrēti uz audzēja audiem pēc magnētiskā lauka pievadīšanas, respektīvi, magnētiskā lauka iedarbība izraisīja monocītu virzību uz audzēja audiem. Būtiski, ka liels daudzums SPION saturošu monocītu tika konstatēti slikti apasiņotās audzēja zonās.

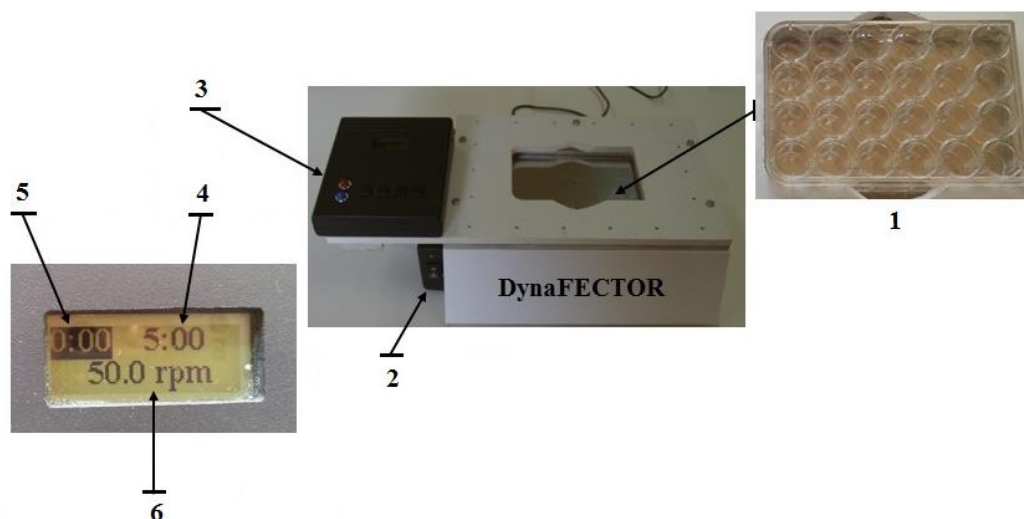
Neskatoties uz daudzsološajiem rezultātiem pētījumos *in vivo* izmantojot dzīvniekus, šobrīd nav neviena uz magnētiskiem vektoriem bāzēta sistēma, kas būtu izgājusi visas klīnisko pētījumu fāzes un aktīvi pielietota terapeitiskiem mērķiem. Pirmie ziņojumi par magnētisku nesēju pielietojumu klīniskajos pētījumos tika publicēti 90. gados (*Lübbe et al.*, 1996). Pētījumā tika iekļauti 14 slimnieki pēc neefektīvas ķīmijterapijas, kuriem 1–3 kursu veidā tika veiktas intravenozas SPION-epirubicīna infūzijas ar sekojošu ārējā magnētiskā lauka iedarbību audzēju lokalizācijas vietās 60–120 min garumā. Tika konstatēts, ka ārējā magnētiskā lauka iedarbība nodrošina SPION kompleksu piegādi audzēja šūnās 50% no pētījumā iesaistītajiem pacientiem un SPION izraisīta paaugstināta orgānu toksicitāte netika novērota. *Wilson* ar līdzautoriem ziņojuši par I/II fāzes hepatocelulārās karcinomas slimnieku terapijas efektivitāti. Pētījumā tika iekļauti 4 pacienti, kuriem netālu no audzēja esošajā artērijā injicēja SPION-doksorubicīna hidrochlorīda savienojumus ar sekojošu spēcīga magnētiskā lauka iedarbību audzēja lokalizācijas vietā. Rezultātā magnētiskā lauka iedarbība izraisīja SPION

kompleksu nokļūšanu audzējā un, tā kā kopējais administrēto terapeitisko līdzekļu apjoms bija ļoti zems, netika novēroti praktiski nekādi blakusefekti.

### Laika-fāzes variējošs magnētiskais lauks

Mūsu starpdisciplinārā grupa ir aprakstījusi laika-fāzes variējošu magnētisko lauku, kuru rada permanentu magnētu orbitāla rotācija šūnu kultūrai paralēlā plaknē. Pastāv uzskats, ka magnētu orbitāla rotācija ietekmē SPION kustību šķīdumā, tā sekmējot to sedimentāciju uz (šūnu) virsmas.

Laika-fāzes variējošs magnētiskais lauks tiek ģenerēts ar iekārtas *DynaFECTOR* palīdzību, kas ir paredzēta šūnu transficēšanai 24 iedaļu šūnu kultūru platē (1.6. att.).



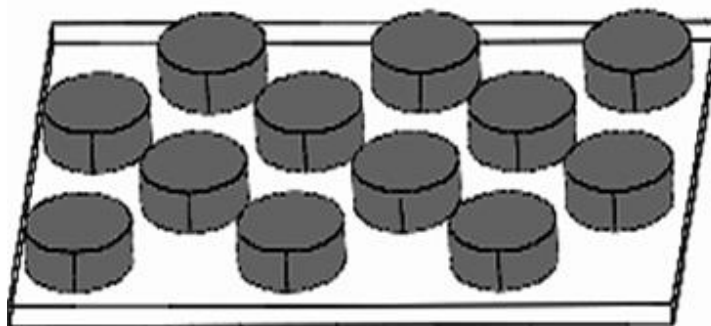
1.6. attēls. Magnetofekcijas iekārta *DynaFECTOR*: 1 – 24 iedaļu plates vieta, 2 – strāvas padeves slēdzis, 3 – vadības panelis, 4 – ekspozīcijas ilgums laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā, 5 – ekspozīcijas ilgums statistiskajā magnētiskajā laukā, 6 – magnētu apgriezību frekvence

*DynaFECTOR* raksturojošie parametri:

- programmējama magnētiskās sistēmas rotācija orbītā ar ātrumu 1–150 apgr./min;
- fiksēts rotācijas laiks 1–999 min;
- papildus ieprogrammēta rotācijas virziena maiņa ik pēc 30 sekundēm visā SPION nosēdināšanas procesā;
- termostatiskā temperatūra  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .

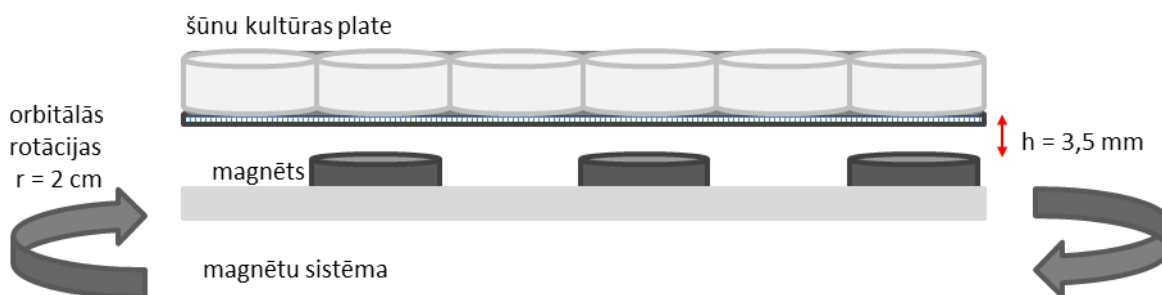
Iekārta *DynaFECTOR* konstruēta maisītāja platformas vietā iemontējot magnētisko sistēmu, kas sastāv no 12 permanentiem, vienpolāri orientētiem cilindriskas formas retzemju neodīma-dzelzs-bora (NdFeB) permanentajiem magnētiem ( $d = 19 \text{ mm}$ ). Magnēti uz magnētiskās sistēmas izvietoti šahveida kārtībā (1.7. att.) tā, ka ņemot vērā magnētu sistēmas

kustības amplitūdu, katra magnēta rotācijas orbīta ietver divas iedaļas 24 iedaļu platē. Saskaņā ar magnētiskā vektora spēku datormodeli, magnēti uz virsmas izkārtoti tā, lai atkarībā no to kustības būtu iespējams sasniegt magnētiskā lauka indukciju 0,35 T un aksiālās un radiālās komponentes gradienta līmeni  $3 \times 10^7 \text{ a/m}^2$ .



1.7. attēls. Magnētu izvietojums *DynaFECTOR* magnētiskajā sistēmā  
(Adaptēts no *Vainauska et al., 2012*)

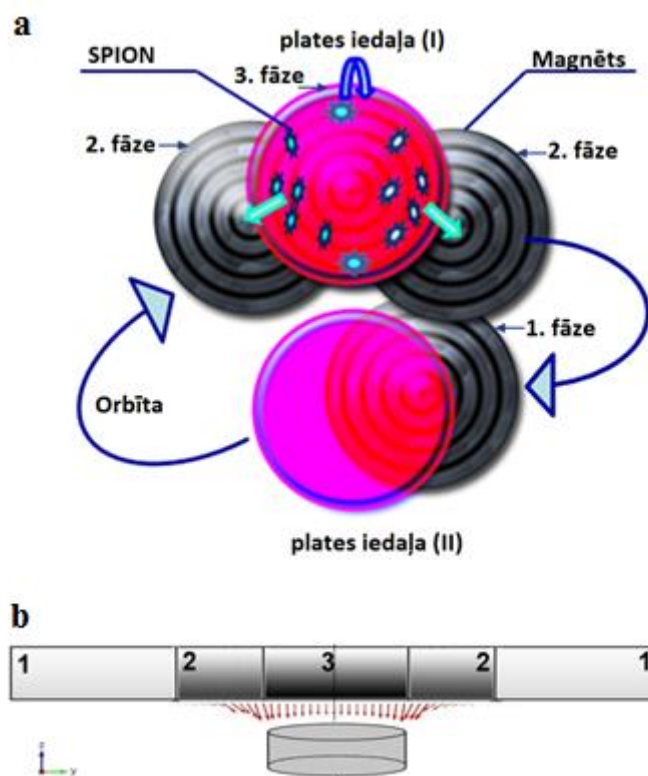
Virš magnētu sistēmas nostiprināta ne-magnetizējoša metāla plāksne, uz kuras paredzēta vieta 24 iedaļu šūnu kultūru platei; fiksētais attālums no šūnu kultūru plates apakšmalas līdz magnētu virsmai ir 3,5 mm (1.8. att.).



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

Magnētu sistēmas, kas rotē zem šūnu kultūru plates orbitālās rotācijas rādiuss ir 2 cm neatkarīgi no rotācijas virziena.

Rotējošā magnētu sistēmā specifisku magnētisko spēku iedarbību uz SPION raksturo magnētu pozīcijas orbītā, respektīvi, 1., 2., 3. fāze (1.9. att. (a)). 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.



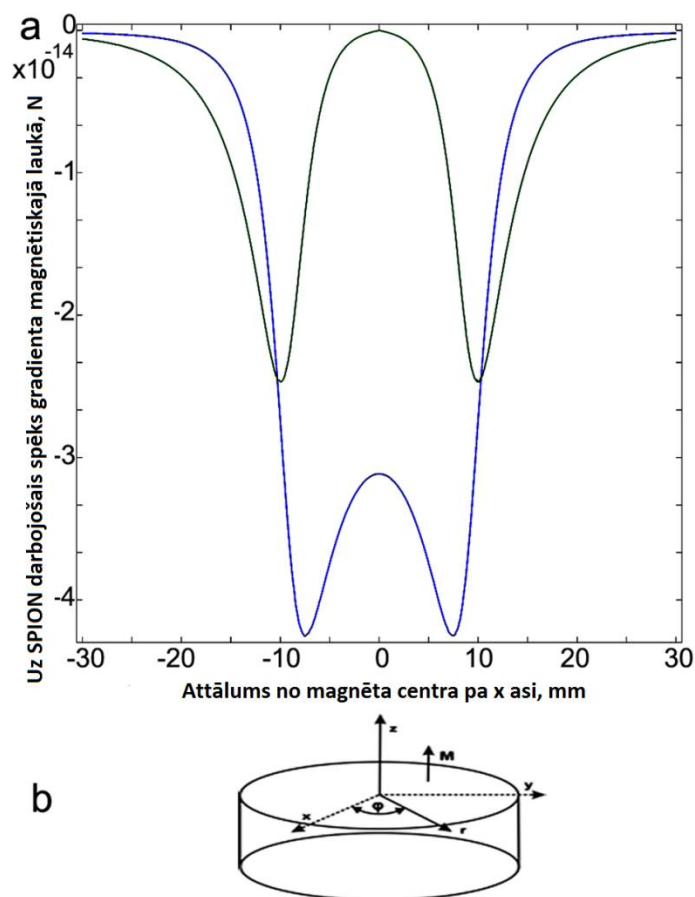
1.9. attēls. Rotējošas magnētiskās sistēmas princips: (a) shematiska magnētu sistēmas ilustrācija vienam magnētam un divām šūnu kultūru plates iedaļām; 1., 2., 3. fāze – magnētu pozīcijas zem iedaļām orbitālās rotācijas procesā, (b) shematisks attēlojums magnētiskā lauka darbībai dažādos laika posmos; 1., 2., 3. – relatīvais magnētiskā lauka darbības ilgums; sarkanās bultiņas norāda magnētiskā lauka virzienu un relatīvo lielumu (pēc bultiņu garuma)  
(Adaptēts no Karpov *et al.*, 2014)

Novērtējot magnēta atrašanās relatīvo ilgumu katrā no fāzēm (1.9. att. (b)), tika konstatēts, ka pirmajā fāzē kad magnētiskais spēks uz SPION neiedarbojas, to izkliede ir vienmērīga visā telpā (skat. krāsojumu 1.9. att. (b)). Savukārt otrajā fāzē, magnētiskā spēka radiālā komponente, īslaicīgi iedarbojoties uz SPION, izraisa to laterālu kustību dažādos virzienos, jo orbitālā perioda laikā iedarbojas uz SPION divas reizes. Trešajā fāzē magnētiskā spēka aksiālā komponente virza SPION lejup pretim plates iedaļas (šūnas) virsmai.

Sākotnējie datormodelēšanas rezultāti (*Comsol*), novērtējot magnētiskā spēka iedarbību uz SPION laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā<sup>1</sup>, parādīja, ka sedimentācijas procesā SPION izvietosies gan magnēta centrālajā daļā, gan pie ārējās robežas, jo magnētiskā lauka aksiālā komponente dominē Z ass virzienā un virza SPION uz leju pret magnētu, savukārt radiālā komponente, kas dominē pie magnēta malas veicina SPION laterālu kustību (1.10. att.).

<sup>1</sup> Attālums no NdFeB magnēta (350 mT virsmas centrā, r = 9 mm, h = 7 mm) 3,5 mm



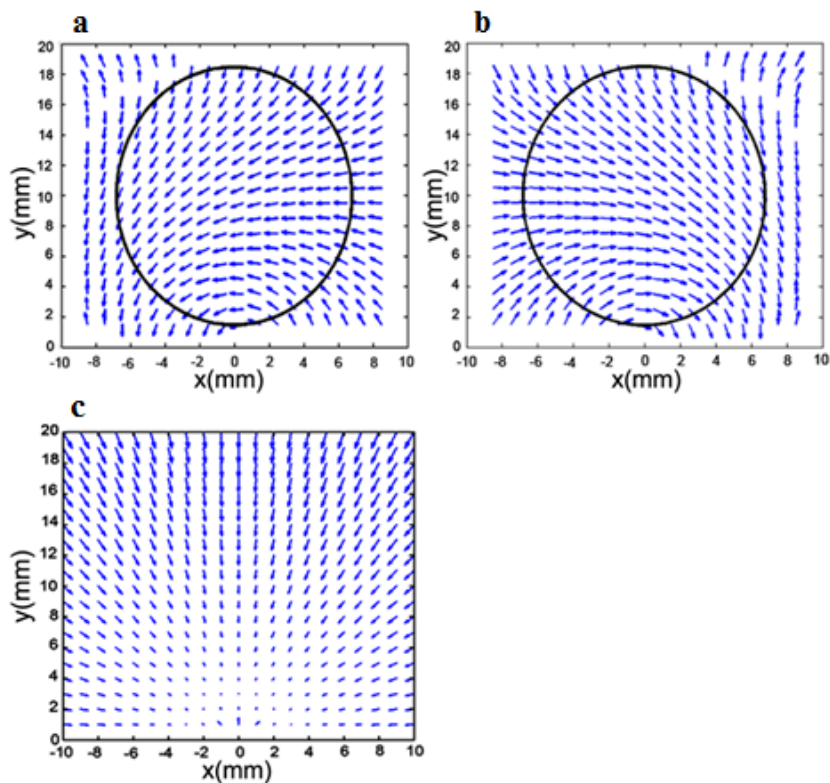


1.10. attēls. Aksiālā (zils krāsojums) un radiālā (zaļš krāsojums) magnētiskā spēka komponentes (a), taisnleņķa un cilindriskā koordinātu sistēma attiecībā pret magnētu (b) (Adaptēts no Karpov *et al.*, 2014)

To uzskatāmi apstiprina datormodelēšanas rezultāti (*Matlab*), novērtējot magnētiskā lauka radiālās komponentes virzienu grafisku momentu izplatību diviem gadījumiem<sup>2</sup> 1.11. att. ((a) un (b)). Izrietošais spēks tiek vērsts magnēta orbītas centra virzienā (1.11. att. (c)); trešajā fāzē, magnētiskā spēka aksiālā komponente virza SPION aksiālā virzienā pretim virsmai. Tā kā magnētiskās sistēmas orbitālās kustības rezultātā magnētiskā lauka iedarbība ir laika-fāzes variējoša, SPION pārvietošanās mainīsies atkarībā no magnētu apgriezumu frekvences.

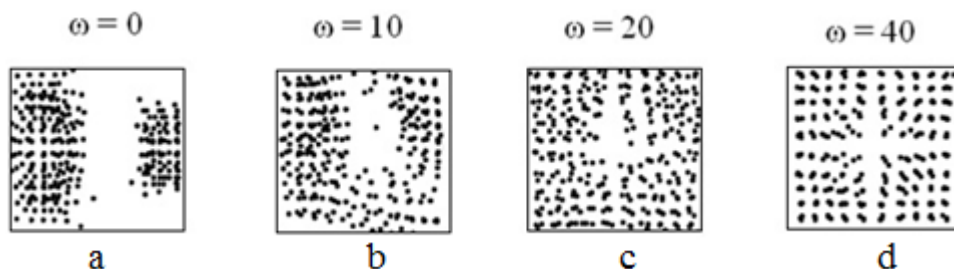
Aprēķināts, ka SPION pārvietoējuma amplitūda var sasniegt līdz pat  $0,5 \mu\text{m}$  saskaņā ar magnēta robežas lineāro ātrumu  $v$  60 mm/s, un magnētiskā lauka gradientu 50 T/m.

<sup>2</sup>  $R_0 = 10 \text{ mm}, r_0 = 9 \text{ mm}$



1.11. attēls. Radiālā spēka virzienu izkliede: (a) un (b) – magnētām otrajā fāzē (attiecīgi kreisā un labā pozīcijā kā attēlots 1.9. attēlā), (c) – izrietošais spēks; magnētiskais spēks (a) un (b) parāda magnētisko momentu (apvilkti ar apliem) izkliedi (Adaptēts no *Karpov et al.*, 2014)

Datormodelēšanas rezultāti (*FORTTRAN*<sup>3</sup>), novērtējot sedimentēto SPION izkliešanas profilu atkarībā no rotējošas platformas apgriezumu frekvences  $\omega$ , vienpolāri orientētu magnētu gadījumā uzrādīja būtiskas atšķirības (1.12. att.).



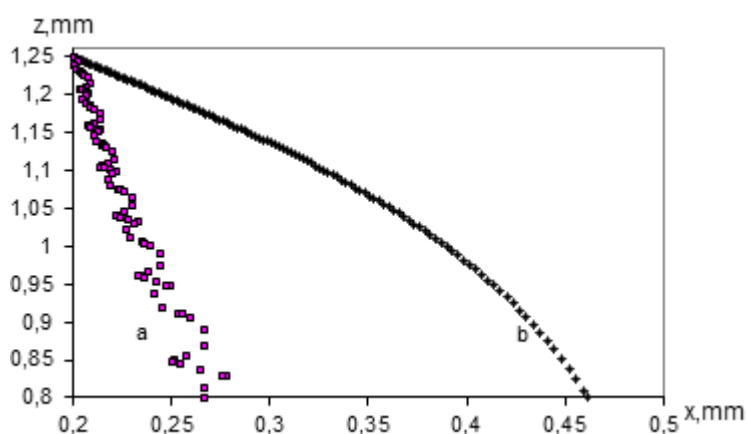
1.12. attēls. Uz kivetes pamatnes virsmas daļas (kvadrātveida laukums  $2 \times 2 \text{ cm}^2$ ) nosēdināto SPION izkliede pie dažādām maisītāja platformas apgriezumu frekvencēm  $\omega$ , apgr./min (Adaptēts no *Kozlov et al.*, 2015)

<sup>3</sup> 1,3 mm biezs SPION suspensijas slānis tika sadalīts kubiskas formas  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$  izmēra elementos un SPION trajektoriju sākumpunkti atradās šo elementu centrā.

Gadījumā, kad magnēti bija nekustīgi ( $\omega = 0$ ) SPION sedimentācija bija ļoti nevienmērīga (1.12. att. (a)), un ievērojama daļa kivetes pamatnes virsmas (~ 40%) palika nenoklāta.

Uzsākot rotāciju, SPION sedimentācija uz pamatnes notika vienmērīgāk (1.12. att. (b un c)). Sasniedzot rotējošas platformas magnētu apgriezību frekvenci  $\omega = 40$  apgr./min, SPION izkliede kļuva vienmērīgāka, nenosedzot tikai ~ 10% virsmas laukuma (1.12. att. (d)). Tika konstatēts, ka SPION izkliede paliek nemainīga, palielinot platformas apgriezību frekvenci. Šāds SPION izvietojums uz pamatnes virsmas liecina, ka SPION, kas pakļautas kustībā esošu magnētu magnētisko lauku iedarbībai, tiek nosēdinātas praktiski vertikāli kivetes pamatnei pa asi Z ar relatīvi nelielu pārvietojumu šķērsām.

Projekcija no vienas no aprēķinātajām SPION trajektorijām plaknē XZ attēlota 1.13. attēlā. Uzskatāmi redzams, ka magnētu riņķveida kustība atspoguļojas raksturīgās SPION trajektorijas svārstībās – gan aksiālā, gan laterālā virzienā.



1.13. attēls. **SPION trajektorijas projekcija XZ plaknē: a – magnēti rotē ar apgriezību frekvenci 40 apgr./min, b – magnēti ir nekustīgi**  
(Adaptēts no Kozlov et al., 2015)

Magnetofekcija ir viena no šobrīd perspektīvākajām gēnu piegādes metodēm, kuras pamatā ir ar magnētiskajām nanodaļiņām saistītu nukleīnskābju koncentrēšana uz šūnu virsmas un piegāde šūnās, izmantojot spēcīgu ārējo magnētisko lauku. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka, kas tiek ģenerēts ar magnetofekcijas iekārtas *DynaFECTOR* palīdzību, pamatā ir permanentu magnētu plates orbitāla rotācija šūnu kultūrai paralēlā plaknē. Datormodelēšanas rezultātā tika noskaidrots, ka laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka ietekmē notiek SPION aksiāli laterāla kustība. Tā 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.

## 2. MATERIĀLS UN METODEDES

### 2.1. Materiāls

#### 2.1.1. Šūnu līnijas

Darbā kā modelis tika izmantota cilvēka prostatas karcinomas šūnu līnija (PC3) (*ScienCell*, ASV) un cilvēka aknu hepatocelulārās karcinomas šūnu līnija (HEPG2) (*ScienCell*, ASV). Izvēlētās šūnu līnijas pieder pie grūti transficējamām šūnu līnijām, tāpēc ir piemērotas transgēna efektivitātes novērtēšanai. Šūnu kultivēšanai tika izmantoti sertificēti šūnu kultūru reaģenti (*Life Technologies*, ASV), un šūnu kultivēšana tika veikta atbilstoši ražotāju rekomendācijām. PC3 šūnas tika audzētas RPMI-1640/F-12 barotnē, papildinātā ar 10% FBS, penicilīnu (100 U/ml) un streptomīcīnu (100 µg/ml). HEPG2 šūnas tika audzētas DMEM barotnē, papildinātā ar 10% FBS, penicilīnu (100 U/ml) un streptomīcīnu (100 µg/ml). Šūnas tika kultivētas inkubatorā (*Sanyo MCO-175*) 37°C ar 5% CO<sub>2</sub> padevi. Subkultivēšana tika veikta 2–3 reizes nedēļā, šūnas tripsinizējot ar 0,025% tripsīna šķīdumu PBS (*Life Technologies*, ASV).

### 2.2. 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  *$\beta$ -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  *$\beta$ -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  *$\beta$ -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  *$\beta$ -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  *$\beta$ -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 Fe<sup>2+</sup> noteikšana pēc šūnu skaita:

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

### Internalizētās Fe<sup>2+</sup> noteikšana pēc daudzuma/šūnā:

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

### 2.2.1. SPION sedimentācijas profila noteikšana

Lai analizētu magnētisko nanodaļiņu sedimentāciju šķīdumā, dažādu magnētisko lauku ietekmē, 30 µg *CombiMag* (CM) magnētisko nanodaļiņu (*Chemicell*, Vācija) tika samaisīti ar 470 µl *Opti-MEM* šūnu kultūru barotni. Iegūtais maisījums pa pilienam tika pārnests 24 iedaļu šūnu kultūru platē un inkubēts uz MagnetoFACTOR (*Chemicell*, Vācija) magnētu sistēmas (statiskais magnētiskais lauks, 0,35 T) vai uz *DynaFACTOR* rotējošās magnētu sistēmas platformas 5 min. Pēc inkubācijas CM izkliede tika analizēta, izmantojot gaismas mikroskopijas metodi (*Nikon Eclipse 80i*) 400X kopējā palielinājumā, un iegūti digitāli fotoattēli ar *Nikon* kameru.

### 2.2.2. Plazmīdu DNS iegūšana

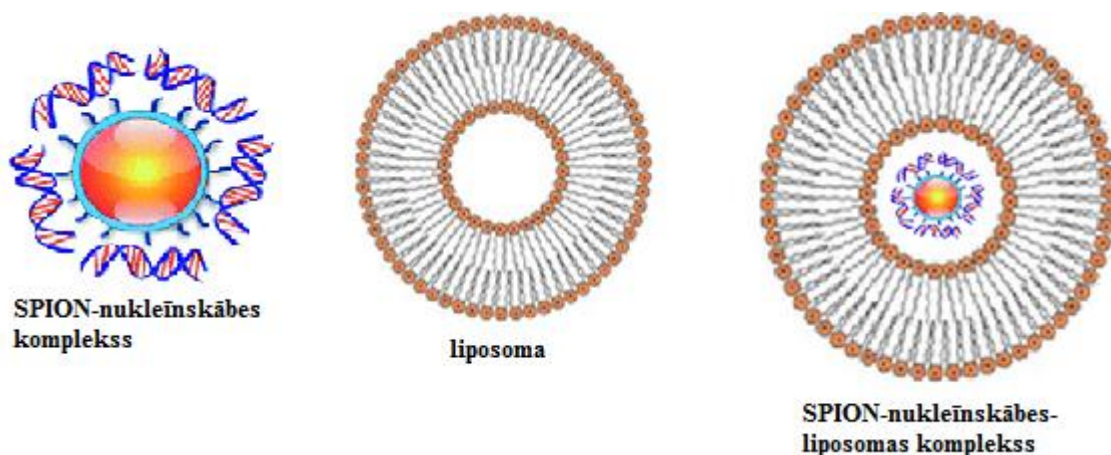
Lai novērtētu nukleīnskābju piegādes efektivitāti vēža šūnās gan pēc transficēto šūnu skaita, gan kopējā proteīnu līmeņa, tika izmantotas divas dažādas plazmīdas – *pcDNA3.1<sup>TM</sup>/His/LacZ* (*Life Technologies*, ASV) un *pECFP-ERp29* (Karolinska institūts, Zviedrija). *LacZ* gēns kodē enzīmu β-galaktozidāzi, kas piedalās laktozes hidrolīzē līdz glikozei un galaktozei. β-galaktozidāzes tests ir viena no efektīvākajām un biežāk pielietotajām metodēm transficēto šūnu skaita noteikšanai, jo bioķīmiskas reakcijas rezultātā transficētās šūnas dod raksturīgu zilu krāsojumu. *pECFP-ERp29* tika izmantota, lai novērtētu transfekcijas efektivitāti pēc kopējā proteīnu ekspresijas līmeņa.

Nukleīnskābju transformēšanai baktērijās tika izmantots kompetento *E. Coli* bakteriālais celms *XL1Blue* (*Promega*, ASV), un baktēriju transformācija tika veikta pēc aprobēta darba protokola. Kompetentās *E. Coli* šūnas (50 µl alikvota) tika atkausētas, ievietojot

ledū, un pēc atkausēšanas tām pievienoja 10 ng pDNS. Iegūtais maisījums tika inkubēts ledū 5 min, tad nekavējoties pārņests ūdens termostatā (*LKB Bromma 2209 Multitemp*) 42°C, kur inkubēts vēl 1,5 min, pēc tam pārņests uz ledus un inkubēts 2 min. Pēc inkubācijas, transformēto baktēriju maisījumam pievienoja 500 µl šķidrās LB barotnes un inkubēja *Environmental shaker incubator ES-20/60* termostatā (40 min; 200 apgr./min). Pēc inkubācijas, 50 µl transformēto baktēriju maisījuma pārnesa uz Petri plates ar agarizētu LB barotni ar 100 µg/ml ampicilīna (LacZpDNS) vai 25µg/ml kanamicīna (ECFP-ERp29pDNS) un inkubēja termostatā 37°C naktskultūrā. Nākamajā dienā transformētās šūnas tika izsētas šķidrajā LB barotnē ar ampicilīnu (100 µg/ml) (LacZpDNS) vai kanamicīnu (25µg/ml) (ECFP-ERp29pDNS) un kultivētas optimālos apstākļos (37°C, 200 apgr./min) *Environmental shaker incubator ES-20/60* termostatā naktskultūrā. pDNS tika izdalīta, izmantojot *Plasmid Midi Kit* (*Qiagen*, Vācija), pēc ražotāja izstrādāta protokola. Izdalītās pDNS koncentrācija (pie 260 nm) un kvalitāte (260/280 ≤ 1,8) tika noteikta, izmantojot *NanoDrop 1000* spektrofotometru, pēc ražotāja rekomendācijām.

### 2.2.3. Transfekcija ar plazmīdu DNS un siRNS

Šūnu transficēšana statiskajā magnētiskajā laukā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā tika veikta, izmantojot kompleksu liposomālās magnetofekcijas metodi. Liposomālā komponente nodrošina papildus pDNS aizsardzību un labāku piesaisti šūnas membrānai (2.1. att.).



2.1. attēls. SPION-nukleīnskābes-liposomālās komponentes savienojumu veidošanās princips (Adaptēts no *Tiwari et al.*, 2015)

Salīdzinājumam tika veikti eksperimenti izmantojot arī lipofekcijas metodi (L), lai pārlicinātos par magnētiskā lauka efektu. Eksperimentālajā darbā tika izmantoti sertificēti

transfekcijas reaģenti. *Lipofectamine2000* (LIP) transfekcijas reaģents (*Life Technologies, ASV*) ir aprobēts pielietošanai dažādās adherentās un atsevišķās suspensiju šūnu līnijās, t.sk. RNS interferences pētījumos. CM superparamagnētiskās nanodaļiņas ir piemērotas transficēšanai, izmantojot lipīdus, un ir aprobētas pielietošanai PC3 un HEPG2 šūnu līnijās. Ko-transfekcijai ar siRNS tika izmantota siRNS pret  $\beta$ -galaktozidāzi *Stealth™ RNAi LacZ Reporter Control* (*Life Technologies, ASV*).

Optimālu reakcijas apstākļu noteikšana ir būtisks faktors augstāku transfekcijas efektivitātes rādītāju sasniegšanai. Tāpēc vispirms eksperimentāli pēc titrēšanas principa tika veikta reakcijas apstākļu optimizācija, un noteikta pDNS-LIP un pēc tam attiecīgi pDNS-LIP-CM savstarpējā optimālā attiecība, ņemot vērā ražotāju rekomendācijas (2.1. tabula).

2.1. tabula

**pDNS-LIP un pDNS-LIP-CM savstarpējā attiecība optimizācijas eksperimentos**

pDNS (μg)	LIP (μl)		pDNS (μg): LIP (μl)	CM (μl)
0,5	0,5	→	1:1	0,5
1	1		1:2	0,5
2	2		1:3	0,5
3	3		1: 1	1
4	4		1:2	1
0,5	1		1: 3	1
1	2		1:1	2
2	4		1:2	2
3	6		1:3	2
0,5	1,5			
1	3			
2	6			

pDNS-LIP-CM savstarpējā optimālā attiecība tika noteikta, izmantojot 10 min ekspozīciju magnētiskajā laukā (ražotāja rekomendācija: 10–20 min).

Testējot 5 nM, 20 nM, 50 nM un 100 nM siRNS, tika noteikta arī siRNS koncentrācija, pie kuras tiek panākts visaugstākais inhibējošais efekts.

Dienu pirms transfekcijas ar pDNS šūnas tika izsētas 24 iedaļu platēs:  $1,8 \times 10^5$  šūnas/iedaļā PC3 šūnas un  $1,5 \times 10^5$  šūnas/iedaļā HEPG2 šūnas, lai transfekcijas dienā sasniegtu ~ 80% konfluenci.

Ko-transfekcijas eksperimentiem ar siRNS PC3 šūnas tika izsētas tāpat kā aprakstā transfekcijai ar pDNS.

Visiem eksperimentiem paraugi tika sagatavoti triplikātā atbilstoši vadlīnijām.



## **Lipofekcija ar pDNS**

Pirms transfekcijas šūnu kultūru barotne tika nomainīta ar 400 µl *Opti-MEM* barotnes bez piedevām. Tika sagatavots pDNS šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl. Tika sagatavots LIP reaģenta šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma un, pirms sajaukšanas ar citām komponentēm, inkubēts istabas t° 5 min. Sagatavotais pDNS šķīdums tika pievienots LIP reaģenta šķīdumam un viegli samaisīts 2–3 reizes, lēni pipetējot. Maisījumu inkubēja istabas t° 25 min un pēc tam pa pilienam pārnesa uz šūnām platē. Kontrolei tika izmantots LIP reaģenta šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma. Šūnas kultivēja CO<sub>2</sub> inkubatorā 24 stundas.

## **Ko-lipofekcija ar siRNS**

Pirms transfekcijas šūnu kultūru barotne tika nomainīta ar 400 µl *Opti-MEM* barotnes bez piedevām. Tika sagatavots pDNS šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl. Tika sagatavots siRNS šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl. Tika sagatavots LIP reaģenta šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma un, pirms sajaukšanas ar citām komponentēm, inkubēts istabas t° 5 min. Sagatavotais siRNS šķīdums tika pievienots pDNS šķīdumam, pēc tam LIP reaģenta šķīdumam un viegli samaisīts 2–3 reizes, lēni pipetējot. Maisījumu inkubēja istabas t° 25 min un pēc tam pa pilienam pārnesa uz šūnām platē. Kontrolei tika izmantots LIP reaģenta šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma un siRNS šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl. Šūnas kultivēja CO<sub>2</sub> inkubatorā 48 stundas.

## **Liposomālā magnetofekcija ar pDNS**

Pirms transfekcijas šūnu kultūru barotne tika nomainīta ar 350 *Opti-MEM* barotnes bez piedevām. Tika sagatavots pDNS šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl. Tika sagatavots LIP reaģenta šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma un, pirms sajaukšanas ar citām komponentēm, inkubēts istabas t° 5 min. CM pirms lietošanas tika vorteksētas 2–3 sekundes, un sagatavots magnētisko nanodaļiņu šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma. Sagatavotais pDNS šķīdums tika pievienots LIP reaģenta šķīdumam un viegli samaisīts 2–3 reizes, lēni pipetējot. pDNS-LIP šķīdumam pievienoja CM šķīdumu, 2–3 reizes lēni pipetējot, un inkubēja istabas t° 25 min. Maisījums pa pilienam tika pārnest uz šūnām platē. Šūnas tika inkubētas uz MagnetoFACTOR (*Chemicell*, Vācija) magnētu sistēmas (statiskais magnētiskais lauks) un uz *DynaFACTOR* rotējošu magnētu sistēmas platformas.

Kontrolei tika izmantots CM reaģenta šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50  $\mu$ l šķīduma. Pēc inkubācijas šūnas kultivēja CO<sub>2</sub> inkubatorā 24 stundas.

### **Liposomālās magnetofekcijas optimizācija**

Lai noteiktu optimālo ekspozīcijas laiku magnētiskajā laukā, tika veikta liposomālā magnetofekcija statiskajā magnētiskajā laukā (LM) un liposomālā magnetofekcija laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (LM LFV) ar ekspozīciju 2,5, 5, 10 un 20 min. Izvēloties ekspozīcijas ilgumu, pirmkārt tika ņemtas vērā ražotāja rekomendācijas attiecībā uz ieteicamo magnetofekcijas laiku, izmantojot CM reaģentu: 5–20 min. Ekspozīcijas ilgums 2,5 min tika izvēlēts, lai pārlicinātos vai nepastāv atšķirības reakcijas kinētikā starp LM un LM LFV.

Lai noteiktu optimālo magnētu apgriezību frekvenci, tika veikta LM LFV ar magnētu apgriezību frekvenci 5, 25, 50 un 100 apgr./min optimālajā ekspozīcijas laikā.

Lai noteiktu optimālo magnētiskā lauka intensitāti, tika veikta LM un LM LFV optimālos ekspozīcijas ilguma un attiecīgi magnētu apgriezību frekvences apstākļos, variējot magnētiskā lauka intensitāti 0,1 T, 0,2 T un 0,35 T robežās. Tas tika nodrošināts palielinot attālumu starp magnētiem un šūnu kultūras plati, starp tām novietojot magnētiski inertas plāksnītes (6 un 9 mm).

### **Liposomālā ko-magnetofekcija ar siRNS**

Lai sasniegtu visaugstāko inhibējošo efektu tika testēti 5 nM, 20 nM, 50 nM un 100 nM siRNS. Pirms transfekcijas šūnu kultūru barotne tika nomainīta ar 300  $\mu$ l *Opti-MEM* barotnes bez piedevām. Tika sagatavots pDNS šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50  $\mu$ l. Tika sagatavots siRNS šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50  $\mu$ l. Tika sagatavots LIP reaģenta šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50  $\mu$ l šķīduma un, pirms sajaukšanas ar citām komponentēm, inkubēts istabas t° 5 min. CM pirms lietošanas tika vorteksētas 2–3 sekundes un sagatavots magnētisko nanodaļiņu šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50  $\mu$ l šķīduma. Sagatavotais siRNS šķīdums tika pievienots pDNS šķīdumam, pēc tam LIP reaģenta šķīdumam un viegli samaisīts 2–3 reizes lēni pipetējot. pDNS-siRNS-LIP šķīdumam pievienoja CM šķīdumu, lēni pipetējot 2–3 reizes, un inkubēja istabas t° 25 min. Maisījums pa pilienam tika pārnesti uz šūnām platē. Šūnas tika inkubētas uz MagnetoFACTOR (*Chemicell*, Vācija) magnētu sistēmas (statiskais magnētiskais lauks) un uz *DynaFACTOR* rotējošās magnētu sistēmas. Kontrolei tika izmantots CM reaģenta šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo

daudzumu 50  $\mu$ l šķīduma un siRNS šķīdums *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50  $\mu$ l. Pēc inkubācijas šūnas kultivēja CO<sub>2</sub> inkubatorā 48 stundas.

#### 2.2.4. Transgēna ekspresijas detekcija un analīze

LacZ gēna ekspresija tika noteikta, izmantojot  *$\beta$ -Gal Staining Kit* (*Life Technologies, ASV*) reaktīvu komplektu, pēc ražotāja protokola. Atkrāsotās šūnas tika analizētas gaismas mikroskopā (*Leitz Labovert FS*) 200X kopējā palielinājumā un iegūti to digitāli fotoattēli no 5–10 nejauši izvēlētiem laukumiem, izmantojot fotokameru *Sony DSC W-115*. Šūnu skaitīšana, izmantojot fotoattēlus, tika veikta datorprogrammā *Image J* (*NIH, ASV*). Transfekcijas efektivitāte tika aprēķināta pēc sekojošas formulas:

$$\text{Transfekcijas efektivitāte \%} = (\text{kopējais zili iekrāsoto šūnu skaits/visu šūnu skaits}) \times 100$$

ECFP-ERp29 detekcijai tika izmantota *Western* (imuno) blota metode, pēc aprobēta darba protokola. Transfēcētās šūnas tika mazgātas ar 1 ml PBS 3 reizes un lizētas ar 200  $\mu$ l 1% Triton X-100 šķīdumu PBS, inkubējot ledū uz kratītāja (*Elmi Shaker DOS-20L*) 15 min. Pēc inkubācijas lizētās šūnas tika savāktas, centrifugētas (+4°C, 15 min,  $\geq 15\ 000$  g) un supernatants tika izmantots proteīnu koncentrācijas noteikšanai.

#### Proteīnu koncentrācijas noteikšana

Proteīnu koncentrācija tika noteikta pēc *Lowry* metodes ar spektrofotometru (*Eppendorf BioPhotometer*). Tika sagatavots *Lowry A* [20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4 g NaOH, destilēts H<sub>2</sub>O līdz 1 litram] un *Lowry B* šķīdums [1,63 g CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O, 7,68 g K-Na tartrāts, destilēts H<sub>2</sub>O līdz 250 ml, 250 ml 0.2 M NaOH] attiecībā 50:1. Viena parauga apstrādei tika izmantots 1,9 ml gatavā šķīduma, kas sajaukts ar 100  $\mu$ l supernatanta, un iegūtais maisījums tika inkubēts istabas t° 20 min. Pēc inkubācijas maisījumam pievienoja 100  $\mu$ l Folin reaģenta [*Folin Ciocalteus Reagent* un destilēts H<sub>2</sub>O attiecībā 1:1] un inkubēja istabas t° vēl 10 min. Maisījumu centrifugēja (5 min, 5000 g) un 1 ml supernatanta izmantoja proteīnu koncentrācijas noteikšanai spektrofotometrā, aktivizējot mērījumu programmu “*Lowry*”.

## Paraugu sagatavošana proteīnu elektroforēzei

Vienai reakcijai tika izmantots 20µg proteīna un katrs paraugs tika sagatavots 30 µl daudzumā: proteīnu šķīdums tika atšķaidīts ar destilētu ūdeni līdz kopējam daudzumam 15 µl, tad sajaukts ar 15 µl 2X *Loading buffer* [100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% BPB, 20% glicerīns C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>]. Iegūto maisījumu denaturēja termostatā (*Biokom Termo 24–15*) 90°C 10 min.

## Proteīnu sadalīšana gelā

Proteīnu sadalīšanai tika izmantota SDS PAGE elektroforēzes metode 10% poliakrilamīda gelā, kura sastāvs norādīts 2.2. tabulā.

2.2. tabula

Poliakrilamīda gela sastāvs

Sadalošais gels		Koncentrējošais gels	
H <sub>2</sub> O destilēts	3,15 ml	H <sub>2</sub> O destilēts	4,2 ml
30% C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO šķīdums	2,5 ml	30% C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO šķīdums	650 µl
4X Tris – SDS šķīdums, pH 8.8	1,87 ml	4X Tris – SDS šķīdums, pH 6,8	1,6 ml
10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	75 µl	10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	67 µl
TEMED	7,5 µl	TEMED	6,7 µl

Elektroforēzes kamera tika pildīta ar 1X *Run Buffer* [0,192 mM C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>, 0,25 mM Tris-HCl (pH 8,3) un 0,1% SDS] un aktivizēts režīms 200 V, 1 stunda.

## Proteīnu pārnese

Pēc elektroforēzes proteīni no gela tika pārnesti uz PVDF membrānu, izmantojot iekārtu proteīnu pārnesei no gela. Kamera tika piepildīta ar 1X *Transfer Buffer* [0,192 mM C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>, 0,25 mM Tris-HCl un 10% metanola] un aktivizēts režīms 100 V, 1 stunda.

## Bloķēšana un imunodetekcija

Pēc pārnese membrāna tika inkubēta 5% piena šķīdumā *TBS-TWEEN Buffer* [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl un 0,1% *Tween 20*] uz kratītāja (65 apgr./min, 1 stunda), pēc inkubācijas izžāvēta uz filtrpapīra. Imunodetekcijai tika izmantotas *antiERP Rabbit* primārās un *anti Rabbit* sekundārās antivielas. β aktīna ekspresija tika izmantota kā ielādes kontrole un attiecīgi β aktīna imunodetekcijai tika izmantotas *antiβactin Mouse*

primārās un *anti Mouse* sekundārās antivielas. Membrāna tika inkubēta 3 ml primāro antivielu 5% piena šķīdumā (1 : 1000) rotējošā maisītājā (*Elmi Intelli-Mixer RM-2M*) 1 stundu. Pēc inkubācijas membrānu atmazgāja 3 reizes ar 5 ml 1X *TBS-TWEEN Buffer*, inkubējot uz rotējošā maisītāja 5 min. Pēc tam atmazgāto membrānu inkubēja 3 ml sekundāro antivielu 5% piena šķīdumā (1 : 1000) rotējošā maisītājā 1 stundu. Pēc inkubācijas membrānu atmazgāja 3 reizes ar 5 ml 1X *TBS-TWEEN Buffer*, inkubējot uz rotējošā maisītāja 5 min.

## Vizualizācija un analīze

Membrāna tika pilnībā izžāvēta uz filtrpapīra un attīstīta uz *Kodak Bio Max* filmas (*Carestream Health*, ASV), izmantojot *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* detekcijas reaģentu (*GE Healthcare*, Lielbritānija), atbilstoši ražotāja rekomendācijām. Iegūtie attēli tika skanēti (*Canon PIXMA MG2550*) un proteīnu ekspresijas līmenis tika noteikts ar densitometrijas metodi, izmantojot *Fujifilm Luminescent Image Analyzer LAS 1000* attēlu apstrādes programmatūru *Image Reader LAS-1000*.

### 2.2.5. Citotoksicitātes noteikšana

Citotoksicitāte tika noteikta, izmantojot akridīna oranža/etīdija bromīda (AO/EB) atkrāsošanas metodi, pēc *Ribble* un līdzautoru apraksta. Šī metode tika izvēlēta, jo ir minimāli invazīva – nav nepieciešams atdalīt šūnas no virsmas, centrifugēt vai fiksēt, kas būtiski samazina bojājumu risku un līdz ar to iespējams iegūt precīzāku rezultātu. Pielietojot AO/EB metodi, iespējams vienlaicīgi diferencēt dzīvas un nekrotiskas šūnas pēc raksturīga un labi izšķirama krāsojuma.

Citotoksicitātes noteikšanai dienu pirms transfekcijas šūnas tika izsētas uz segstikliņiem 24 iedaļu platē  $1,8 \times 10^5$  šūnas/iedaļā, lai nākamajā dienā sasniegtu ~ 80% konfluenci. Tika veikta LM LFV, LM un LIP optimālos reakcijas apstākļos, izmantojot LacZpDNS un šūnas kultivētas CO<sub>2</sub> inkubatorā 24 stundas. Pēc tam šūnas tika atmazgātas ar 1 ml ledusauksta PBS un tām pievienoja 30 μl PBS ar EB/AO maisījumu (10 μg/ml katra krāsa). Atkrāsotās šūnas (zaļš krāsojums – dzīvas; dzeltens/oranžs/sarkans – apoptotiskas vai mirušas) tika analizētas ar fluorescences mikroskopu *Nikon Eclipse 80i 200X* kopējā palielinājumā, izmantojot *Nikon B2-A* emisijas filtru. Ar *Nikon* kameru tika iegūti digitāli fotoattēli no 5–10 nejauši izvēlētiem laukumiem. Šūnu skaitīšana, izmantojot iegūtos fotoattēlus, tika veikta datorprogrammā *Image J* (*NIH*, ASV), katrā paraugā uzskaitot vismaz 100 šūnas.

## 2.2.6. Dzelzs saturs noteikšana šūnās

Lai pārliecinātos, ka gēnu ekspresijas izmaiņas izraisa šūnās ieslēgto magnētisko kompleksu daudzums, tika veikta šūnu magnētiskā iezīmēšana ar CM un noteikts dzelzs saturs šūnās. Dienu pirms magnētiskās iezīmēšanas PC3 šūnas tika izsētas 24 iedaļu platēs  $1,8 \times 10^5$  šūnas/iedaļā, lai nākamajā dienā sasniegtu ~ 80% konfluenci.

### Šūnu magnētiskā iezīmēšana

Šūnu kultūru barotne tika nomainīta ar 400  $\mu$ l *Opti-MEM* barotnes bez piedevām. CM tika vorteksētas 30 s un 10  $\mu$ g izšķīdināja *Opti-MEM* barotnē līdz kopējam daudzumam 100  $\mu$ l. Maisījums pa pilienam tika pārnesti uz šūnām platē un šūnas inkubētas optimālos apstākļos uz MagnetoFACTOR magnētu sistēmas vai uz *DynaFACTOR* platformas. Pēc inkubācijas šūnas tika kultivētas CO<sub>2</sub> inkubatorā 24 stundas. Dzelzi saturošu šūnu skaits tika noteikts, izmantojot *Prussian blue* (PB) krāsošanas metodi, bet dzelzs daudzums šūnās tika noteikts spektrofotometriski.

### Krāsošana pēc *Prussian blue* metodes

Šūnas tika mazgātas ar 1 ml PBS 3 reizes un fiksētas ar 1 ml FIX reaktīvu [0,05% glutaraldehīda šķīdums PBS] istabas t<sup>o</sup> 15 min. Fiksētās šūnas tika mazgātas ar 1 ml PBS 3 reizes. Tika sagatavots 500  $\mu$ l 2,3% HCl un 2% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> šķīdums attiecībā 1:1, kuru pievienoja šūnām un inkubēja istabas t<sup>o</sup> 30 min. Pēc inkubācijas šūnas tika mazgātas ar 1 ml destilētu ūdeni 3 reizes. Dzelzi saturošas atkrāsotās šūnas (gaiši zils krāsojums) tika analizētas gaismas mikroskopā (*Leitz Labovert FS*) ar kopējo palielinājumu 200X un, izmantojot fotokameru *Sony DSC W-115*, tika iegūti to digitāli fotoattēli no 5–10 nejauši izvēlētiem laukumiem. Šūnu skaitīšana, izmantojot fotoattēlus, tika veikta datorprogrammā *Image J (NIH, ASV)*.

### Spektrofotometriskā analīze

Magnētiski iezīmēto šūnu spektrofotometriskai analīzei tika izmantota uz 1,10-fenontrālīna (1,10-C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>) bāzēta metode. 1,10-C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub> saistās ar Fe<sup>2+</sup>, veidojot kompleksu jonu oranžsarkanā krāsā ar raksturīgu UV absorbciju pie 510 nm.

Šūnas tika mazgātas ar 1 ml PBS 1 reizi un atdalītas no virsmas ar 200 µl DPBS ar 1 mM EDTA. Atdalītās šūnas tika savāktas stobriņos, centrifugētas (5 min; 1000 apgr./min) un mazgātas ar 1 ml PBS, procedūru atkārtojot 2 reizes. No katra parauga tika paņemta 20 µl alikvota šūnu skaita noteikšanai ar hemocitometru. Iegūtā šūnu nogulsne tika šķīdināta 200 µl skābju šķīduma [3M HCl un 0,6M C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>] un inkubēta uz nakti 65°C, lai no CM izdalītu Fe<sup>2+</sup> un Fe<sup>3+</sup> jonus. Nākamajā dienā 100 µl no sagatavotā šķīduma tika pievienots 40 µl 10% ONH<sub>3</sub>·HCl šķīduma (reducē Fe<sup>3+</sup> uz Fe<sup>2+</sup>), 200 µl C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> buferšķīduma [25g C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> un 70 ml ledus etiķskābes maisījums uzpildīts ar dejonizētu ūdeni līdz 100 ml tilpumam] un 100 µl 0.2% 1,10-C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub> šķīduma. Maisījums tika inkubēts istabas t° 10 min. Absorbciija tika mērīta pie 510 nm, izmantojot *Evolution 60S* spektrofotometru. Iekššūnu dzelzs saturs tika kvantificēts attiecībā pret standartlīkni (standartlīknei izmantoti dzelzs hlorīda paraugi ar dzelzs saturu 1,25–10 µg/ml). Dzelzs daudzums šūnās tika izteikts kā vidējais daudzums pg /šūnā, aprēķinot pret kopējo šūnu skaitu plates iedaļā.

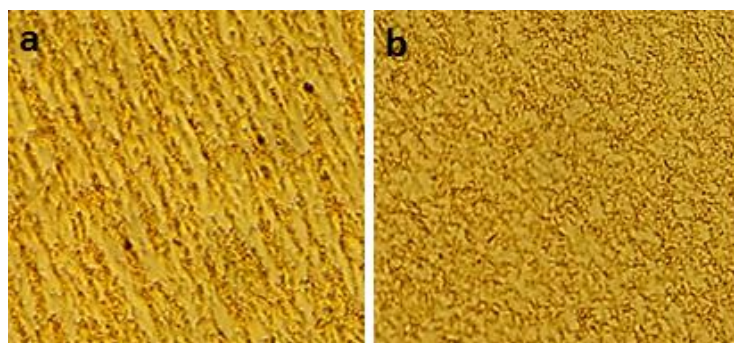
### 1.2.7. Datu statistiskā analīze

Katram eksperimentam tika veikti vismaz trīs secīgi atkārtojumi atbilstoši vadlīnijām. Dati tika izteikti kā vidējās vērtības ± SN (standartnovirze). Datu statistiskā analīze tika veikta programmā *SPSS 15.0 for Windows* (SPSS Inc., ASV). Vispirms tika noteikta paraugkopu atbilstība normālsadalījumam, izmantojot *Shapiro-Wilk* testu, pēc kura rezultātiem tika izvēlētas datu analīzes metodes. Kvantitatīvo datu atšķirība starp divām grupām tika noteikta, izmantojot Stjūdenta t-testu, bet starp trim un vairāk grupām – vienfaktora dispersiju analīzi (*One-way ANOVA*) ar sekojošu *Tukey* testu, kas paredzēts vienāda lieluma paraugkopu salīdzināšanai. P vērtība < 0,05 tika uzskatīta par statistiski nozīmīgu.

### 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 krasas 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 plates 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  $\beta$ -galaktozidāzes ekspresijas PC3 šūnās laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā),  $\times 200$**

Visvairāk  $\beta$ -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  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaitu, vienlaicīgi nenovērojot citotoksisku efektu, arī laika-fāzes variējošā laukā gan PC3, gan HEPG2 šūnās.

Visvairāk  $\beta$ -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  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita tika sasniegts izmantojot 50 nM siRNS pret  $\beta$ -galaktozidāzi.

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

Transfekcijas efektivitātes aprēķinu rezultātā iegūtie rādītāji ar LacZpDNS transkribētās PC3 un HEPG2 šūnās ar variablu ekspozīcijas ilgumu statistiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā apkopoti 3.1. un 3.2. tabulā.

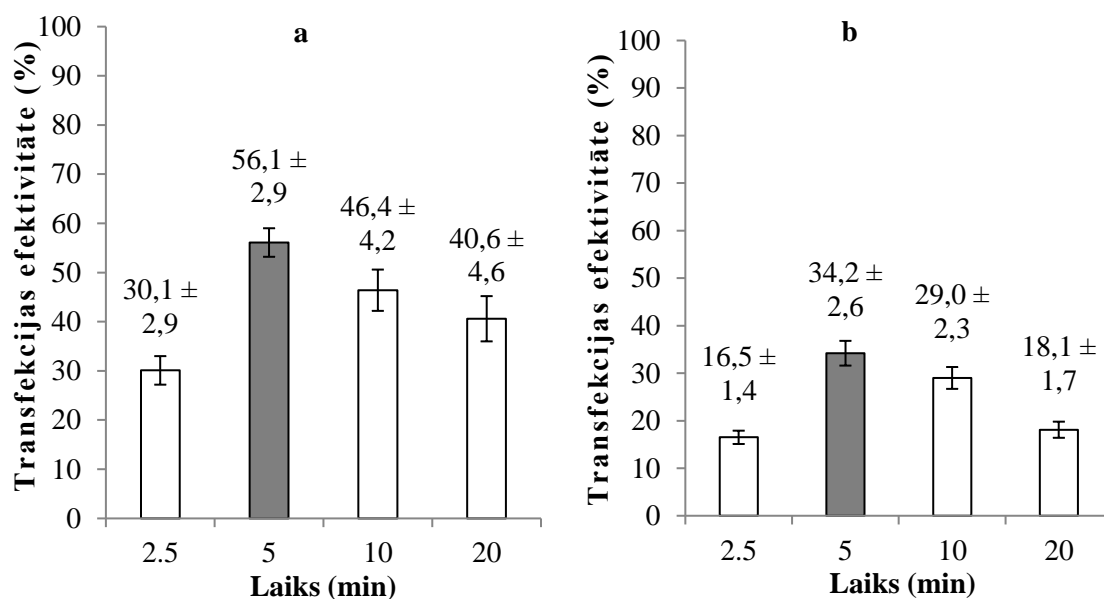
**Transfekcijas efektivitāte (%) PC3 šūnu paraugos pēc 2,5; 5; 10 un 20 min ekspozīcijas magnētiskajā laukā**

Eksp. Nr.	Statiskais magn. lauks				Laika-fāzes magn. lauks			
	2,5 min	5 min	10 min	20 min	2,5 min	5 min	10 min	20 min
1.	28,4	53,2	43,8	35,3	41,8	74,6	53,7	40,0
2.	33,5	59,0	51,2	42,9	43,6	77,3	57,9	45,8
3.	28,5	56,0	44,1	43,6	44,3	78,6	54,4	41,2

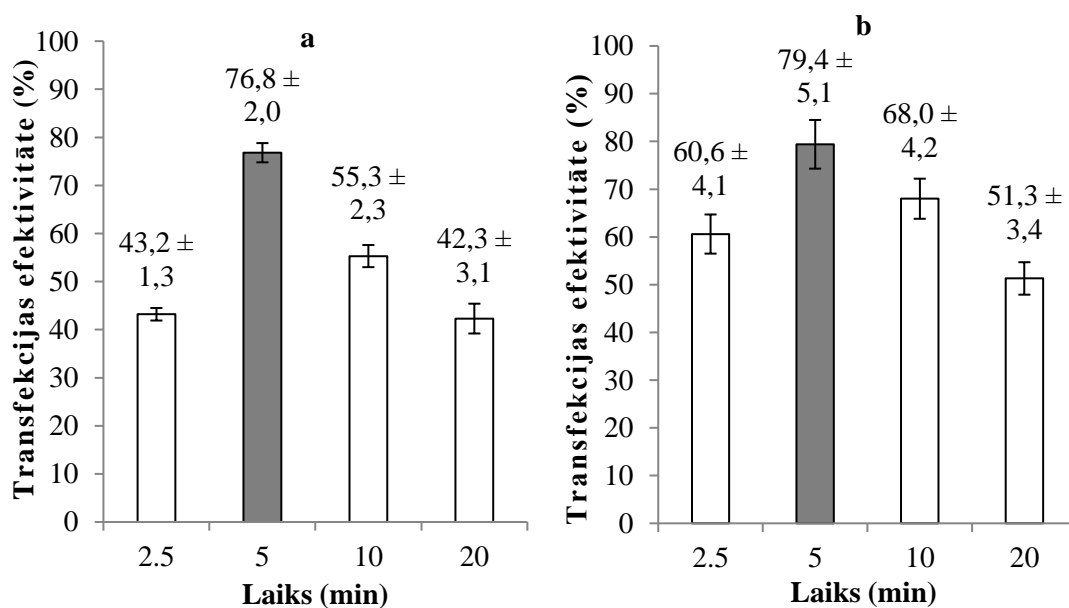
**Transfekcijas efektivitāte (%) HEPG2 šūnu paraugos pēc 2,5; 5; 10 un 20 min ekspozīcijas magnētiskajā laukā**

Eksp. Nr.	Statiskais magn. lauks				Laika-fāzes magn. lauks			
	2,5 min	5 min	10 min	20 min	2,5 min	5 min	10 min	20 min
1.	17,3	36,1	29,5	19,8	65,0	79,0	72,1	54,8
2.	17,3	35,2	31,0	18,2	59,9	84,7	68,2	51,1
3.	14,8	31,2	26,4	16,4	57,0	74,6	63,7	48,1

Visvairāk  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo PC3 un HEPG2 šūnu tika konstatēts pie 5 min ekspozīcijas statistiskajā magnētiskajā laukā (3.3. att.). Palielinot ekspozīcijas ilgumu magnētiskajā laukā,  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita ar variablu ekspozīcijas ilgumu laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (n = 3)

Analogus rezultāts tika iegūts nosakot optimālo ekspozīcijas ilgumu laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā. Visvairāk  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo PC3 un HEPG2 šūnu tika konstatēts pie 5 min ekspozīcijas magnētiskajā laukā (3.4. att.). Līdzīgi kā statistiskā 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 apgriezību frekvences un magnētiskā lauka gradienta ietekme uz LacZ gēna ekspresiju.

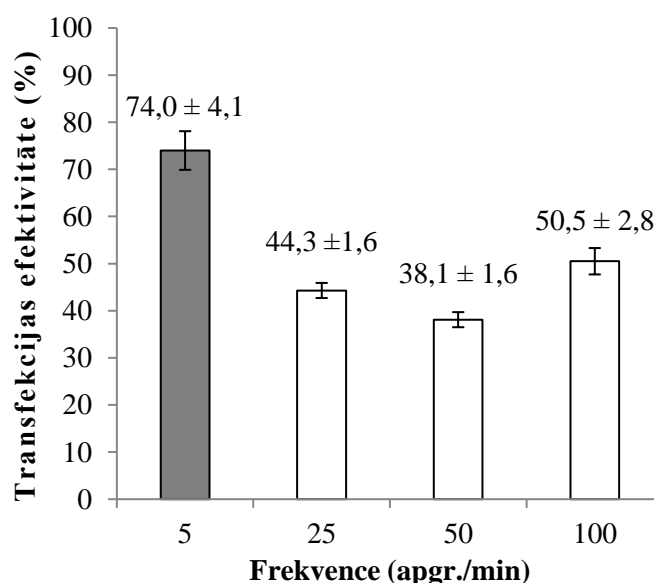
Transfekcijas efektivitātes aprēķinu rezultātā iegūtie rādītāji ar LacZpDNS transficētās PC3 šūnās pie variablas magnētu apgriezību frekvences laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā apkopoti 3.3. tabulā.

3.3. tabula

**Transfekcijas efektivitāte (%) PC3 šūnu paraugos pie 5; 25; 50 un 100 apgr./min magnētu apgriezību frekvences**

Eksp. Nr.	5 apgr./min	25 apgr./min	50 apgr./min	100 apgr./min
1.	70,9	42,8	36,9	47,6
2.	72,4	44,0	39,9	50,8
3.	78,6	46,0	37,6	53,2

Analizējot transfekcijas efektivitāti pēc  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita PC3 šūnās, pie dažādām rotējošas magnētu sistēmas magnētu apgriezību 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 apgriezību frekvenci (25 un 50 apgr./min), vērojams straujš transfekcijas efektivitātes kritums, bet pie 100 apgr./min transfekcijas efektivitāte atkal paaugstinās.



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

Transfekcijas efektivitātes aprēķinu rezultātā iegūtie rādītāji ar LacZpDNS transficētās

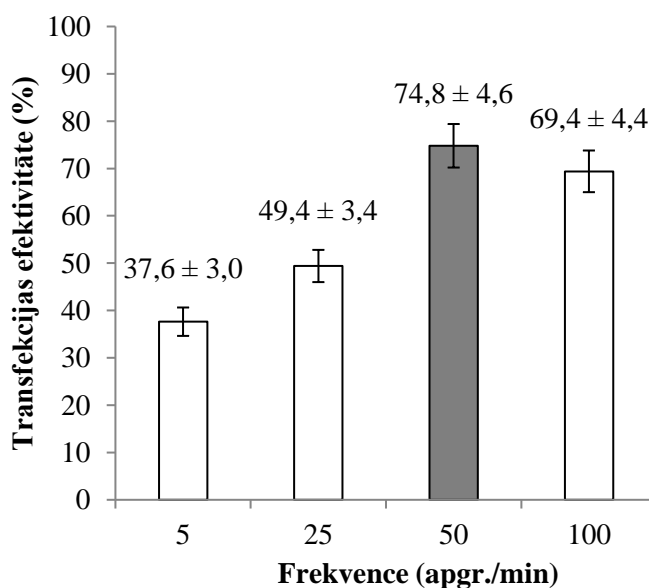
HEPG2 šūnās ar variablu magnētu apgriezību frekvenci laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā parādīti 3.4. tabulā.

3.4. tabula

**Transfekcijas efektivitāte (%) HEPG2 šūnu paraugos pie 5; 25; 50 un 100 apgr./min magnētu apgriezību frekvences**

Eksp. Nr.	5 apgr./min	25 apgr./min	50 apgr./min	100 apgr./min
1.	41,1	52,0	77,4	74,4
2.	36,8	50,6	77,5	67,9
3.	35,3	45,5	69,4	66,0

HEPG2 šūnās augstākie LacZ piegādes efektivitātes rādītāji pēc  $\beta$ -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.



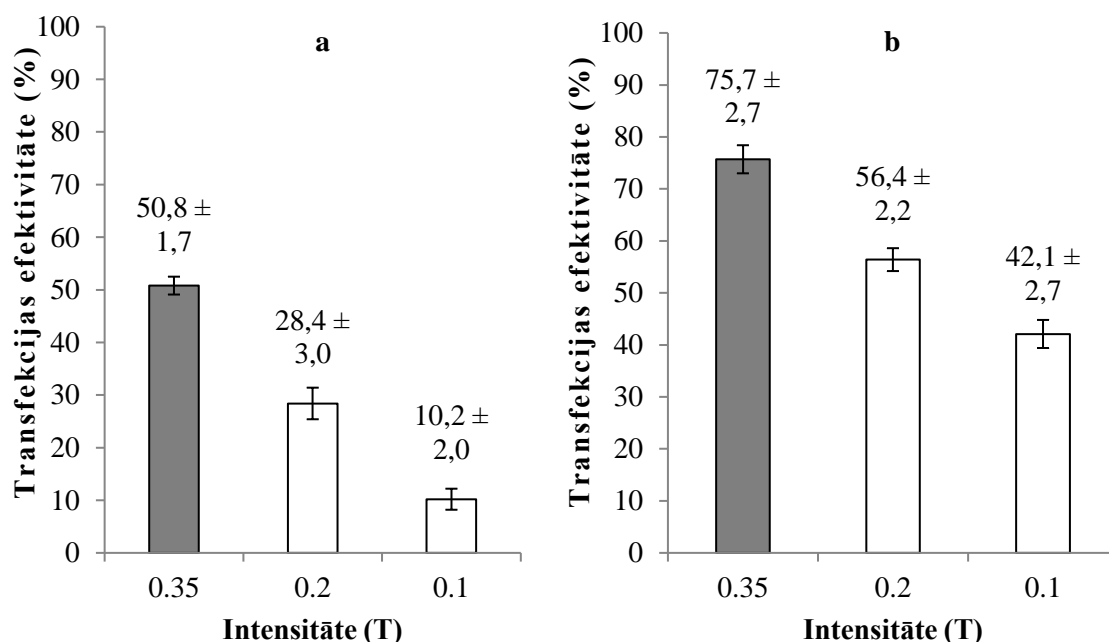
**3.6. attēls. Transfekcijas efektivitāte HEPG2 šūnās pēc  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita ar variablu magnētu apgriezību frekvenci pie 5 min ekspozīcijas laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā (n = 3)**

Transfekcijas efektivitātes aprēķinu rezultātā iegūtie rādītāji ar LacZpDNS transficētajās PC3 šūnās ar variablu magnētu magnētiskā lauka intensitāti statistiskajā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā apkopoti 3.5. tabulā.

**Transfekcijas efektivitāte (%) PC3 šūnu paraugos pie 0,35; 0,2 un 0,1 T magnētiskā lauka intensitātes**

Eksp. Nr.	Statiskais magn. lauks			Laika-fāzes magn. lauks		
	0,35 T	0,2 T	0,1 T	0,35 T	0,2 T	0,1 T
1.	49,3	25,8	8,8	72,9	54,0	42,6
2.	52,6	27,6	9,3	76,1	56,9	44,6
3.	50,5	31,7	12,4	78,2	58,4	39,2

Analizējot transfekcijas efektivitātes izmaiņas atkarībā 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  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita ar optimālu magnētiskā lauka ekspozīcijas ilgumu/frekvenci un variablu magnētiskā lauka intensitāti statiskajā 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 statiskajā 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  $\beta$ -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, apkopoti 3.6. tabulā.

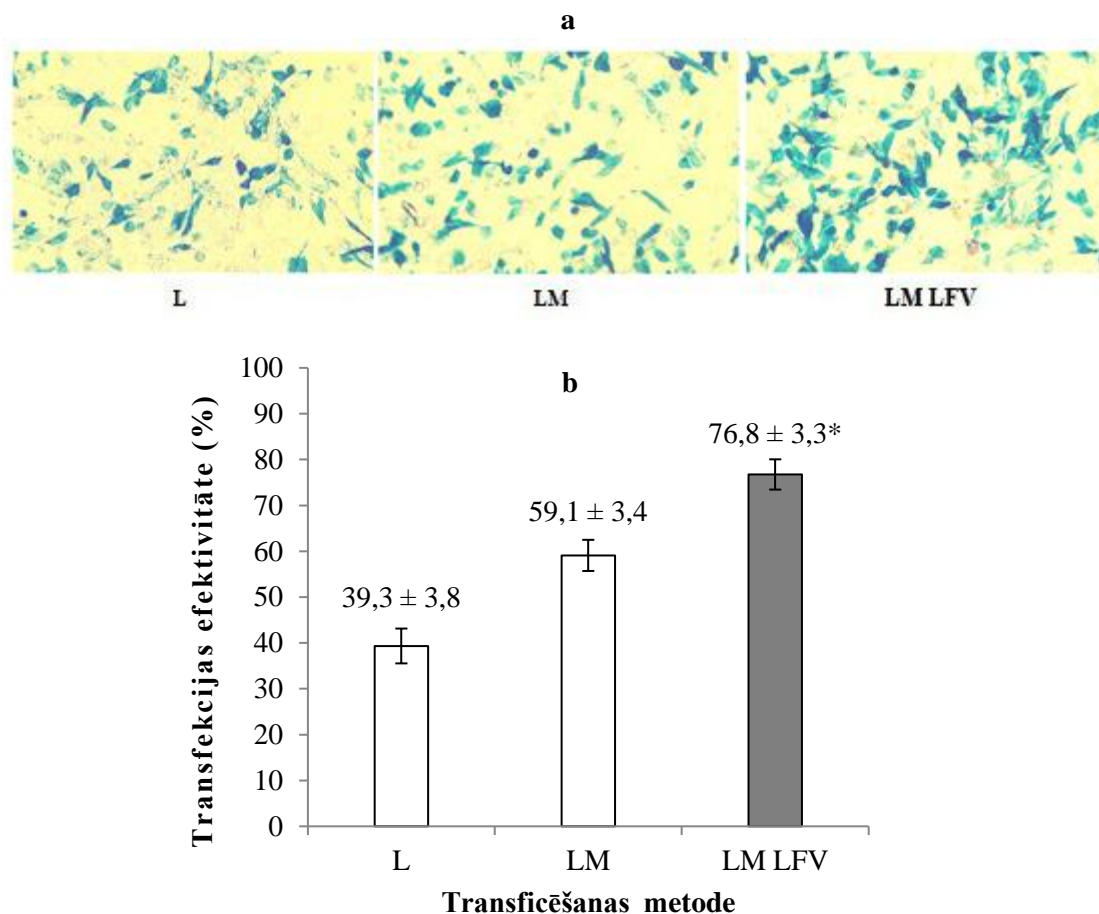
3.6. tabula

**Transfekcijas efektivitāte (%) ar dažādām metodēm transficētu PC3 šūnu paraugos**

Eksp. Nr.	L	LM	LM LFV
1.	33,9	50,9	74,9
2.	35,0	59,5	73,9
3.	35,4	58,2	69,8
4.	40,0	58,0	78,3
5.	41,7	60,1	79,6
6.	41,2	60,8	79,0
7.	43,2	62,2	77,7
8.	44,4	61,0	78,6
9.	39,0	61,0	79,2

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  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita – 79,6% transficēto šūnu, kas ir par 21% vairāk, salīdzinot ar LM un par 42% vairāk, salīdzinot ar L.

Turklāt tika novērots, ka ar LM LFV metodi transficētajās, 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  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaits, bet arī pieaug  $\beta$ -galaktozidāzes ekspresijas līmenis transficētajās šūnās.



3.8. attēls. *LacZ* gēna piegāde PC3 šūnās, izmantojot trīs dažādas gēnu piegādes metodes: (a)  $\beta$ -galaktozidāzes ekspresija PC3 šūnās ( $\times 200$ ), (b) transfekcijas efektivitāte pēc  $\beta$ -galaktozidāzi 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. Relatīvā proteīnu daudzuma (densitometriskajās vienībās), kas atspoguļo ECFP-ERp29 proteīnu ekspresijas līmeni novērtējuma rezultāti apkopoti 3.7. tabulā.

3.7. tabula

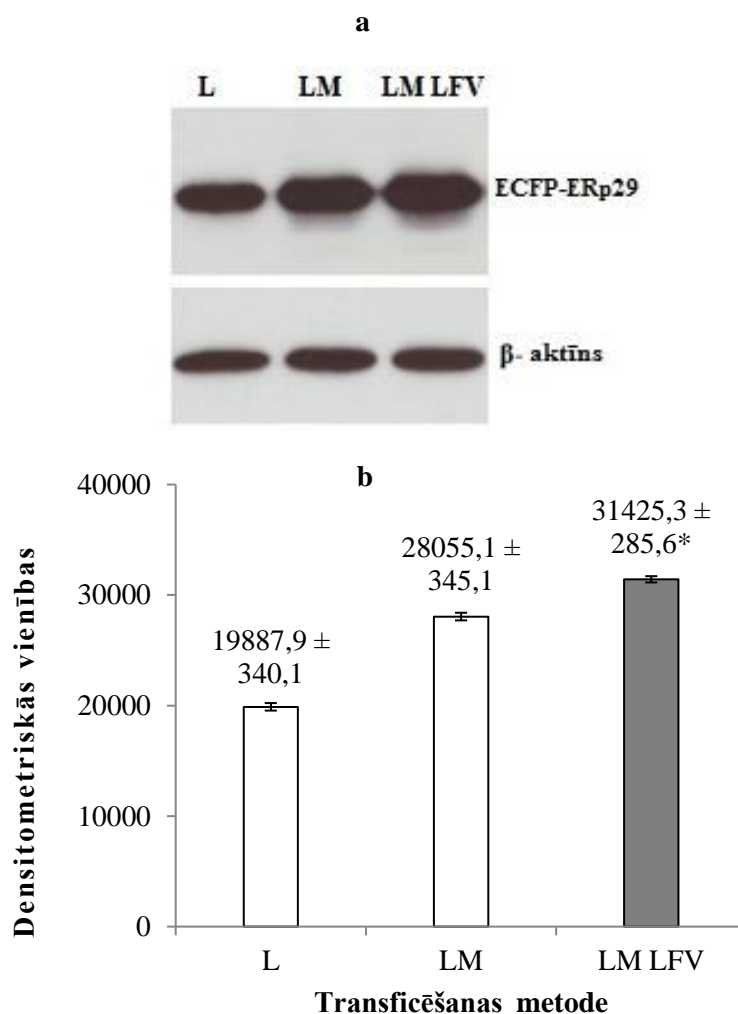
Relatīvais proteīnu daudzums ar dažādām metodēm transficētu PC3 šūnu paraugos

Eksp. Nr.	L	LM	LM LfV
1.	19864,8	30656,5	33907,7
2.	19616,5	30582,1	33873,7
3.	19328,5	29764,4	33930,4
4.	20443,0	29707,9	34264,0
5.	20056,3	30530,5	33496,0
6.	19971,7	30116,2	34066,8
7.	20251,3	30217,6	33823,9



Eksp.Nr.	L	LM	LM LFV
8.	19809,9	30011,2	33609,2
9.	19649,5	30324,6	34395,0

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 (3.9. att. (a)). LM LFV gadījumā kopējais ECFP-ERp29 ekspresijas līmenis ir par 6% augstāks, salīdzinot ar LM un par 22% augstāks, salīdzinot ar L (3.9. att. (b)).



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

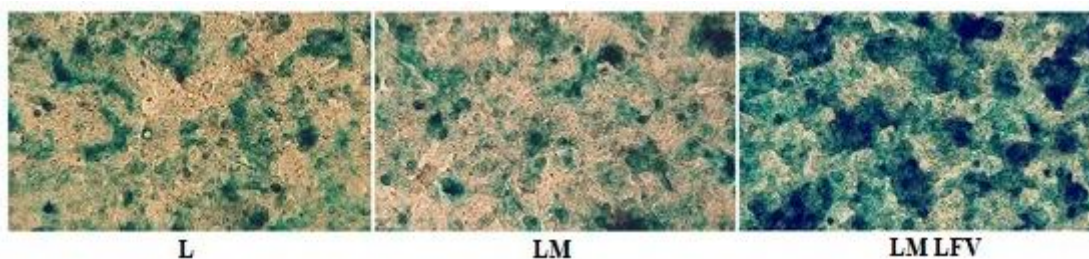
iedarbībai, liposomālo magnetofekciju statistiskajā magnētiskajā laukā un laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā optimālos apstākļos, apkopoti 3.8. tabulā.

3.8. tabula

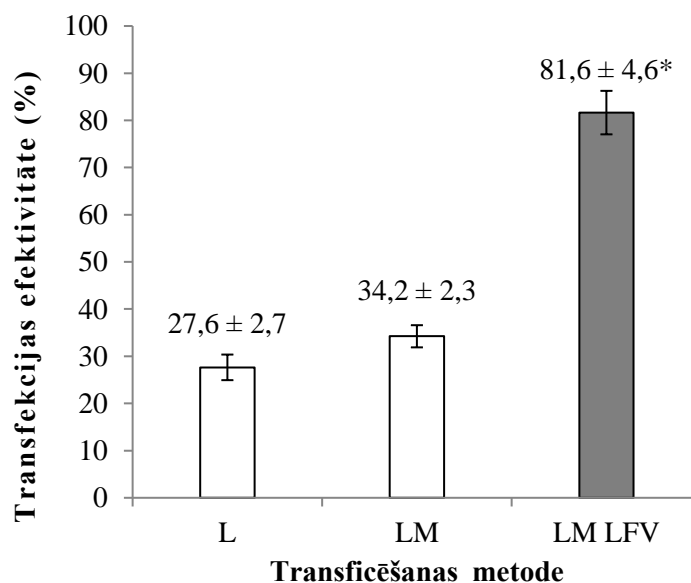
**Transfekcijas efektivitāte (%) ar dažādām metodēm transficētu HEPG2 šūnu paraugos**

Eksp. Nr.	L	LM	LM LFV
1.	32,3	37,0	87,2
2.	30,0	37,2	86,1
3.	30,2	35,2	87,7
4.	28,7	33,9	79,6
5.	26,1	35,6	79,1
6.	24,5	34,1	75,4
7.	26,9	31,0	83,3
8.	26,1	30,3	80,0
9.	24,0	33,6	76,4

a



b



3.10. attēls. **LacZ** gēna piegāde HEPG2 šūnās, izmantojot trīs dažādas gēnu piegādes metodes: (a)  $\beta$ -galaktozidāzes ekspresija HEPG2 šūnās ( $\times 200$ ), (b) transfekcijas efektivitāte pēc  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo šūnu skaita ( $n = 9$ ; \*  $p < 0,05$ , salīdzinot ar L un LM, *Tukey tests*)

Tika konstatēts, ka LM LFV ietekmē būtiski paaugstinās transfekcijas efektivitāte arī HEPG2 šūnās ( $p < 0,001$ ) salīdzinājumā ar abām pārējām metodēm – L un LM. Pielietojot LM LFV, iespējams sasniegt visaugstāko transfekcijas efektivitāti pēc  $\beta$ -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.

Relatīvā proteīnu daudzuma (densitometriskajās vienībās), kas norāda uz ECFP-ERp29 proteīnu ekspresijas līmeni novērtējuma rezultāti apkopoti 3.9. tabulā.

3.9. tabula

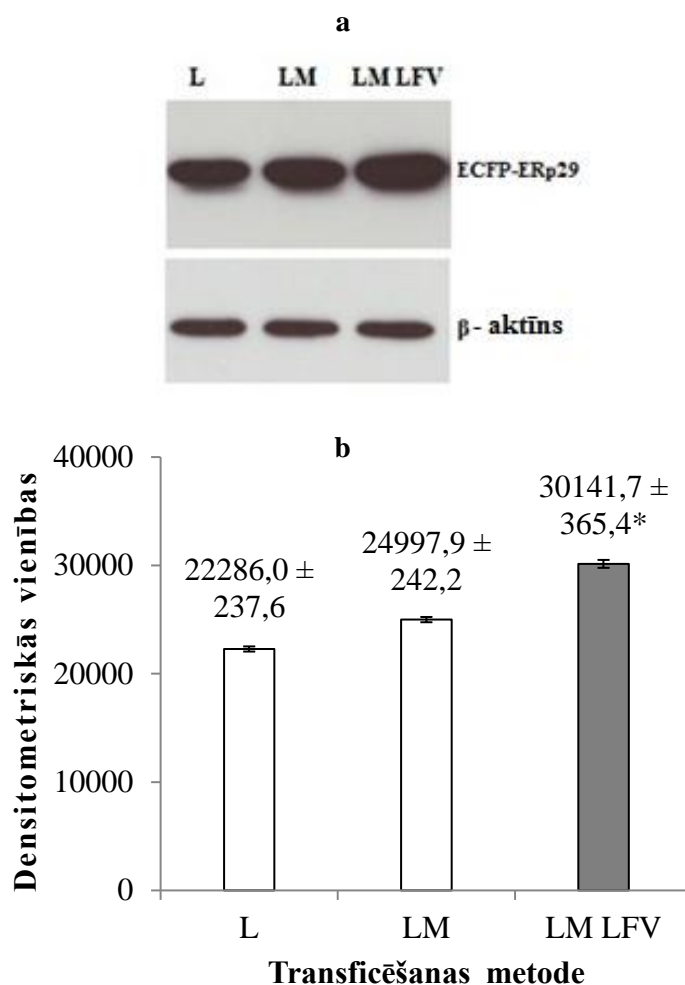
**Relatīvais proteīna daudzums ar dažādām metodēm transficētu HEPG2 šūnu paraugos**

Eksp. Nr.	L	LM	LM LFV
1.	22721,1	24645,4	30427,4
2.	22641,3	25117,6	31459,2
3.	22548,7	24926,8	30545,6
4.	23085,6	25310,5	30979,6
5.	22639,7	25024,2	30647,2
6.	22465,3	25204,5	30514,2
7.	22756,9	25204,6	30223,4
8.	22725,1	24918,0	30871,8
9.	22207,9	24629,6	30865,8

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

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 transficētajās šūnās.



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)

Ko-transfekcijas eksperimentos tika pārbaudīts siRNS inhibējošais efekts uz  $\beta$ -galaktozidāzes ekspresiju PC3 šūnās, izmantojot dažādas gēnu piegādes metodes. Iegūtie rezultāti atspoguļoti 3.10. tabulā.

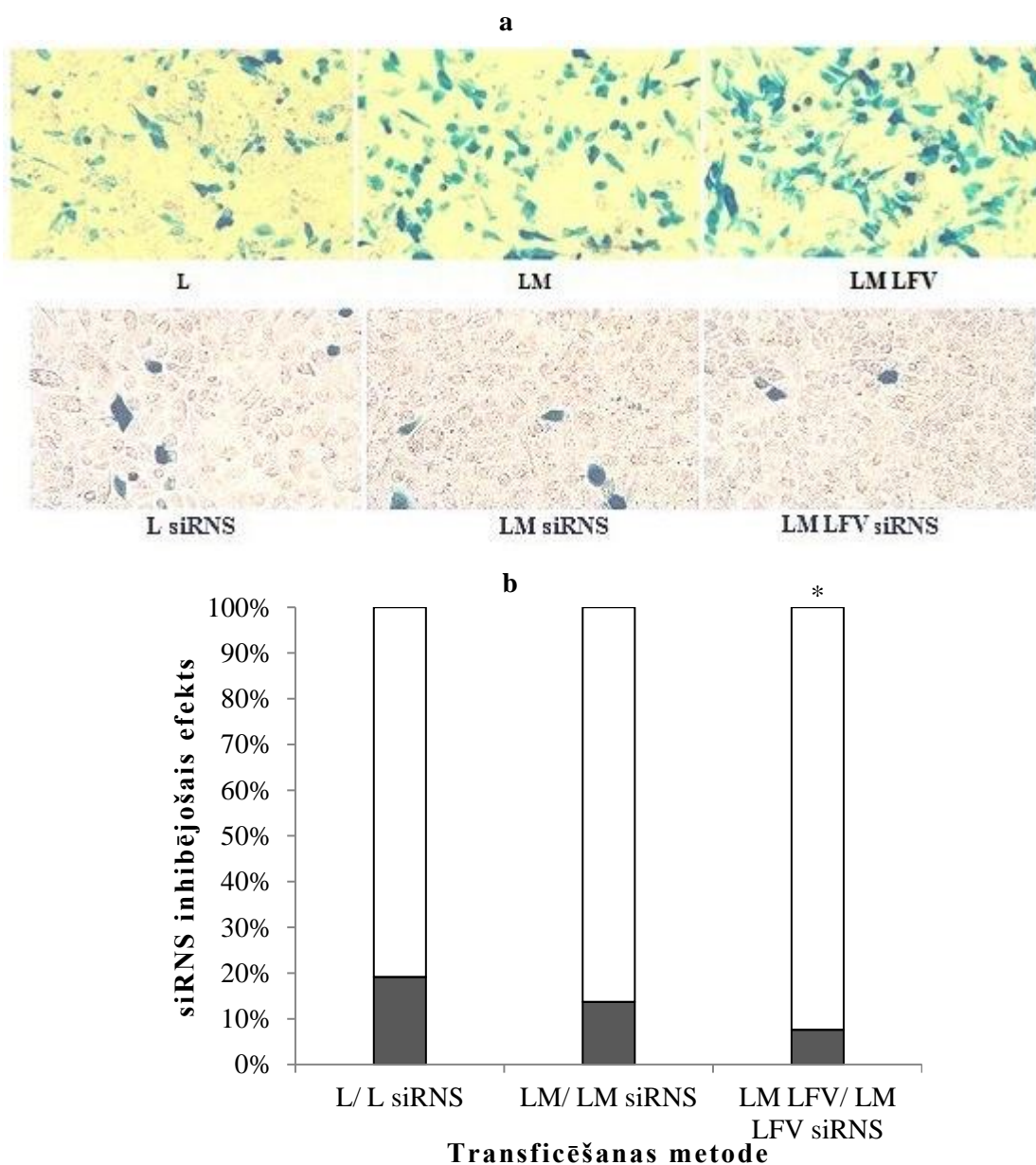
3.10. tabula

Transfekcijas efektivitāte (%) ar dažādām metodēm transficētu un ko-transficētu PC3 šūnu paraugos

Eksp. Nr.	L	L siRNS	LM	LM siRNS	LM LVF	LM LFV siRNS
1.	43,1	9,8	59,8	9,1	78,0	6,2
2.	44,8	10,0	60,0	9,0	75,3	6,0
3.	43,8	9,9	60,0	8,9	79,0	6,0
4.	39,5	9,6	54,2	9,2	70,1	6,0
5.	38,2	9,6	55,1	8,8	71,2	5,9

Eksp. Nr.	L	siRNS	LM	LM siRNS	LM LFV	LM LFV si RNS
6.	34,7	10,1	51,1	9,0	69,9	6,1
7.	42,2	9,9	56,8	9,2	77,5	6,2
8.	43,1	9,7	56,0	8,9	73,4	6,1
9.	44,1	10,0	58,1	9,2	76,4	6,0

Tika panākta būtiska siRNS inhibējoša ietekme uz  $\beta$ -galaktozidāzes ekspresiju PC3 šūnās ( $p < 0,001$ ), pielietojot visas trīs gēnu piegādes metodes (3.12. att. (a)).



3.12. attēls. LacZ gēna un siRNS pret  $\beta$ -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  $\beta$ -galaktozidāzi (pelēks) ( $n = 9$ ; \*  $p < 0,05$ , salīdzinot ar L/L siRNS un LM/LM siRNS, Tukey tests)

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  $\beta$ -galaktozidāzes ekspresiju inhibējošais efekts – 92,4%  $\beta$ -galaktozidāzi neekspresējošu šūnu, kas ir būtiski vairāk, salīdzinot ar LM (86,3%) un L (80,9%) ( $p < 0,001$ ) (3.12. att. (b)).

### 3.2.3. Laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka pielietojuma citotoksiskais efekts

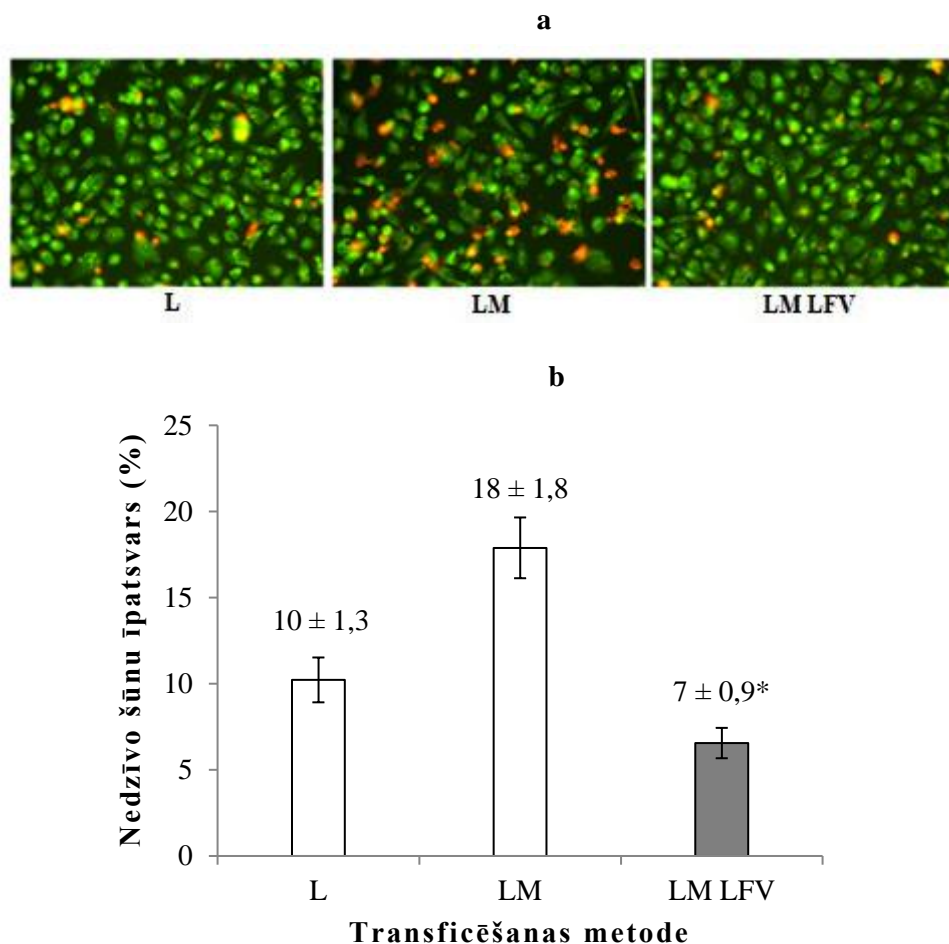
Ar LacZpDNS transficētu PC3 šūnu dzīvo/nedzīvo šūnu attiecības aprēķinu rezultātā iegūtie rādītāji apkopoti 3.11. tabulā.

3.11. tabula

**Nedzīvo šūnu īpatsvars (%) ar dažādām metodēm transficētu PC3 šūnu paraugos**

Eksp. Nr.	L	LM	LM LFV
1.	13	16	6
2.	9	17	7
3.	10	17	6
4.	10	20	7
5.	9	21	6
6.	11	18	5
7.	11	16	7
8.	10	17	7
9.	9	19	8

Vizuāli visaugstākais citotoksiskais efekts tika novērots ar LM transficētu PC3 šūnu paraugos (3.13. att. (a)). Aprēķinu rezultātā tika konstatēts, ka LM LFV ietekmē būtiski samazinās apoptotisko 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% ( $p < 0,001$ ).

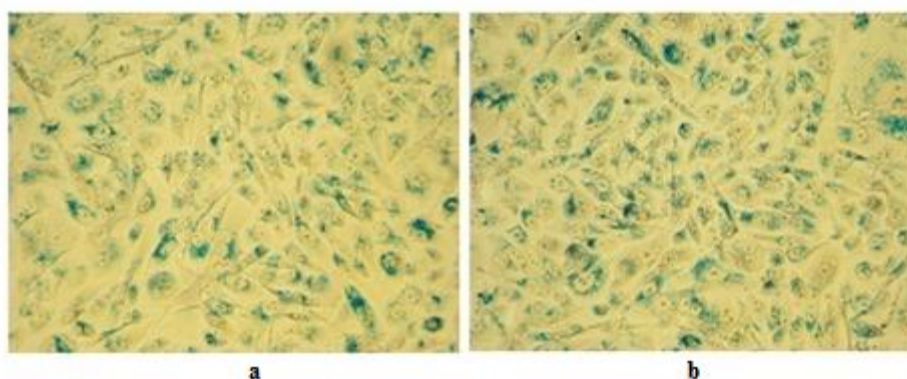


3.13. attēls. Dažādu gēnu piegādes metožu pielietojuma citotoksiskais efekts: (a) ar trim dažādām gēnu piegādes metodēm transficētas un pēc AO/EB metodes atkrāsotās PC3 šūnas ( $\times 200$ ), (b) citotoksicitāte ( $n = 9$ ; \*  $p < 0,05$ , salīdzinot ar L un LM, *Tukey tests*)

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

Lai netieši apstiprinātu iepriekšējās eksperimentu sērijās konstatēto, ka  $\beta$ -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  $\mu\text{g}$  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.

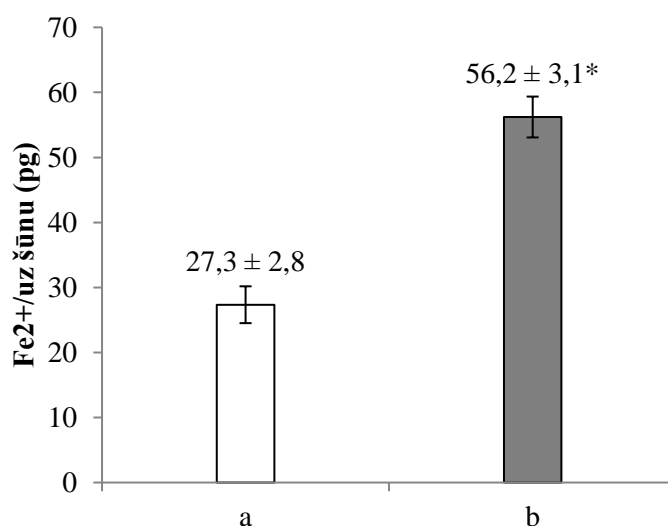
Lai apstiprinātu iegūtos rezultātus pēc PB krāsojuma, tika kvantitatīvi novērtēts šūnās ieslēgto SPION daudzums, veicot dzelzs satura spektrofotometrisku analīzi ar SPION magnētiski iezīmētās šūnās. Aprēķinu rezultāti apkopoti 3.12. tabulā.

3.12. tabula

PC3 šūnās internalizētās dzelzs daudzums (pg) dažādu magnētisko lauku ietekmē

Eksp.Nr.	Statiskais magn. lauks	Laika-fāzes magn. lauks
1.	30,0	59,0
2.	30,5	58,8
3.	29,5	59,1
4.	27,7	57,4
5.	28,4	57,9
6.	28,5	56,0
7.	22,9	55,1
8.	25,2	52,4
9.	23,4	50,2





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 variējoša 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 variējošā 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 statiskajā 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 pārnešanu 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 plates 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 “solī 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  $\beta$ -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 apgriezību frekvences – nozīmīgākā laika-fāzes variējošā magnētiskā lauka raksturojošā rādītāja. Datorsimulācijās tika parādīts, ka SPION sedimentācija uz virsmas ir atkarīga no magnētu apgriezību frekvences – palielinot magnētu apgriezību frekvenci  $\omega$  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 apgriezību frekvences, bet atšķirīgi dažādās šūnu līnijās. Vislielākais  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo PC3 šūnu skaits tika iegūts pie 5 apgr./min ar 5 min ekspozīciju magnētiskajā laukā, savukārt vislielākais  $\beta$ -galaktozidāzi ekspresējošo HEPG2 šūnu skaits – ar 5 min ekspozīciju magnētiskajā laukā pie magnētu apgriezību 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

Pārlicinoši rezultāti tika iegūti pārbaudot siRNS inhibējošo efektu uz  $\beta$ -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 izkliedējas 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 statistiskā magnētiskā lauka ietekmē izskaidro augstos LM citotoksicitātes rādītājus. SPION citotoksiskais efekts statistiskā magnētiskā lauka ietekmē plaši analizēts *Bae* un līdzautoru pētījumā. Autori pierādījuši, ka mērena statistiskā 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 variējošā magnētiskā lauka ietekmē šūnās iekļūst vairāk SPION. Tādējādi ir pamats uzskatīt, ka laika-fāzes variējošā 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*<sup>TM</sup>. 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 plātes iedaļas virsmas laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā laterālās 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 statiskajā 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 apgriezienu frekvence (apgr./min) ir viens no būtiskākajiem laika-fāzes variējoša magnētiskā lauka raksturlielumiem. Atšķirīga optimālā magnētu apgriezienu frekvence pie identiska ekspozīcijas ilguma magnētiskajā laukā PC3 šūnās (5 apgr./min) un HEPG2 šūnās (50 apgr./min) norāda uz to, ka magnētu apgriezienu 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 variējošā 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.



## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Adams C.F., Pickard M.R., Chari D.M. Magnetic nanoparticle mediated transfection of neural stem cell suspension cultures is enhanced by applied oscillating magnetic fields // *Nanomed*, 2013; 9 (6): 737–741.
2. Ahmed N, Fessi H., Elaissari A. Theranostic applications of nanoparticles in cancer // *Drug Discov Today*, 2012; 17 (17-18): 928–934.
3. Alexiou C., Jurgons R., Schmid R.J., et al. Magnetic drug targeting-biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment // *J Drug Target*, 2003; 11 (3): 139–149.
4. Alsaggar M., Liu D. Physical methods for gene transfer // *Adv Genet*, 2015; 89: 1–24.
5. 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.
6. Apodaca G. Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli // *Am J Physiol Ren Physiol*, 2002; 282 (2): F179–F190.
7. Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III // *J Exp Med*, 1944; 79 (2): 137–158.
8. Babincova M., Babinec P. Magnetic drug delivery and targeting: principles and applications // *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2009; 153 (4): 243–250.
9. 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.
10. Bareford L.M., Swaan P.W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery // *Adv Drug Deliv Rev*, 2007; 59 (8): 748–758.
11. Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D., et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years // *Science*, 1995; 270 (5235): 475–480.
12. Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer // *Biochim Biophys Acta*, 2011; 1816 (2): 232–246.
13. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92 (16): 7297–7301.
14. Breimer D.D. Future challenges for drug delivery research // *Adv Drug Deliv Rev*, 1998; 33 (3): 265–268.
15. Bumb A., Regino C.A.S, Perkins M.R., et al. Preparation and characterization of a magnetic and optical dual-modality molecular probe // *Nanotechnol*, 2010; 21 (17): 175704.
16. Bushman F.D. Retroviral integration and human gene therapy // *J Clin Invest*, 2007; 117 (8): 2083–2086.
17. Byrne J.D., Betancourt T., Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics // *Adv Drug Deliv Rev*, 2008; 60 (15): 1615–1626.
18. Cassidy J., Schätzlein A.G. Tumour-targeted drug and gene delivery: principles and concepts // *Expert Rev Mol Med*, 2004; 6 (19): 1–17.
19. Cepko C.L., Roberts B.E., Mulligan R.C. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector // *Cell*, 1984; 37 (3): 1053–1062.
20. Cevher E., Sezer A.D., E.Ş. Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy // *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems* / Ed. by Sezer A.D., 2012. – ISBN: 978-51-0810-8.
21. Cha E., Daud A. Plasmid IL-12 electroporation in melanoma // *Hum Vaccin Immunother*, 2012; 8 (11): 1734–1738.
22. Chen C.B., Chen J.Y., Lee W.C. Fast transfection of mammalian cells using superparamagnetic nanoparticles under strong magnetic field // *J Nanosci Nanotechnol*, 2009; 9 (4): 2651–2659.
23. 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.

24. Chertok B., Moffat B., David A., et al. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors // *Biomaterials*, 2008; 29 (4): 487–496.
25. Chithrani B.D., Ghazani A., Chan W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells // *Nano Lett*, 2006; 6 (4): 662–668.
26. Cromer Berman S.M., Walczak P., Bulte J.W. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles // *Biomaterials*, 2011; 32 (35): 9401–9414.
27. 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.
28. de Baere T., Deschamps F. New tumor ablation techniques for cancer treatment (microwave, electroporation) // *Diagn Interv Imaging*, 2014; 95 (7-8): 677–682.
29. Dean D.A. Microinjection // *Reference Module in Biomedical Sciences*, 2013; 409–410.
30. Delalande A., Kotopoulos S., Postema M., et al. Sonoporation: Mechanistic insights and ongoing challenges for gene transfer // *Gene*, 2013; 525 (2): 191–199.
31. Dennig J., Duncan E. Gene transfer into eukaryotic cells using activated polyamidoamine dendrimers // *J Biotechnol*, 2002; 90 (3-4): 339–347.
32. Dick T., Hengst J., Yun J. Gene Therapy // *Reference Module in Biomedical Sciences*, 2015.
33. Durand S., Cimarelli A. The inside out of lentiviral vectors // *Viruses*, 2011; 3 (2): 132–159.
34. Easo S.L., Mohanan P.V. Dextran stabilized iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and *in vitro* studies // *Carb Polym*, 2013; 92 (1): 726–732.
35. Fan Z., Kumon R.E., Deng C.X. Mechanisms of microbubble-facilitated sonoporation for drug and gene delivery // *Ther Deliv*, 2014; 5 (4): 467–486.
36. Fang C., Zhang M. Multifunctional magnetic nanoparticles for medical imaging applications // *J Mater Chem*, 2009; 19: 6258–6266.
37. Fouriki A., Farrow N., Clements M.A., Dobson J. Evaluation of the magnetic field requirements for nanomagnetic gene transfection // *Nano Rev*, 2010; 1: 5167.
38. Fraley R., Subramani S., Berg P., Papahadjopoulos D. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells // *J Biol Chem*, 1980; 255 (21): 10431–10435.
39. Futreal P.A., Coin L., Marshall M., et al. A census of human cancer genes // *Nat Rev Cancer*, 2004; 4 (3): 177–183.
40. Gautier J., Munnier E., Paillard A., et al. A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting // *Int J Pharm*, 2012; 423 (1): 16–25.
41. Gersting S.W., Schillinger U., Lausier J., et al. Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection // *J Gene Med*, 2004; 6 (8): 913–922.
42. Glorioso J.C. Herpes simplex viral vectors: late bloomers with big potential // *Hum Gene Ther*, 2014; 25 (2): 83–91.
43. 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.
44. 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.
45. Gupta A.K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications // *Biomaterials*, 2005; 26 (18): 3995–4021.
46. Hajjani P., Larachi F. Controlling lateral nanomixing and velocity profile of dilute ferrofluid capillary flows in uniform stationary, oscillating and rotating magnetic fields // *Chem Eng J*, 2013; 223: 454–466.
47. Hareendran S., Balakrishnan B., Sen D., et al. Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy: immune challenges and strategies to circumvent them // *Rev Med Virol*, 2013; 23 (6): 399–413.
48. He C.H., Tabata Y., Gao J.Q. Non-viral gene delivery carrier and its three-dimensional transfection system // *Int J Pharm*, 2010; 386 (1-2): 232–242.
49. Hellebrand E., Mautner J., Reisbach G., et al. Epstein-Barr virus vector-mediated gene transfer into human B cells: potential for antitumor vaccination // *Gene Ther*, 2006; 13 (2): 150–162.
50. Hillaireau H., Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery // *Cell Mol Life Sci*, 2009; 66 (17): 2873–2896.

51. 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.
52. Hollon T. Researchers and regulators reflect on first gene therapy death // *Nat Med*, 2000; 6 (1): 6.
53. Huang R.B., Mocherla S., Heslinga M.J., et al. Dynamic and cellular interactions of nanoparticles in vascular-targeted drug delivery // *Mol Membr Biol*, 2010; 27 (4-6): 190–205.
54. Hunter A.C. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity // *Adv Drug Deliv Rev*, 2006; 58 (14): 1523–1531.
55. 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.
56. Huttinger C., Hirschberger J., Jahnke A., et al. Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: A phase I trial // *J Gene Med*, 2008; 10 (6): 655–667.
57. Ibraheem D., Elaissari A., Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems // *Int J Pharm*, 2014; 459 (1-2): 70–83.
58. Jafari M., Soltani M., Naahidi S., et al. Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery // *Curr Med Chem*, 2012; 19 (2): 197–208.
59. Jahnke A., Hirschberger J., Fischer C., et al. Intra-tumoral gene delivery of feIL-2, feIFN-c and feGM-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas: A phase-I study // *J Vet Med*, 2007; A54: 599–606.
60. 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.
61. Jhaveri A.M., Torchilin V.P. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA // *Front Pharmacol*, 2014; 5: 77.
62. Juratli T.A., Schackert G., Krex D. Current status of local therapy in malignant gliomas — A clinical review of three selected approaches // *Pharm Ther*, 2013; 139 (3): 341–358.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. Kievit F.M., Veiseh O., Fang C., et al. Chlorotoxin labeled magnetic nanovectors for targeted gene delivery to glioma // *ACS Nano*, 2010; 4 (8): 4587–4594.
67. Klinghoffer R.A., Bahrami S.B., Hatton B.A., et al. A technology platform to assess multiple cancer agents simultaneously within a patient's tumor // *Sci Transl Med*, 2015; 7 (284): 284–258.
68. Kohn D.B., Sadelain M., Glorioso J.C. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID // *Nat Rev Cancer*, 2003; 3 (7): 477–488.
69. 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.
70. Krafcik A., Babinec P., Frollo I. Computational analysis of magnetic field induced deposition of magnetic particles in lung alveolus in comparison to deposition produced with viscous drag and gravitational force // *J Mag Mag Mater*, 2015; 380: 46–53.
71. Krötz F., Sohn H.Y., Gloe T., et al. Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells // *J Vasc Res*, 2003; 40 (5): 425–434.
72. Kumar A., Jena P.K., Behera S., et al. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery // *Nanomed*, 2010; 6 (1): 64–69.
73. Kumar M., Yigit M., Dai G., et al. Image-guided breast tumor therapy using a small interfering RNA nanodrug // *Cancer Res*, 2010; 70 (19): 7553–7561.
74. Lachmann P.J., Davies A. Complement and immunity to viruses // *Immunol Rev*, 1997; 159 (1): 69–77.
75. Lam T., Pouliot P., Avti P.K., et al. Superparamagnetic iron oxide based nanoprobe for imaging and theranostics // *Adv Coll Int Sci*, 2013; 199-200: 95–113.
76. Laurent N., Sapet C., le Gourrierc L., et al. Nucleic acid delivery using magnetic nanoparticles: The magnetofection technology // *Ther Deliv*, 2011; 2 (4): 471–482.

77. Laurent S., Forge D., Port M., et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications // *Chem Rev*, 2008; 108 (6): 2064–2110.
78. Lehner R., Wang X., Marsch S., Hunziker P. Intelligent nanomaterials for medicine: carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application // *Nanomed*, 2013; 9 (6): 742–757.
79. 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.
80. 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.
81. Li S.H., Chow K.C. Magnetic field exposure induces DNA degradation // *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 280 (5): 1385–1388.
82. Li W., Ma N., Ong L.L., et al. Enhanced thoracic gene delivery by magnetic nanobead-mediated vector // *J Gene Med*, 2008; 10 (8): 897–909.
83. Li Z., Xiang J., Zhang W., et al. Nanoparticle delivery of anti-metastatic NM23-H1 gene improves chemotherapy in a mouse tumor model // *Cancer Gene Ther*, 2009; 16: 423–429.
84. 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.
85. Liu Q., Zhang J., Xia W., Gu H. Magnetic field enhanced cell uptake efficiency of magnetic silica mesoporous nanoparticles // *Nanoscale*, 2012; 4 (11): 3415–3421.
86. Liu W.M., Xue Y.N., He W.T., et al. Dendrimer modified magnetic iron oxide nanoparticle/DNA/PEI ternary complexes: a novel strategy for magnetofection // *J Control Release*, 2011; 152 (1): e159–160.
87. Low L., Mander A., McCann K., et al. DNA vaccination with electroporation induces increased antibody responses in patients with prostate cancer // *Hum Gene Ther*, 2009; 20 (11): 1269–1278.
88. Lübbe A.S., Alexiou C., Bergemann C. Clinical applications of magnetic drug targeting // *J Surg Res*, 2001; 95 (2): 200–206.
89. Lübbe A.S., Bergemann C., Riess H., et al. Clinical experiences with magnetic drug targeting: A phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors // *Cancer Res*, 1996; 56 (20): 4686–4693.
90. Luo D., Saltzman W.M. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface // *Nat Biotechnol*, 2000; 18 (8): 893–895.
91. Luten J., van Nostrum C.F., De Smedt S.C., Hennink W.E. Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA deliver // *J Control Release*, 2008; 126 (2): 97–110.
92. 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.
93. Magin-Lachmann C., Kotzamanis G., D'Aiuto L., et al. *In vitro* and *in vivo* delivery of intact BAC DNA-comparison of different methods // *J Gene Med*, 2004; 6 (2): 195–209.
94. Mahmoudi M., Meng J., Xue X., et al. Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes // *Biotechnol Adv*, 2014; 32: 679–692.
95. Mahmoudi M., Sant S., Wang B., et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy // *Adv Drug Deliv Rev*, 2011; 63 (1-2): 24–46.
96. Makkonen K.E., Airene K., Ylä-Herttulala S. Baculovirus-mediated gene delivery and RNAi applications // *Viruses*, 2015; 7 (4): 2099–2125.
97. Marshall E. Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia // *Science*, 2003; 299 (5605): 320.
98. Massart R., Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media // *EEE Transactions on Magnetics*, 1981; 17 (2): 1247–1248.
99. Mayrhofer P., Schleef M., Jechlinger W. Use of minicircle plasmids for gene therapy // *Methods Mol. Biol*, 2009; 542: 87–104.
100. McBain S.C., Griesenbach U., Xenariou S., et al. Magnetic nanoparticles as gene delivery agents: enhanced transfection in the presence of oscillating magnet arrays // *Nanotechnology*, 2008; 19 (40): 405102.

101. McDonald D.M., Foss A.J. Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent // *Cancer Metastasis Rev*, 2000; 19 (1-2): 109–120.
102. 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.
103. Miller D.L., Pislaru S.V., Greenleaf J.E. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation // *Somat Cell Mol Genet*, 2002; 27 (1-6): 115-134.
104. 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.
105. Mulligan R.C. The basic science of gene therapy // *Science*, 1993; 260 (5110): 926–932.
106. Muro S., Garnacho C., Champion J.A., et al. Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers // *Mol Ther*, 2008; 16 (8): 1450–1458.
107. Muthana M., Scott S.D., Farrow N., et al. A novel magnetic approach to enhance the efficacy of cell-based gene therapies // *Gene Ther*, 2008; 15: 902–910.
108. Mykhaylyk O., Antequera Y.S., Vlaskou D., Plank C. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection *in vitro* // *Nat Protoc*, 2007; 2 (10): 2391–2411.
109. Mykhaylyk O., Sanchez-Antequera Y., Vlaskou D., et al. Liposomal magnetofection // *Meth Mol Biol*, 2010; 605: 487–525.
110. Mykhaylyk O., Steingotter A., Perea H., et al. Nucleic acid delivery to magnetically-labeled cells in a 2D array and at the luminal surface of cell culture tube and their detection by MRI // *J Biomed Nanotechnol*, 2009 (a); 5 (6): 692–706.
111. 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.
112. Mykhaylyk O., Zelphati O., Rosenecker J., Plank C. siRNA delivery by magnetofection // *Curr Opin Mol Ther*, 2008; 10 (5): 493–505.
113. Namiki Y., Namiki T., Yoshida H., et al. A novel magnetic crystal–lipid nanostructure for magnetically guided *in vivo* gene delivery // *Nat Nanotech*, 2009; 4: 598–606.
114. Nayerossadat N., Maedeh T., Ali P.A. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery // *Adv Biomed Res*, 2012; 1: 27.
115. Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields // *EMBO J*, 1982; 1 (7): 841–845.
116. 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.
117. Onishi Y., Eshita Y., Murashita A., et al. Characteristics of DEAE-dextran-MMA graft copolymer as a nonviral gene carrier // *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 2007; 3 (3): 184–191.
118. Osborne R. Ark floats gene therapy's boat, for now // *Nat Biotechnol*, 2008; 26: 1057–1059.
119. Palmer D.H., Chen M.J., Kerr D.J. Taking gene therapy into the clinic // *J Biomed Biotechnol*, 2003; 2003 (1): 71–77.
120. Palmer D.H., Mautner V., Kerr D.J. Clinical experience with adenovirus in cancer therapy // *Curr Opin Mol Ther*, 2002; 4 (5): 423–434.
121. Pearson S., Hepeng Jia H., Kandachi K. China approves first gene therapy // *Nat Biotechnol*, 2004; 22 (1): 3–4.
122. Pickard M., Chari D. Enhancement of magnetic nanoparticle-mediated gene transfer to astrocytes by ‘magnetofection’: effects of static and oscillating fields // *Nanomed (Lond)*, 2010; 5 (2): 217–232.
123. Plank C., Schillinger U., Scherer F., et al. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery // *Biol Chem*, 2003; 384 (5): 737–747.
124. Plank C., Zelphati O., Mykhaylyk O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects // *Adv Drug Deliv Rev*, 2011; 63 (14-15): 1300–1331.
125. Prabha S., Sharma B., Labhasetwar V. Inhibition of tumor angiogenesis and growth by nanoparticle-mediated p53 gene therapy in mice // *Cancer Gene Ther*, 2012; 19 (8): 530–537.
126. Prijic S., Scancar J., Romih R., et al. Increased cellular uptake of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles into malignant cells by an external magnetic field // *J Membr Biol*, 2010; 236 (1): 167–179.
127. Prosen L., Markelc B., Dolinsek T., et al. Mcam silencing with RNA interference using magnetofection has antitumor effect in murine melanoma // *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014; 3 (10): e205.

128. Puhlmann M., Brown C.K., Gnant M., et al. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant // *Cancer Gene Ther*, 2000; 7 (1): 66–73.
129. Pulfer S.K., Gallo J.M. Enhanced brain tumor selectivity of cationic magnetic polysaccharide microspheres // *J Drug Target*, 1998; 6 (3): 215–227.
130. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis // *Biochem J*, 2004; 377 (Pt1): 159–169.
131. Renzing J., Lane D.P. p53-dependent growth arrest following calcium phosphate-mediated transfection of murine fibroblasts // *Oncogene*, 1995; 10 (9): 1865–1868.
132. Ribble D., Goldstein N.B., Norris D.A., Shellman Y.G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates // *BMC Biotechnol*, 2005; 5: 12.
133. Rogers S., Pfuderer P. Use of viruses as carriers of added genetic information // *Nature*, 1968; 219 (5155): 749–751.
134. Rosenberg S.A., Aebbersold P., Cornetta K., et al. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction // *N Engl J Med*, 1990; 323: 570–578.
135. Rotariu O., Strachan N.J.C. Modelling magnetic carrier particle targeting in the tumor microvasculature for cancer treatment // *J Magn Magn Mater*, 2005; 293 (1): 639–646.
136. Rudolf B., Salmains M., Wilczewski A.Z., et al. Fabrication of multifunctional magnetic nanoparticles bearing metallobonded probes and antibodies // *Coll Surf*, 2014; 457: 142–151.
137. Ruß V., Wagner E. Cell and tissue targeting of nucleic acids for cancer gene therapy // *Pharm Res*, 2007; 24 (6): 1047–1057.
138. Santhosh P.B., Ulrich N.P. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics // *Cancer Letters*, 2013; 336 (1): 8–17.
139. Sapet C., Laurent N., de Chevigny A., et al. High transfection efficiency of neural stem cells with magnetofection // *Biotechniques*, 2011; 50 (3): 187–189.
140. Sardesai N.Y., Weiner D.B. Electroporation delivery of DNA vaccines: Prospects for success // *Curr Opin Immunol*, 2011; 23 (3): 421–429.
141. Scherer F., Anton M., Schillinger U., et al. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo* // *Gene Ther*, 2002; 9 (2): 102–109.
142. Schillinger U., Brill T., Rudolph C., et al. Advances in magnetofection—magnetically guided nucleic acid delivery // *J Magn Magn Mater*, 2005; 293 (1): 501–508.
143. Schwarz S., Wong J.E., Bornemann J. Polyelectrolyte coating of iron oxide nanoparticles for MRI-based cell tracking // *Nanomed*, 2012; 8 (5): 682–691.
144. Schwerdt J.U., Goya G.F., Calatayund M.P., et al. Magnetic field-assisted gene delivery: achievements and therapeutic potential // *Curr Gene Ther*, 2012; 12 (2): 116–126.
145. Sharma B., Ma W., Adjei I.M., et al. Nanoparticle-mediated p53 gene therapy for tumor inhibition // *Drug Deliv Trans Res*, 2011; 1 (1): 43–52.
146. Shubayev V.I., Pisanic T.R. 2nd, Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics // *Adv Drug Deliv Rev*, 2009; 61 (6): 467–477.
147. Silva A.K.A., Silva É.L., Carriço A.S., Egito E.S.T. Magnetic Carriers: A Promising Device for Targeting Drugs Into the Human Body // *Curr Pharm Des*, 2007; 13 (11): 1179–1185.
148. Sincal M., Ganga D., Ganga M., et al. Antitumor effect of magnetite nanoparticles in cat mammary adenocarcinoma // *J Magn Magn Mater*, 2005; 293: 438–441.
149. Singh A., Sahoo S.K. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theragnostics // *Drug Discov Today*, 2014; 19 (4): 474–481.
150. Somia N., Verma I.M. Gene therapy: trials and tribulations // *Nat Rev Genet*, 2000; 1: 91–99.
151. Stephen Z.R., Kievit F.M., Zhang M. Magnetite Nanoparticles for Medical MR Imaging // *Mater Today*, 2012; 14 (7-8): 330–338.
152. Sum C.H., Wettig S., Slavcev R.A. Impact of DNA vector topology on non-viral gene therapeutic safety and efficacy // *Curr Gene Ther*, 2014; 14 (4): 309–329.
153. Sun W., Qian H., Zhang X., et al. Induction of protective and therapeutic antitumor immunity using a novel tumour-associated antigen-specific DNA vaccine // *Immunol Cell Biol*, 2006; 84 (5): 440–447.
154. Svigen T., Wilhelm D., Combes A.N., et al. *Ex vivo* magnetofection: a novel strategy for the study of gene function in mouse organogenesis // *Dev Dyn*, 2009; 238 (4): 956–964.
155. Szybalska E.H., Szybalski W. Genetics of human cell line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1962; 48: 2026–2034.



156. Tai C.K., Kasahara N. Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy // *Front Biosci*, 2008; 13: 3083–3095.
157. Tangney M., Casey G., Larkin J.O., et al. Non-viral *in vivo* immune gene therapy of cancer: combined strategies for treatment of systemic disease // *Cancer Immunol Immunother*, 2006; 55 (11): 1443–1450.
158. Taratula O., Salva R., Pandya I., et al. Multifunctional siRNA delivery system for cancer therapy // *Nanotech*, 2008; 2 (1): 49–52.
159. Tatum E.L. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine // *Perspect Biol Med*, 1966; 10 (1): 19–32.
160. Teja A.S., Koh P-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles // *Prog Crystal Growth Charact Mater*, 2009; 55 (1-2): 22–45.
161. Temin H.M. Mixed infection with two types of Rous sarcoma virus // *Virology*, 1961; 13: 158–163.
162. Teramoto S., Ishii T., Matsuse T. Crisis of adenoviruses in human gene therapy // *Lancet*, 2000; 355 (9218): 1911–1912.
163. Thrasher A.J., Gaspar H.B., Baum C., et al. Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity // *Nature*, 2006; 443 (7109): E5–7.
164. Tickle J.A., Jenkins S.I., Pickard M.R., Chari D.M. Influence of amplitude of oscillating magnetic fields on magnetic nanoparticle-mediated gene transfer to astrocytes // *Nano LIFE*, 2015; 5 (1): 1450006.
165. Tiwari A.P., Ghosh S.J., Pawar S.H. Biomedical applications based on magnetic nanoparticles: DNA interactions // *Anal Methods*, 2015; 7: 10109–10120.
166. Torchilin V.P. Drug targeting // *Eur J Pharm Sci*, 2000; 11 (Suppl 2): S81–S91.
167. Uchida M., Li X.W., Mertens P., Alpar H.O. Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun // *Biochim Biophys Acta*, 2009; 1790 (8): 754–764.
168. Vaheri A., Pagano J.S. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay // *Virology*, 1965; 27 (3): 434–436.
169. Vainauska D., Kozireva S., Karpovs A., et al. A Novel Approach for Nucleic Acid Delivery Into Cancer Cells // *MEDICINA (Kaunas)*, 2012; 48 (6): 324–329.
170. Villemejane J., Mir L.M. Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications // *Br J Pharmacol*, 2009; 157: 207–219.
171. Wasungu L., Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes // *J Control Release*, 2006; 116 (2): 255–264.
172. Weissleder R., Bogdanov A., Neuwelt E.A., Papisov M. Longcirculating iron-oxides for Mr-imaging // *Adv Drug Deliv Rev*, 1995; 16 (2-3): 321–334.
173. Wells D.J. Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods // *Gene Ther*, 2004; 11 (18): 1363–1369.
174. Widder K.J., Senyei A.E., Scarpelli D.G. Magnetic microspheres: a model system for site specific drug delivery *in vivo* // *Proc Soc Exp Biol Med*, 1978; 58 (2): 141–146.
175. Wilhelm C., Billotey C., Roger J., et al. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating // *Biomaterials*, 2003; 24 (6): 1001–1011.
176. Wilson M.W., Kerlan R.K., Jr, Fidelman N.A., et al. Hepatocellular carcinoma: Regional therapy with a magnetic targeted carrier bound to doxorubicin in a dual MR imaging/conventional angiography suite-initial experience with 4 patients // *Radiology*, 2004; 230 (1): 287–293.
177. Wirth T., Ylä-Herttuala S. Gene Therapy Used in Cancer Treatment // *Biomedicines*, 2014; 2 (2): 149–162.
178. Wishart D.S. Is cancer a genetic disease or a metabolic disease? // *EbioMedicine*, 2015; 2 (6): 478–479.
179. Xenariou S., Griesenbach U., Ferrari S., et al. Using magnetic forces to enhance non-viral gene transfer to airway epithelium *in vivo* // *Gene Ther*, 2006; 13 (21): 1545–1552.
180. Xiang J.J., Tang J.Q., Zhu S.G., et al. IONP-PLL: a novel non-viral vector for efficient gene delivery // *J Gene Med*, 2003; 5 (9): 803–817.
181. Yameen B., Choi W.I., Vilos C., et al. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting // *J Control Release*, 2014; 190: 485–499.
182. Yang S.Y., Sun J.S., Liu C.H., et al. *Ex vivo* magnetofection with magnetic nanoparticles: a novel platform for nonviral tissue engineering // *Artif Organs*, 2007; 32 (3): 195–204.

183. Yin T., Wang P., Zheng R., et al. Nanobubbles for enhanced ultrasound imaging of tumors // *Int J Nanomed*, 2012; 7: 895–904.
184. Yin W.K., Feng S.S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of Polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs // *Biomaterials*, 2005; 26 (15): 2713–2722.
185. Zhang J.Q., Zhang Z.R., Yang H., et al. Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: *In vitro* and *in vivo* studies // *Pharm Res*, 2005; 22 (4): 573–583.
186. Zhang Y., Satterlee A., Huang L. *In vivo* gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles? // *Mol Ther*, 2012; 20 (7): 1298–1304.



## 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. *1<sup>st</sup> International Conference on BioNano Innovation*, Brisbena, Austrālija, 18.–20. jūlijs, 2012.
3. Kozireva S., **Avotina D.**, Baryshev M. Transduction of GFP-Tus-NLS and GFP-modTat Fusion Proteins into Prostate carcinoma and Burkitt's Lymphoma Cells. *1<sup>st</sup> 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.

## PATEICĪBAS

Šis pētījums ir komandas darbs, tāpēc vislielākais PALDIES maniem ESF projekta 2. aktivitātes kolēģiem – *Dr. biol.* Mihailam Bariševam, *Dr. biol.* Svetlanai Kozirevai un Maksimam Čistjakovam, bez kuriem šī promocijas darba izstrāde nebūtu iespējama. Pateicos ESF projekta fiziķiem Vladimiram Kozlovam un Andrejam Karpovam par ieguldījumu šī darba fizikas sadaļas tapšanā.

Vēlos pateikties visam RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūta kolektīvam un institūta vadītājai *Dr. med.* asociētajai profesorei Modrai Murovskai par iespēju te strādāt triju gadu garumā, par iegūto neatsveramo zinātnisko pieredzi. Īpašs paldies Alīnai un Zaigai par vērtīgajiem padomiem un uz *personīgo pieredzi* balstītu atbalstu promocijas procesā.

**PALDIES** visai manai *otrā plāna komandai* – Gunai, Andrejam, Artūram, Dmitrijam, Dainai, Inārai, Renātei, Benitai, Aļonai, Lanai, Sergejam, Sintijai, Lāsmi, Ērikai, Nikolai, Jānim, Ģirtam, Ancei, Gitai, Zanei un meitenei no Valsts policijas par nesavtīgi veltīto laiku, lai palīdzētu man šī promocijas darba tapšanā. PALDIES!

Pateicos *Dr. habil. med.* profesoram Jānim Vētram, *Dr. habil. phys.* profesoram Jurijam Dehtjaram un *Dr. biol.* asociētajai profesorei Elenai Kashubai par promocijas darba recenzēšanu.

## **PIELIKUMI**

## Liposomālā magnetofekcija laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā

### PC3 un HEPG2 šūnu līnijām

#### PROTOKOLS

**CM** – *CombiMAG* magnētiskās nanodaļiņas

**LIP** – *Lipofectamine2000* transfekcijas reaģents

**Komponentu attiecība vienai reakcijai:** 1 µg pDNS:2 µl LIP:1 µl CM uz vienu 24 iedaļu plates iedaļu.

1. No katras plates iedaļas ar šūnu kultūru atsūc esošo barotni un aizvieto to ar 350 µl *Opti-MEM* barotnes.
2. Sagatavo pDNS šķīdumu *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma.
3. Sagatavo LIP reaģenta šķīdumu *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma, inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
4. Magnētiskās nanodaļiņas *CombiMAG* vorteksē 2–3 sekundes. Sagatavo CM šķīdumu *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma.
5. Sagatavoto pDNS šķīdumu pievieno LIP reaģenta šķīdumam un viegli samaisa 2–3 reizes pipetējot. pDNS-LIP šķīdumam pievieno CM šķīdumu, viegli samaisa, 2–3 reizes lēni pipetējot, un inkubē istabas temperatūrā 25 minūtes.
6. Maisījumu pa pilienam pārnes uz iedaļām šūnu kultūras platē.
7. Plati pašūpo no labās uz kreiso pusi un no augšas uz apakšu, lai nodrošinātu vienmērīgu pDNS-LIP-CM kompleksu izkliedi iedaļā.
8. Plati novieto uz *DynaFECTOR* platformas un inkubē nepieciešamajā režīmā – 5 min/5 apgr./min (PC3 šūnas) vai 5 min/50 apgr./min (HEPG2 šūnas).
9. Pēc inkubācijas plati liek CO<sub>2</sub> inkubatorā uz 24 stundām.

## Liposomālā ko-magnetofekcija laika-fāzes variējošā magnētiskajā laukā

### PC3 šūnu līnijai

### PROTOKOLS

**CM** – *CombiMAG* magnētiskās nanodaļiņas

**LIP** – *Lipofectamine2000* transfekcijas reaģents

**Komponentu attiecība vienai reakcijai:** 1 µg pDNS:50 nM siRNS:2 µl LIP:1 µl CM uz vienu 24 iedaļu plates iedaļu.

1. No katras plates iedaļas ar šūnu kultūru atsūc esošo barotni un aizvieto to ar 300 µl *Opti-MEM* barotnes.
2. Sagatavo pDNS šķīdumu *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma.
3. Sagatavo siRNS šķīdumu *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma.
4. Sagatavo LIP reaģenta šķīdumu *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma, inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
5. Magnētiskās nanodaļiņas *CombiMAG* vorteksē 2–3 sekundes. Sagatavo CM šķīdumu *Opti-MEM* ar kopējo daudzumu 50 µl šķīduma.
6. Sagatavoto siRNS šķīdumu pievieno pDNS šķīdumam, pēc tam LIP reaģenta šķīdumam un viegli samaisa, 2–3 reizes pipetējot. pDNS-siRNS-LIP šķīdumam pievieno CM šķīdumu, viegli samaisa, 2–3 reizes lēni pipetējot, un inkubē istabas temperatūrā 25 minūtes.
7. Maisījumu pa pilienam pārnes uz iedaļām šūnu kultūras platē.
8. Plati pašūpo no labās uz kreiso pusi un no augšas uz apakšu, lai nodrošinātu vienmērīgu pDNS-siRNS-LIP-CM kompleksu izkliedi iedaļā.
9. Plati novieto uz *DynaVECTOR* platformas un inkubē nepieciešamajā režīmā – 5 min/5 apgr./min.
10. Pēc inkubācijas plati liek CO<sub>2</sub> inkubatorā uz 48 stundām.