

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**Alfavīrusu vektoru transdukcijas efektivitātes paaugstināšana ar magnētiskām  
nanodaļiņām vēža šūnās**

**Maģistra darbs**

Autors: Jeļena Sorokina

Stud. apl. Nr. Js11146

Darba vadītāja: Dr. biol. Anna Zajakina

Recenzents: Dr. biol. Juris Jansons

**Rīga 2019**

## SATURA RĀDĪTĀJS

SATURA RĀDĪTĀJS .....	2
APZĪMĒJUMU SARAKSTS .....	4
ANOTĀCIJA .....	5
ABSTRACT .....	6
IEVADS .....	10
1.LITERATŪRAS APSKATS .....	10
1.1. SFV vispārējais raksturojums .....	10
1.2. SFV ekspresijas sistēma .....	12
1.3. SFV pielietošana citokīnu piegādei peļu audzēju modeļos .....	13
1.4. TNF-alfa vispārīgais raksturojums .....	17
1.5. Magnētiskas nanodaļiņas un to raksturojums .....	20
1.6. Perspektīvas pieejas terapijai, pamatojoties uz magnētiskajām nanodaļiņām .....	21
2. MATERIĀLI UN METODEDES .....	24
2.1. Materiāli .....	24
2.1.1. Magnētiskas daļiņas .....	24
2.1.2. Rekombinantie alfavīrusu vektori .....	26
2.1.3. Šūnu līnijas .....	26
2.1.4. Šūnu barotnes .....	27
2.1.5. Materiāli .....	28
2.1.6. Ierīces .....	29
2.1.7. Programmas .....	29
2.2. Metodes .....	30
2.2.1. Šūnu audzēšana .....	30
2.2.2. Šūnu infekcija .....	30
2.2.3. MNP/ vīrusa kompleksa ģenerācija un šūnu transdukcija .....	30
2.2.4. Vīrusa notveršana (koncentrēšana) ar MNPs (Virus capturing by MNPs ) .....	31
2.2.5. Plūsmas citometrija .....	32
2.2.6. Vīrusa titra noteikšana .....	32
2.2.7. Elise metode .....	33
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	36
3.1. MNPs / vīrusa kompleksu ģenerācija un šūnu transdukcija .....	36
3.2. Transdukcijas analīze ar fluorescences mikroskopiju .....	38
3.3. Šūnu transdukcijas noteikšana ar plūsmas citometriju .....	41

3.4. SFV/ TNF Šūnu infekcija .....	53
3.5. Vīrusa koncentrēšana ar magnētiskām nanodaļiņām .....	56
SECINĀJUMI .....	64
PATEICĪBAS .....	65
LITERATŪRAS SARAKSTS .....	66

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

TNF-a - audzēja nekrozes faktors alfa (angl. *tumor necrosis factor alpha*)

Apg./min — apgriezieni minūtē

B16 — peļu melanomas šūnu līnija

BHK — Sīrijas kāmjū mazuļu nieru šūnu līnija

Huh-7 — cilvēka hepatomas šūnu līnija

PBS – fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums (angl. *phosphate buffered saline*)

SFV – Semliki meža vīruss (angl. *Semliki Forest virus*)

pSFV1 – Semliki meža vīrusa plazmīdas vektors

MNPs – magnētiskās nanodaļiņas (angl. *magnetic nanoparticles*)

4T1 – peļu krūts vēža šūnu līnija

m.d. – magnētiskās nanodaļiņas

TS/A – peles krūts adenokarcinomas šūnu līnija

ssRNS - vienpavediena ribonukleīnskābe (angl. *single-stranded RNA*)

IL - interleikīns

i.t. – intratumorāla injekcija

i.p. – intraperitoneāla injekcija

i.v. – intravenoza injekcija

VLP – vīrusiem līdzīgās daļiņas (angl. *virus-like particles*)

Tregs - regulatorās T šūnas

i.u. – infekciozas daļiņas (angl. *infection units*)

## ANOTĀCIJA

Pēdējā laikā alfavīrusu vektoru pielietojums pretvēža terapijā eksperimentālos modeļos kļūst arvien izplatītāks. Semliki meža vīruss (SFV) ir potenciāls vēža gēnu terapijas vektors, kas spēj nodrošināt relatīvi īslaicīgu, bet augsta līmeņa heterologu proteīnu ekspresiju vēža šūnās. Transdukcijas efektivitātei ir liela nozīme optimālai gēnu piegādei audzējos. Ir pierādīts, ka magnētiskās nanodaļiņas (MNPs) palielina šūnu transdukciju ar dažādiem vīrusu vektoriem *in vitro*.

Šajā darbā tika pētīts MNPs panelis, lai uzlabotu vēža šūnu transdukciju ar SFV vektoru. Tika pielietota magnetotransdukcija, izmantojot pozitīvi lādētas MNPs, kas palielina Semliki meža vīrusa transdukciju TS/A, B16, 4T1, un Huh-7 šūnu līnijās *in vitro* fetālā seruma klātbūtnē. Pozitīvi lādētās MNPs efektīvi uzņēma SFV daļiņas, neatkarīgi no izmantotās barotnes, un MNPs-SFV kompleksi tika veiksmīgi atdalīti no suspensijas ar magnētisko izgulsnēšanu. Iegūtie rezultāti atklāja MNPs iespējamo pielietojumu uzlabotai SFV vektoru piegādei.

**Atslēgvārdi:** Semliki meža vīruss (SFV), audzēju šūnas, magnētiskās nanodaļiņas (MNPs), alfavīrusi.

## ABSTRACT

Recently, the use of alpha virus vectors in anti-cancer therapy *in vivo* is becoming increasingly popular. Semliki Forest virus (SFV) is a potential cancer gene therapy providing relatively short-term but high-level heterologous protein expression in cancer cells. Transduction efficiency plays an important role in optimal gene delivery in tumors. Magnetic nanoparticles (MNPs) have been shown to increase cell transduction in a number of viral vectors *in vitro*.

In this work, several types of MNPs were studied to improve cancer cell transduction with SFV vector. Magnetotransduction was applied using positively charged MNPs which increase Semliki forest virus transduction of TS/A, B16, 4T1, and Huh-7 cells *in vitro* in the presence of fetal serum. Positively charged MNPs effectively absorbed SFV particles, regardless of the medium used, and MNPs-SFV complexes were successfully isolated from suspension by magnetic precipitation. These results revealed the potential use of MNPs for improved delivery of SFV vectors.

Keywords: Semliki Forest virus (SFV), tumor-associated cells, magnetic nanoparticles (MNPs), alphaviruses.

## IEVADS

Tehnoloģijas, kas balstītas uz vīrusu daļiņām, ir būtiski ietekmējušas vakcīnu izstrādes gaitu, gēnu terapiju, vēža ārstēšanu un mērķtiecīgu zāļu izstrādi [1]. Pēdējo desmit gadu laikā alfavīrusu vektori, kas ir ģenētiski modificēti, lai ražotu terapeitiskus rekombinantus proteīnus, ir parādījuši lielu potenciālu gan preklīniskajos, gan vairākos klīniskajos pētījumos [2, 3, 4].

Semliki meža vīruss (SFV) ir alfavīrusu ģints pārstāvis, kas pieder *Togaviridae* dzimtai [5]. SFV ir pielāgots heterologu proteīnu ekspresijai zīdītāju šūnās. Šī sistēma nodrošina vairākas priekšrocības, piemēram, plašu saimniekorganisma šūnu spektru, kas ir uzņēmīgas pret infekciju, un augsta līmeņa heterologa proteīna ekspresiju, kas spēj ražot augstus vīrusu titrus [6].

SFV ekspresijas sistēma ir balstīta uz modificētu SFV genomu, kurā vīrusa strukturālie gēni ir aizstāti ar interesējošiem gēniem [5]. Tādējādi nav iespējams iegūt infekciozu vīrusu, kas spētu inficēt jaunas šūnas, nodrošinot drošus apstākļus *in vitro* un *in vivo* pētījumiem (*replication deficient virus*). Onkoloģijas nozarē SFV ir izvirzīts kā potenciāls kandidāts glioblastomas un neiroblastomas ārstēšanai [7].

Alfavīrusu bioloģiskās īpašības padara tos par ideālu instrumentu gēnu pārneses eksperimentiem *in vivo* [8]. Neatkarīgi no augstās heterologā gēna ekspresijas, alfavīrusu vektori *in vivo* ietver zemu specifisku imūnreakciju pret pašu vektoru [6].

Ir īpaša interese piemērot alfavīrusus kā vakcīnas platformu, jo šie vektori spēj inficēt dendrītiskās šūnas un sasniegt limfmezglus [9]. Turklāt alfavīrusu vektori ir pierādījuši sevi ka ļoti veiksmīgas terapeitiskās un profilaktiskās vēža vakcīnas [10]. Pateicoties plašu audu tropismam, vēža terapijai galvenokārt tiek izmantota alfavīrusu vektoru intratumorālā ievadīšana [11, 12]. Tāpēc mērķtiecīga vektoru piegāde, izmantojot sistēmas injekcijas, ir aktuāla problēma.

Vēl viens ierobežojums ietver suboptimālo transdukcijas līmeni dažos vēža šūnu tipos, vienlaikus samazinot vektora terapeitisko potenciālu [12, 13, 14, 15]. Šo ierobežojumu var novērst, lietojot augstus vīrusu titrus, lai gan tas var novest pie nespecifiskas vektora izplatīšanās un citotoksiskā efekta [16].

Viens no risinājumiem ir samazināt vīrusu devu un tajā pašā laikā uzlabot vektoru tropismu un infekcijas spēju ar magnētiskām nanodaļiņām (*magnetic nanoparticles*, MNPs). MNPs ir piemērotas, lai palielinātu piegādes efektivitāti, pastiprinot vīrusu infekciju. Jau iepriekš ir

pierādīts, ka, pateicoties MNPs, magnētiskā lauka ietekmē paaugstinās vīrusu kompleksu koncentrāciju uz šūnu virsmas, tādējādi uzlabojot efektivitāti [16].

Magnētiskās transdukcijas efektivitāte ir pierādīta ar vairākiem vīrusiem, piemēram, retrovīrusu [17, 18, 19, 20], Rabdovīrusu [21], parvovīrusu [22], paramiksovīrusu [23] un adenovīrusu [20, 21, 24, 25, 26, 27, 28].

Atšķirībā no specifiskiem ligandu-ligandu mijiedarbības kompleksiem, kas prasa vīrusa un nanodaļiņu ķīmisku modifikāciju, MNPs-vīrusu kompleksi, ko veido elektrostatiskās un hidrofobās mijiedarbības, ir viegli ģenerējami.

Magnētiskajām nanodaļiņām tiek atrasti arvien jauni pielietojumi. Tās var būt saderīgas ar bioloģiskajiem objektiem un tikt izmantotas medicīnisko problēmu risināšanā. Izmēru variācijas dod iespēju izmantot nanodaļiņas kā mazas zondes, kas ļautu iezīmēt šūnu procesu gaitu, neietekmējot pašus procesus. Tām jābūt ļoti mazām un pārklātām ar bioloģiskām molekulām, lai tās varētu konkrētā veidā mijiedarboties vai saistīties ar bioloģiskiem objektiem, tādējādi nodrošinot zāļu piegādi un to kontrolējamību [29, 30, 31]. Turklāt MNPs uzkrāšanos var skaidri vizualizēt, izmantojot magnētisko rezonansi, kas nodrošina papildus izsekošanas iespējas ar MNPs iezīmētiem vektoriem [32].

Šajā pētījumā tika izpētītas komerciālās MNPs, lai uzlabotu Semliki meža vīrusa vektora transdukciju TS/A, 4T1, B16, un Huh-7 vēža šūnu līnijās *in vitro*. Turklāt tika izanalizēts MNPs iespējamais pielietojums SFV vektora efektīvai koncentrēšanai.

Darbs tika izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

**Darba mērķis:**

Atlasīt magnetiskās nanodaļiņas efektīvai SFV transdukcijai vēža šūnās.

**Darba uzdevumi:**

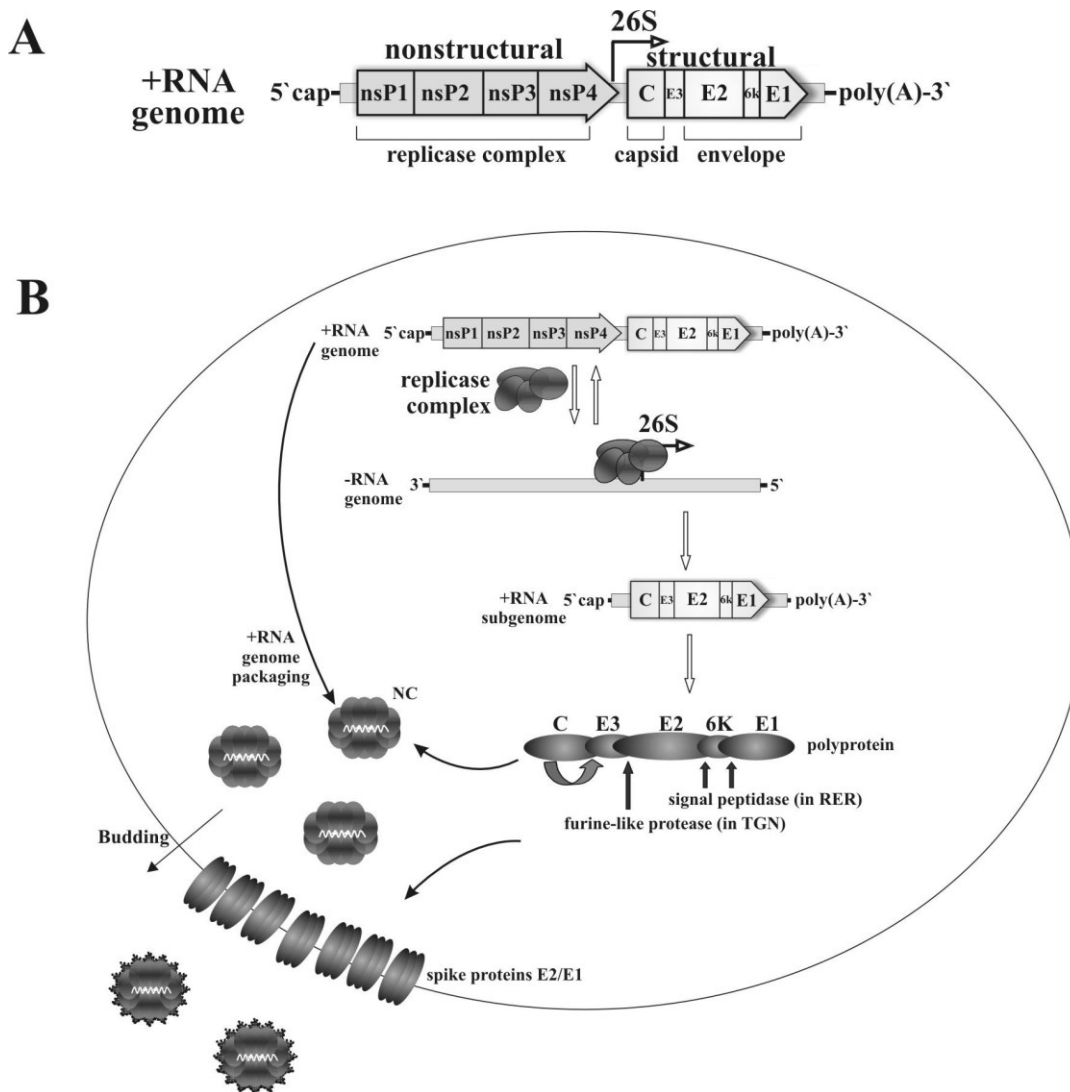
1. Sintezēt rekombinantus SFV, kas ekspresē marķiergēnu (DS-Red) un peļu TNF-alfa citokīnu kā potenciālo pretvēža imūnterapijas aģentu.
2. Izpētīt magnētisko nanodaļiņu spēju paaugstināt SFV transdukciju vēža šūnu kultūrās.
3. Izpētīt iespējamo SFV koncentrēšanu no dažādiem šķīdumiem, izmantojot magnētisko izgulsnēšanu.

## 1. LITERATŪRAS APSKATS

### 1.1. SFV vispārējais raksturojums

Semliki meža vīruss (SFV) ir alfavīrusu ģints pārstāvis, kas pieder *Togaviridae* dzimtai. Tā diametrs ir apmēram 69 nm [5]. Pirmo reizi SFV tika izolēts 1944. gadā no moskītiem Ugandā. Vēlāk šo pašu vīrusu ieguva arī vairākos citos pasaules reģionos: Subsahāras apvidū, Krievijā, Indijā, tādējādi atklājot tā plašo ģeogrāfisko izplatību. Vīrusa strukturālo proteīnu kodējošais reģions tika sekvenēts jau 1980. gadā, bet viss 11445 nukleotīdu garais SFV genoms – pēc sešiem gadiem [33].

Alfavīrusa genomu veido pozitīva ssRNS, kuras garums ir aptuveni 11,7 kb un kas satur divus galvenos reģionus (1.1.A attēls) [34]. Divas trešdaļas no RNS 5' gala kodē nestrukturālos proteīnus, kas sākotnēji tiek sintezēti kā viens poliproteīns un pēc tam šķelti četros nestrukturālajos proteīnos: nsP1, nsP2, nsP3 un nsP4, kuri piedalās RNS replikācijas procesā. Atlikusī viena trešdaļa RNS 3' galā kodē vīrusa strukturālos proteīnus un nes poliadenīna asti. RNS replikācijas laikā sākotnēji tiek radīta pilna garuma mīnus RNS genoma kopija, kas kalpo kā matrica pilna garuma genoma RNS iegūšanai un subgenoma strukturālo gēnu RNS transkripcijai [35] (1.1.B attēls).



*1.1.att. Alfavīrusa ģenētiskā struktūra un dzīves cikls. A. Alfavīrusa +RNS genoma struktūra. Pozitīvais ssRNA genoms ietver sevī nestrukturālos un strukturālos gēnus. B. Virionu ražošana no RNS genoma. Kad RNS tiek atbrīvota citoplazmā, no plus-RNS ķēdes tiek translēti RNS replikācijas kompleksa nestrukturālie proteīni, bet strukturālie gēni tiek translēti no subgenoma 26S plus-RNS. RNS genoms tiek iekļauts nukleokapsīdā, un apvalka proteīni tiek transportēti uz citoplazmas membrānu, kur notiek nobriedušu vīrusu daļiņu savākšanās un izkļūšana no šūnas (vīrusa sekrēcija).*

*Figure 1.1. Genome structure and life-cycle of alphaviruses. A. Alphavirus genome structure. The ssRNA genome comprises the nonstructural and structural genes. B. Production of viral progeny from RNA genome. Once RNA is released into the cytoplasm, a negative strand RNA is synthesized as a template for RNA replication and translation of nonstructural proteins (replicase complex) and structural genes from the subgenomic 26S promoter takes place. RNA genomes are packaged into nucleocapsids and the envelope proteins are transported to the plasma membrane, where assembly and budding of mature viral particles takes place.*

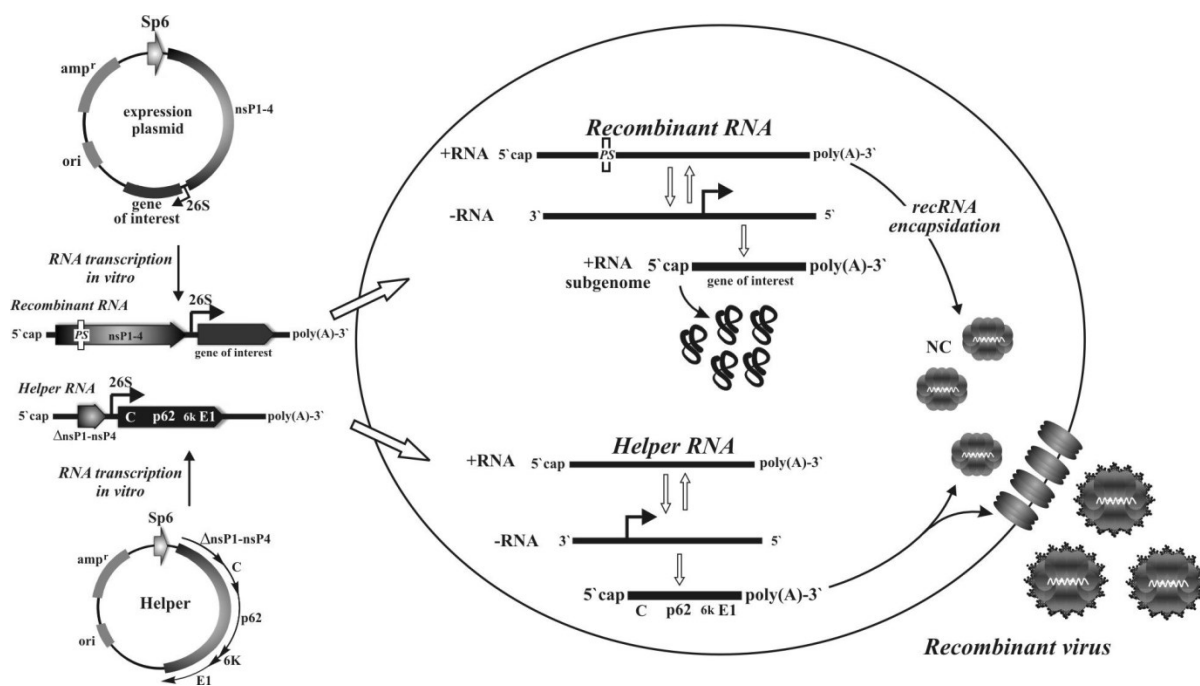
Dabā alfavīrusi mugurkaulniekos nokļūst ar kukaiņu starpniecību. Mugurkaulnieku šūnās vīrusa infekcija izpaužas kā strauja saimnieka mRNS translācijas apturēšana, jo vīrusa mRNS pārņem saimniekšūnas translācijas resursus. Pēc tam seko strauja infekciozo vīrusa daļiņu skaita palielināšanās un šūnu bojāeja 24-48 stundu laikā.

Kukaiņos vīrusa replikācija notiek daudz lēnāk, parasti tā minimāli ietekmē kukaiņu šūnas, bet ļoti viegli izveido pastāvīgu infekciju. Lai gan daži alfavīrusi ir patogēni, divi vīrusi, kurus izmanto kā vektorus: SFV un SIN (*Sindbis vīruss*), ir vāji patogēni cilvēkam [36].

Viens no galvenajiem neskaidrajiem jautājumiem joprojām ir saimniekšūnu receptora identifikācija, pie kura piesaistās alfavīrusi. Ir parādīts, ka anti-laminīna receptora monoklonālās antivielas bloķē SIN saistīšanos ar BHK šūnām un samazina šūnu infekciju [37]. Iepriekš bija parādīts, ka gan SFV, gan SIN vektori saistās ar heparāna sulfāta receptoriem uz šūnu virsmas [38]. Tomēr tālākie pētījumi liecināja, ka heparāna sulfāta un laminīna receptoru šūnu nokauti efektīvi inficējas ar alfavīrusiem. Iespējams, ka alfavīrusi izmanto dažādus mehānismus šūnu infekcijai.

## 1.2. SFV ekspresijas sistēma

Ekspresijas vektoriem jāgarantē augsts drošības līmenis. Replikācijas defektīvie (*replication deficient*) vektori sastāv no ekspresijas vektora, kas kodē alfavīrusu nestrukturālos gēnus nsP1-4, subgenomisko 26S promoteru un interesējošo gēnu (1.2.attēls). Lai sintezētu vīrusus, replikona RNS tiek elektroporēta šūnās kopā ar *helper*-RNS, kura kodē vīrusa strukturālos gēnus (viriona gēnus). Rekombinantā replikona RNS tiek iepakota jaunsintezētajos vīrusos, jo iepakojuma signāls (*packaging signal*, PS) ir tikai rekombinantajām RNS, bet *helper*-RNS nesatur PS [39]. Tādējādi jaunsintezētie virioni ir replikācijas defektīvi, jo nesatur strukturālos (*helper*) gēnus. Pēc šūnu infekcijas ar šādiem vīrusiem, jaunas vīrusu daļiņas neveidojas, garantējot augstu drošības līmeni.



1.2.att. **Uz alfavīrusu balstīta rekombinanto daļiņu producēšana.** *In vitro* transkribētas RNS no alfavīrusa ekspresijas un *helpera* vektoriem tiek elektroporētas vai transficētas zīdītāju saimniekšūnās (parasti BHK-21 šūnās). Pēc RNS replikācijas un alfavīrusu proteīnu ekspresijas, rekombinantā RNS tiek iepakota nukleokapsīdos, jo iepakojuma signāls (*packaging signal*, PS) ir tikai rekombinantām RNS.

Figure 1.2. **Alphavirus-based recombinant particle production.** *In vitro* transcribed RNAs from alphavirus expression and helper vectors are electroporated or transfected into mammalian host cells (generally BHK-21 cells). After RNA replication and expression of alphavirus proteins, recombinant RNA is packaged into nucleocapsids due to the presence of a packaging signal (PS) only on the recombinant RNA. After transport of envelope proteins to the plasma membrane assembly and budding of recombinant particles takes place.

### 1.3. SFV pielietošana citokīnu piegādei peļu audzēju modeļos

Nelielais imūnreakcijas līmenis un nepieciešamība pēc vairākām imunizācijām liecina, ka alfavīrusu vektoru iedarbību var pastiprināt imūnstimulējoši citokīni. Citokīni ir dabiskas imūnsistēmas molekulas, ko var izmantot, lai tieši stimulētu imūnsistēmas šūnas un pastiprinātu audzēja šūnu atpazīšanu ar citotoksiskām efektora šūnām. Daudzi pētījumi ir pierādījuši, ka citokīniem ir plaša pretvēža aktivitāte, un daudzas citokīnu balstītas pieejas ir izmantotas vēža terapijā [40]. Klīniskajos pētījumos ir novērtēti vairāki citokīni, tostarp GM-CSF, IL-7, IL-12,

IL-15, IL-18 un IL-21. Pretvēža iedarbība ir aprakstīta dažādos peļu audzēju modeļos (1.1. tabula).

Interleikīns-12 (IL-12) ir ekspresēts ar SFV un SIN vektoriem, lai pārvarētu imūnsupresīvo vidi audzējos. IL-12 ir daudzfunkcionāls citokīns, kas aktivizē iedzimitas un adaptīvas imūnās atbildes un veicina audzēja antigēnu atbildi caur regulācijas palielināšanos I un II klases MHC molekulām, kas izraisa CD4 + T šūnu diferenciaciju 1. tipa Th (*T helper 1*) šūnās, inducē IFN- $\gamma$  ražošanu un pēc tam ieprogrammē audzēja mikrovidi [41]. Šīs kaskādes izraisa citotoksisku imūnreakciju audzējos.

IL-12 gēna ekspresija izraisa audzēja specifisku imunitāti un kavē audzēja šūnu augšanu melanomas modelī. Viena intratumorāla injekcija ar rekombinantām SFV VLP, kas ekspresē IL-12, izraisa audzēja nekrozi, kā rezultātā par 70–90% tiek aizkavēta audzēja augšana B16 peļu melanomas modelī [42]. Tomēr šajā agrīnajā pētījumā nav panākta pilnīga audzēja regresija.

Ir izstrādāti vairāki SFV vektori, lai ekspresētu dažāda veida citokīnus un aktivizētu pretvēža imunitāti resnās zarnas vēža modeļos. Viena intratumorālā  $10^7$  un  $10^8$  SFV IL-12 VLP injekcija izraisīja pilnīgu audzēja regresiju attiecīgi 36% un 80% peļu MC38 resnās zarnas adenokarcinomas modelī. Turklāt IL-12 gēna sapludināšana (*fusion*) ar dabisku SFV kapsīdas translācijas pastiprinātāju (*enhancer*) ievērojami palielināja IL-12 ekspresiju un noveda pie efektīvākas audzēja regresijas ārstētajās pelēs. Lai nodrošinātu pilnīgu audzēja regresiju visās pelēs ar resnās zarnas karcinomu (MC38 modelis), bija nepieciešamas sešas augsta titra SFV10-Enh VLP devas, kas ekspresē IL-12. Ārstēšanas stadijā tika novērots audzēja pietūkums, ko izraisīja intratumorālā nekroze un iekaisums, un CD4 + un CD8 + T šūnu pieplūdums, kas veicināja pretvēža efektu [41, 42]. Chikkanna-Gowda un kolēģi novēroja daudzsoļus rezultātus 4T1 peles krūts vēža modelī [43]. Šajā pētījumā augsta titra SFV-Enh-IL-12 VLP intratumorālā ievadīšana izraisīja pilnīgu audzēja regresiju četrās no sešām pelēm un ievērojami samazināja plaušu metastāžu daudzumu.

## Imunomodulējoši citokīni, kas izmantoti alfavīrusu vektoros

Table 1.1.

## Immunomodulating cytokines expressed by alphaviral vectors

Citokīns	Audzēja modelis	Vektors	Ievadīšanas veids	Terapeitiskā iedarbība
<b>IL-12</b>	peles melanoma B16	SFV VLP	i.t.	daļēja audzēja samazināšana (70%–90%)
	peles resnās zarnas vēzis MC38	SFV VLPs	i.t.	pilnīgs audzēja samazinājums (92%)
	peles resnās zarnas vēzis CT26; peles 4T1 krūts vēzis	SFV-E VLPs	i.t.	pilnīgs audzēja samazinājums
	spontānu hepatokarcinomu L-PK / c-myc transgēnās peles	SFV VLPs	i.t.	audzēja apstāšanās, 100% izdzīvošanas rādītājs
	murkšņa aknu vēzis WCH17	SFV-E VLP	i.t.	daļēja audzēja samazināšana

<b><i>IL-15, IL-12</i></b>	cilvēka olnīcu vēzis ES2	Sin VLPs	i.p.	daļēja audzēja samazināšana
<b><i>IL18</i></b>	peles resnās zarnas vēzis CT26	SFV VLPs	i.t.	daļējs audzēja samazinājums, pilnīgs audzēja samazinājums (36%)
<b><i>IL-18</i></b>	peles resnās zarnas vēzis CT26	SFV-E VLP	i.t.	pilnīgs audzējs samazinājums (33%)
<b><i>IFNalpha</i></b>	peles dzemdes kakla vēža modelis TC-1	SFV VLPs	i.t.	konstatēto audzēju iznīcināšana 58% gadījumu
<b><i>GM-CSF</i></b>	peles olnīcu vēzis MOT	SFV VLPs	i.p.	paaugstināta dzīvildze, daļēja audzēja samazināšana, imūnreakcija

IL-15 un IL-18 var pastiprināt pretvēža imūnās atbildes reakciju SFV un SIN vektoriem peles olnīcu un resnās zarnas vēža modeļos [40], kā rezultātā pēc VLP ievadīšanas daļēji samazinās audzējs. Piemēram, pelēm ar resnās zarnas karcinomu, kas tika ārstētas ar sešām augsta titra SFV10-E VLP inokulācijām, kas ekspresē peles IL-18 gēnu, kurā bija IgG-kappa līdera secība,

tika novērota aizkavēta audzēja augšana, taču pilnīga audzēja regresija tika detektēta tikai 33% gadījumā. Papildus anti-angiogēnajai aktivitātei, IL-18 ir IFN- $\gamma$  inducējošs citokīns, kam ir galvenā loma Th1 šūnu mediētās imūnās atbildes agrīnā aktivācijā. Lai gan tika novērota visu ārstēto audzēju aizkavēta augšana, pilnīga audzēju regresija tika konstatēta tikai 33% ārstētajās pelēs.

Citā pētījumā SFV vektors, kas ekspresē peļu IFN- $\alpha$ , tika novērtēts uz pelēm ar TC-1 audzējiem, kas ekspresē cilvēka papilomas vīrusa proteīnus E6 un E7. IFN- $\alpha$  ir plejotrops citokīns, kas ar savu tiešo antiproliferatīvo aktivitāti spēj palielināt pretaudzēju imunitāti. Lai gan IFN- $\alpha$  piemīt pretvīrusu aktivitāte, no SFV iegūtais IFN- $\alpha$ vēža šūnas tika ražots augstā līmenī. SFV-IFN- $\alpha$  vektora intratumorālā injekcija subkutāni TC-1 audzējiem izraisīja E7 specifisku citotoksisku T limfocītu reakciju un modificēja audzēju mikrovidi, samazinot regulatoro T šūnu procentuālo daudzumu un aktivējot mieloīdu šūnas. Līdz ar to SFV-IFN- $\alpha$  iznīcināja 58% konstatēto audzēju, kas tika ārstēti 21 dienu pēc vēža šūnu implantācijas. Turklāt tika novērota ilgstoša izdzīvošana no audzējiem un ļoti zema vektora toksicitāte [44].

Granulocītu-makrofāgu koloniju stimulējošais faktors (GM-CSF) ir imūnstimulējošs citokīns, kas aktivē dendrītiskās šūnas un var pārprogrammēt audzēja mikrovidi. SFV VLP vektori tika izmantoti olnīcu vēža imūnterapijai ar GM-CSF. SFV-GM-CSF VLP intraperitoneālā injekcija peļu olnīcu audzēja modelī palielināja infiltrēto makrofāgu un neitrofilu skaitu. Šajā pētījumā tika novērota neliela audzēja augšanas inhibīcija bez izdzīvošanas ieguvuma. Lielas SFV-atvasinātās GM-CSF devas var izraisīt kaitīgu iedarbību, nomācot imūnsistēmu, kā arī aktivējot un paplašinot no mieloīdajām šūnām atvasinātās supresoru šūnas (*myeloid derived suppressor cells*, MDSC).

Citokīnu piegāde ar vīrusu vektoriem joprojām ir daudzsoļa alternatīva citokīnu kā rekombinanto olbaltumvielu ievadīšanai, jo vektori nodrošina citokīnu intratumorālo ekspresiju un lēnu seruma līmeņa paaugstināšanos, tādējādi izvairoties no citokīnu toksicitātes un nestabilitātes.

#### **1.4. TNF-alfa vispārīgais raksturojums**

Audzēja nekrozes faktors (*tumor necrosis factor*, *TNF*) tiek uzskatīts par svarīgu citokīnu, kas var veicināt vēža šūnu iznīcināšanu. Šis proteīns izraisa imūnreakciju pret jebkuru ārēju stimulu, piemēram, iekaisumu, infekciju vai traumu. Ir divu veidu TNF: alfa un beta. TNF-alfa

ir reti atrodams vesela cilvēka asinīs. To iespējams detektēt tikai gadījumos, kas saistīti ar patoloģisko mikroorganismu infekcijām, histamīnu, indes iekļūšanu organismā utt. Organisma reakcijas laiks uz šiem kairinājumiem ir aptuveni 40 minūtes, un pēc 1,5-3 stundām TNF-alfa koncentrācija serumā sasniedz maksimumu. Turpretī TNF-beta tiek konstatēts asinīs tikai pēc 2-3 dienām pēc saskares ar antigēnu [45].

Eksperimenti ar pelēm ir ļāvuši konstatēt onkoloģiskā procesa atkarību no TNF koncentrācijas ķermenī - jo augstāks ir tā līmenis, jo ātrāk tiek iznīcināti vēža audi. Audzēja nekrozes faktors aktivizē īpašus receptorus, kas identificē ļaundabīgas šūnas, bloķē to tālāku dalīšanos un veicina to nāvi (nekrozi). Tādā pašā veidā TNF darbojas uz šūnām, kas inficētas ar vīrusiem un citiem patogēniem mikroorganismiem, taču patoloģisko šūnu iznīcināšanas procesā tas neietekmē veselos audus.

TNF-alfa ir multifunkcionāls, iekaisuma procesu regulējošs citokīns, ekstracelulārais proteīns, ko sintezē galvenokārt monocīti un makrofāgi. Tas ietekmē lipīdu vielmaiņu, koagulāciju, insulīna rezistenci un endotēlija darbību, stimulē IL-1, IL-6, IL-8 un interferonu-gamma, aktivizē leikocītus un ir viens no svarīgākajiem aizsardzības faktoriem pret intracelulāriem parazītiem un vīrusiem [46].

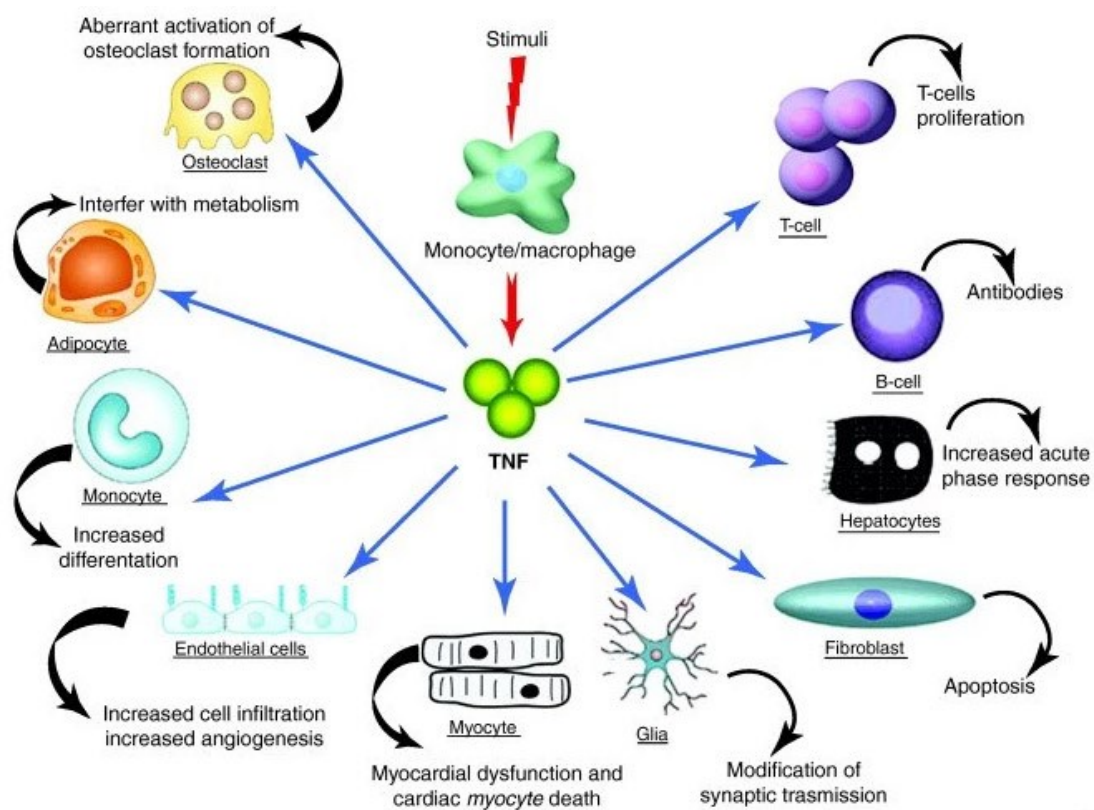
Papildus tā citotoksiskajam (pretvēža) efektam, šis proteīns:

- piedalās imūnsistēmas pašregulācijā, aktivizē aizsardzības spēkus;
- ir atbildīgs par šādiem procesiem organismā:
  - o imūnšūnu (leikocītu) migrācija (kustība);
  - o apoptoze (ļaundabīgo šūnu sabrukšana un nāve);
  - o angioģenēzes (audzēja asinsvadu veidošanās un izplatīšanās) bloķēšana;
- var ietekmēt vēža šūnas, kas ir izturīgas pret ķīmijterapijas līdzekļiem.

#### **Galvenie TNF bioloģiskie efekti ir šādi:**

- līdzdalība imūnreakcijās;
- iekaisuma regulēšana;
- ietekme uz hematopoēzes procesu;
- citotoksiska iedarbība.

Ja ķermenī nokļūst mikrobi, vīrusi vai sveši proteīni, tad uzreiz aktivizējas imunitāte. TNF veicina T un B limfocītu skaita pieaugumu, bloķējot iekaisumu.



**1.3.att. Audzēja nekrozes faktora (TNF) ietekme uz ķermeņa šūnām.** TNF stimulē citas imūnās šūnas - makrofāģus, dendrītiskās šūnas, T šūnas, tauku šūnas un fibroblastus. It īpaši tas ietekmē endotēlija šūnas, kas saistītas ar mūsu asinsvadiem, izraisot vaskulāras problēmas un būtiski ietekmējot vēža attīstību, jo tas izraisa angiogēnēzi un palielina asinsvadu veidošanos (hipervaskularizāciju). TNF negatīvi ietekmē zarnu šūnas, izraisot šūnu apoptozi. TNF stimulē makrofāģus un efektorās T šūnas, kas izraisa papildus iekaisuma citokīnu ražošanu un rezistenci pret apoptozi, veicinot vēža veidošanos.

**Figure 1.3. Effect of Tumor Necrosis Factor (TNF) on body cells.** TNF stimulates other immune cells - macrophages, dendritic cells, T cells, fat cells and fibroblasts. In particular it affects endothelial cells associated with our blood vessels, causing vascular problems and significantly affecting the development of cancer as it promotes angiogenesis and increases blood vessel formation (hypervascularization). TNF negatively affects intestinal cells, causing cell apoptosis. TNF stimulates macrophages and effector T cells that cause the production of more inflammatory cytokines and apoptosis resistance, promoting formation of cancer).

Avots: [http://www.newhealthoptions.org/?page\\_id=2653](http://www.newhealthoptions.org/?page_id=2653)

Audzēja nekrozes faktors ietekmē hematopoēzi. Tas inhibē eritrocītu, limfocītu un citu hematopoētisko šūnu vairošanos, bet gadījumā, ja hematopoēze tiek pārtraukta jebkāda iemesla dēļ, TNF to stimulē. Papildus tam, daudziem citokīniem, ieskaitot TNF, piemīt aizsargājoša spēja pret starojumu [47].

Audzēja nekrozes faktoru var noteikt ne tikai asinīs un urīnā, bet arī smadzeņu šķidrumā, kas norāda uz tā starpsistēmu iedarbību. Šis proteīns regulē nervu un endokrīno sistēmu darbību. TNF-beta darbojas galvenokārt lokāli, taču TNF-alfa regulē sistēmiskas imunitātes, iekaisuma un vielmaiņas izpausmes [48].

Viens no svarīgākajiem TNF efektiem ir šūnu iznīcināšana, kas pilnībā spēj apturēt audzēju attīstību. TNF darbojas uz audzēja šūnām, izraisot to nāvi, atbrīvojot brīvos radikāļus, aktīvās skābekļa formas un slāpekļa oksīdu. Tā kā atsevišķas vēža šūnas tiek veidotas jebkurā organismā visu mūžu, TNF ir nepieciešams arī veseliem cilvēkiem, lai tās savlaicīgi un ātri neitralizētu.

Augstas TNF koncentrācijas negatīvā ietekme izpaužas smagā šokā pret septisko slimību apstākļiem [48].

Papildus audzēja šūnām, TNF iznīcina arī šūnas, kas inficētas ar vīrusiem, parazītiem, sēnītēm. Tā darbība kopā ar citiem iekaisuma proteīniem izraisa paaugstinātu ķermeņa temperatūru un lokālus mikrocirkulācijas traucējumus [49].

Papildus aprakstītajām īpašībām, TNF nodrošina arī reparatīvo funkciju. TNF aktivizē asins koagulācijas sistēmu, kas izraisa iekaisuma zonu, ierobežojot mikrocirkulācijas procesu. Mikrotrombi novērš infekcijas izplatīšanos [49].

Nemot vērā, ka šis citokīns izraisa plašus toksiskus efektus organismā, tā pielietošana medicīnā ir ierobežota. Tomēr nesen publicētie pētījumi liecina, ka lokāla TNF-alfa ekspresija vai mērķtiecīga citokīna piegāde varētu kļūt par efektīvu, komplementāru terapiju dažādu slimību ārstēšanai, ieskaitot pretvēža terapiju [46].

### **1.5. Magnētiskas nanodaļiņas un to raksturojums**

Magnētiskās nanodaļiņas ir mazas feromagnētiskās daļiņas, ar kurām var veikt dažādas manipulācijas, izmantojot magnētisko lauku [50]. Pie vielas pārejas nanostāvoklī būtiski mainās tās magnētiskās īpašības, kā rezultātā nanodaļiņām piemīt feromagnētiskas un supermagnētiskas īpašības.

Par superparamagnētiķiem daļiņas kļūst tad, kad tām pieliek magnētisko lauku, bet feromagnētiem ir nemainīgs vidējais magnētiskais moments un tiem ir stiprākas magnētiskās īpašības [51].

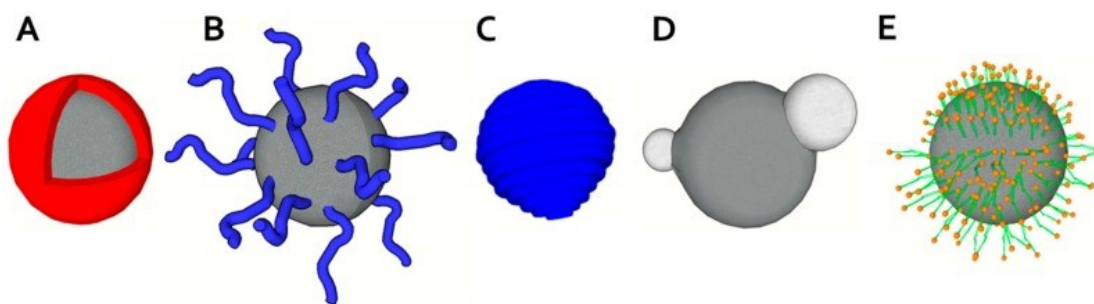
Nanodaļiņu aktīvā virsma nodrošina augstu sorbcijas spēju. Tā kā to izmērs ir mazāks par 100 nm, nanodaļiņas var efektīvi mijiedarboties ar tādiem bioloģiskajiem objektiem kā, piemēram, šūnām, kuru lielums ir 10-100 mikroni, vīrusiem (20-450 nm), proteīniem (5-50 nm) un pat DNS (2 nm platums, 10-100 nm garums) [51]. Vairumā gadījumu daļiņas svārstās no 1 līdz 100 nm un var uzrādīt supermagnētiskas īpašības.

Dzelzs oksīda nanodaļiņas (dzzelzs oksīdiem ir maghemīta vai magnetīda kristāliskā struktūra) ir visvairāk izpētītās magnētiskās nanodaļiņas. Kad ferīta daļiņas kļūst mazākas par 128 nm [50], tās kļūst par superparamagnētiskajām daļiņām un tās demonstrē savu magnētisko darbību tikai tad, ja tiek izmantots ārējs magnētiskais lauks. Maghemīta magnētiskās nanodaļiņas virsma ir relatīvi inerta. Tomēr to var pārveidot, pārklājot ar polimēriem [52].

### **1.6. Perspektīvas pieejas terapijai, pamatojoties uz magnētiskajām nanodaļiņām**

Magnētisko nanodaļiņu priekšrocība ir magnētisma klātbūtne un vairāku magnētisko materiālu, piemēram, dzelzs oksīda, relatīvā drošība. To medicīniskais pielietojums ir kļuvis iespējams, pateicoties efektīvai izpētei un vairāku unikālu MNPs fizikālo parametru atklāšanai. Tiek aplūkoti tādi MNPs pielietojumi kā magnētiskā atdalīšana (separācija), magnētiskā hipertermija, magnētiskā mērķtiecīgā piegāde medicīnā un magnētiskās rezonanses tomogrāfija [51].

Terapeitiskiem nolūkiem MNPs reti izmanto tīrā veidā. Tās parasti iekapsulē vai ievieto bioloģiski inertās matricās (dažādos organiskos savienojumos vai polimēros, ieskaitot dabiskas izcelsmes polimērus), lai samazinātu magnētiskās fāzes iespējamo toksisko iedarbību, palielinātu tā fizikāli-ķīmisko stabilitāti un veidotu imobilizācijas iespēju uz zāļu matricas virsmas (1.4.att.) [52].



1.4.att. **Magnētisko daļiņu struktūras un to pārklāšanas shēmas.** (A) magnētiskā daļiņa; (B) magnētiska nanodaļiņa, kas pārklātā ar polimēru; (C) magnētiskā daļiņa, kas pilnībā iekapsulēta polimēra pārklājumā; (D) heterodimēra magnētiskā daļiņa; (E) idrofoba magnētiskā daļiņa, kas iekapsulēta lipīdu monoslānī (augšējā daļā) un hidrofila magnētiskā daļiņā lipīdu dubultslānī [51].

*Figure 1.4. Structures of magnetic particles and their coating schemes.* (A) Core-shell magnetic particle; (B) End-grafted polymer coated magnetic nanoparticle; (C) Magnetic particle fully encapsulated in polymer coating; (D) Heterodimer magnetic particle; (E) Hydrophobic magnetic particle encapsulated within lipid monolayer (upper part) and hydrophilic magnetic particle within lipid bilayer (modified from [51] with permission).

Mērķtiecīgu terapeitisko līdzekļu piegādi kopā ar MNPs ierosināja K. J. Vidērs (*K. J. Widder*) 1978. gadā [53]. Šī pieeja audzēju ķīmijterapijā var ievērojami samazināt zāļu devu, blakusparādības un nespecifisko negatīvo ietekmi uz ķermeni [52]. Ar magnētiskajām daļiņām saistītas pretvēža zāles var novirzīt uz audzēju, izmantojot ārējā magnētiskā lauka spēku [53].

Pašlaik ir veikti vairāki pētījumi, kur tika pārbaudītas uz nanodaļiņu virsmas nostiprināta doksorubicīna piegādes iespējas eksperimentālajā dzīvnieku audzēja modelī [53,54,55]. Tika parādīts, ka nanodaļiņas, kam tika piestiprinātas zāles, spēj pārvarēt asins-smadzeņu barjeru (fizioloģiska barjera starp asinsrites sistēmu un centrālo nervu sistēmu), tādējādi veicot nanodaļiņu piegādi žurku audzējos [54]. Tāpat ir veikti pētījumi ar dzelzs oksīda nanodaļiņām, kas modificētas ar cieti, par epirubicīna piegādi sarkomas un cilvēka karcinomas terapijai [54].

Šobrīd norisinās klīnisko pētījumu pirmā un otrā stadija aknu karcinomas ārstēšanai, izmantojot MNPs [51]. Mērķtiecīga piegāde var noritēt veselu orgānu ārstēšanas līmenī vai tikai noteiktās šūnās. Tā tiek palielināta, izmantojot lektīnu, antivielas un to fragmentus, citokīnus, proteīnus un hormonus [52].

Gēnu terapija ir viena no daudzsoļākajām pieejām dažādu cilvēku slimību ārstēšanai: onkoloģisko, infekcijas un deģeneratīvo slimību. Specifisko DNS, RNS vai oligonukleotīdu piegāde noteiktajās šūnās var nomākt gēnu ekspresiju vai iniciēt svarīgu proteīnu sintēzi.

Galvenā gēnu terapijas problēma ir ārstniecisko vielu piegāde noteiktajās šūnās un transfekcijas efektivitātes paaugstināšanas iespējas [53,54].

Neskatoties uz augsto efektivitāti, vīrusu vektoru izmantošanai pastāv patogenitātes un imunogenitātes risks, tādēļ nanodaļiņu piegāde var kļūst par jaunas terapijas veidu [51, 52].

Iepriekš ir pierādīts, ka ārējais magnētiskais lauks, kas tiek ģenerēts ar magnētu, palielina MNPs-vīrusa kompleksu koncentrāciju uz šūnu virsmas, tādējādi uzlabojot transdukcijas efektivitāti [51]. Magnetiskās transdukcijas efektivitāte ir pierādīta ar vairākiem vīrusiem: retrovīrusu [18, 19, 20], rabdovīrusu [21], parvovīrusu [22], paramiksovīrusu [23] un adenovīrusu [20, 21, 24,25]. MNPs-vīrusu kompleksi, kas veidojas no elektrostātiskās un hidrofobās mijiedarbības, ir viegli iegūstami atšķirībā no specifiskiem ligandu-ligandu mijiedarbības kompleksiem, kuriem ir nepieciešama vīrusa un nanodaļiņu ķīmiska pārveidošana. Tas paver jaunas iespējas *in vivo* pētījumos, un ir jau parādīta magnētiski iezīmētu vīrusu daļiņu efektivitāte, izmantojot ārēji pielietotu magnētisko lauku [53]. Turklāt MNP uzkrāšanos var skaidri vizualizēt ar magnētiskās rezonanses palīdzību [32], kas ļauj izsekot vektoru piegādei ar MNPs marķēšanas līdzekļiem.

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

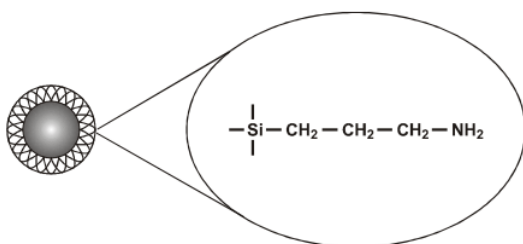
### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Magnētiskās daļiņas

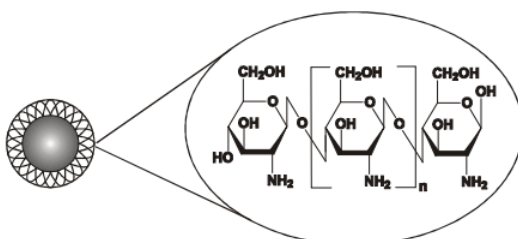
Šajā pētījumā tika izmantoti ūdens dispersijas magnētisko nanodaļiņu kompleksi.

MNPs struktūra:

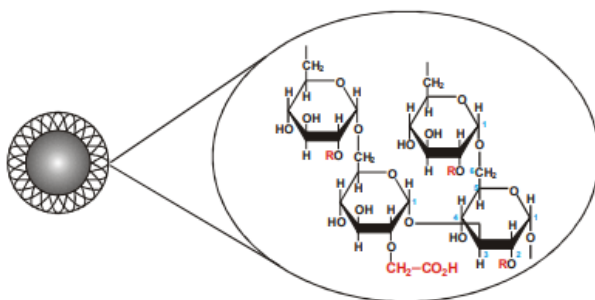
##### 1. Fluid-Mag Amine



##### 2. Fluid-Mag Chitosan



##### 3. Fluid-Mag CMX (*Carboxymethyl-dextran*)



**Magnētisko nanodaļiņu īpašības**

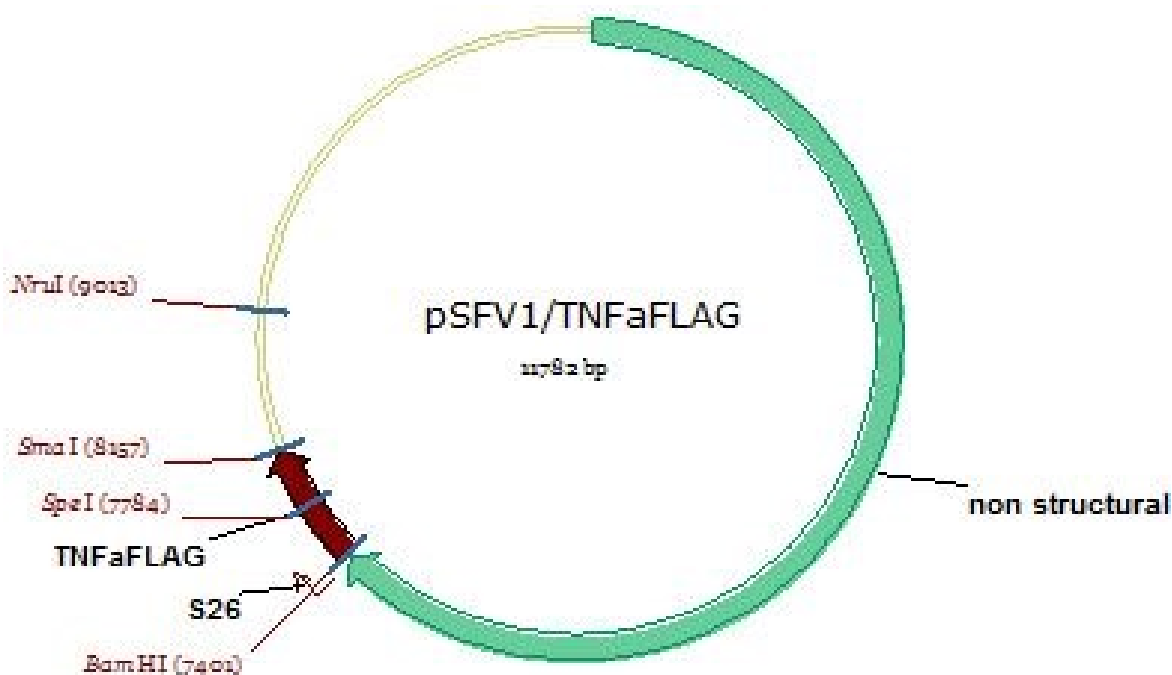
Table 2.1.

**Properties of the magnetic nanoparticles**

<b>Magnētiskās nanodaļiņas</b>	<b>Ražotājs</b>	<b>Kodols</b>	<b>Pārklājums</b>	<b>Lādiņš</b>	<b>Hidrodinamiskais diametrs</b>	<b>Koncentrācija</b>
FluidMag Amine	Chemicell (Vācija)	Magnetīts (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	aminosilāns	+	50 nm	25 mg/ml
FluidMag Chitosan	Chemicell (Vācija)	Magnetīts (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	hitozāns	+	50 nm	25 mg/ml
FluidMag CMX	Chemicell (Vācija)	Magnetīts (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	karboksimetil-dekstrāns	-	50 nm	25 mg/ml

### 2.1.2. Rekombinantie alfavīrusu vektori

Šajā pētījumā tika izmantoti iepriekš publicētie alfavīrusu vektori: pSFV1/RFP, pSFV1/GFP, SFV Helper, pSFV1/TNFalpha (2.1.att.) [55, 56].



2.1.att. pSFV1/TNFalfa vektora struktūra. pSFV1/TNFaFLAG – plazmīdas restrikcijas karte: SFV

Figure 2.1. The structure of pSFV1/TNFalpha vector. pSFV1/TNFaFLAG – plasmid restriction map: SFV.

### 2.1.3. Šūnu līnijas

Darbā tika izmantotas piecas vēža šūnu līnijas:

BHK-21 – Sīrijas zeltainā kāmjā jaundzimušā mazuļa nieru fibroblastu šūnu līnija (*Baby Hamster Kidney – 21*);

TS/A – metastazējoša peles krūts adenokarcinomas šūnu līnija;

4T1 – metastazējoša peļu krūts vēža šūnu līnija;

B16 — peļu melanomas šūnu līnija;

Huh-7 — cilvēka hepatomas šūnu līnija.

## 2.1.4. Šūnu barotnes

2.2.tabula.

### Šūnu kultivēšanas barotnes un to piedevas

Table 2.2.

#### Cell culture media and their additives

Barotne	Ražotājfirma	Ražotājvalsts
Minimālā barotne (MEM)	Invitrogen	ASV
Dulbeko modificētā Īgla barotne (DMEM)	Invitrogen	ASV
Teļa fetālais serums ( <i>fetal bovine serum</i> /FBS)	Invitrogen	ASV
Penicilīna un streptomicīna maisījums (100u/ml un 100µg/ml)	Invitrogen	ASV

Bufēršķīdumi: Reāģents	Ražotājfirma	Ražotājvalsts
Fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums ( <i>Phosphate buffered saline</i> /PBS) 10x + Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup>	Invitrogen	ASV

Enzīmi: Reāģents	Ražotājfirma	Ražotājvalsts
Tripsīns-EDTA	Invitrogen	ASV

## 2.1.5. Materiāli

2.3.tabula.

### Izmantotie materiāli

Table 2.3.

### Supplies used in this study

Materiāli	Raksturojums	Ražotajs, Valsts
Gumijas cimdi	Lateksa cimdi bez pulvera	Great Glove, Malaizija
Šūnu matračī	CELLSTAR <sup>®</sup> Standard Cell	Greiner Bio-One, Vācija
Šūnu skrāpji	NUNC <sup>™</sup> Cellscraper 32 cm	Thermo Scientific, ASV
Seroloģiskās pipetes	5 ml; 10 ml; 25 ml	GenFollower, Ķīna
Plastikāta mēģenes	15 ml; 50 ml; 120x17 mm	Sarstedt, ASV
Mikromēģenes ( <i>ependorfi</i> )	1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Vācija

## 2.1.6. Ierīces

2.4.tabula.

Darbā izmantotā aparātūra

Table 2.4.

Equipment used in this study

Aparātūra	Modelis	Valsts	Ražotājs
Automātiskā pipete	PIPETBOY acu	Šveice	Integra Biosciences
Centrifūga	5417R	Vācija	Eppendorf
Laminārs	KOJAIR®KR-130	ASV	Kojair Tech Oy
Ūdens vanna- termostats	WB-4MS	Latvija	Biosan
Termostats	Thermo-Block TDB-120	Latvija	Biosan
Magnēts ( <i>Permanent magnet</i> )	Universālā magnēta plate MATra (8 x 13 cm)  7-2011-000	Vācija	IBA Lifesciences
Magnētu statīvs	MagRack 6	Vācija	GE Healthcare
Plūsmas citometrs	FACSAria II	ASV	Becton Dickinson Biosciences

## 2.1.7. Programmas

BD FACSDiva 6.1.2, VectorNTi, Excel programmatūra.

## 2.2. Metodes

### 2.2.1. Šūnu audzēšana

Šūnu kultivēšana notika 12 aiļu un 24 aiļu platēs. B16 un Huh-7 šūnas tika audzētas 12 aiļu platē DMEM barotnē ar GlutaMAX un 10% FS piedevu un gentamicīnu (40 µg/ml) līdz šūnas sasniedz 70-100% konfluenci.

4T1 un TS/A šūnas tika audzētas 12 aiļu platē DMEM barotnē ar L-glutamīnu (2mM) un 10% FS līdz 70-100% konfluenci.

BHK šūnās tika audzētas 24 aiļu platē DMEM barotnē ar 5% FS, L-glutamīnu (2mM), Hapes (20 mM), penicilīnu/streptomicīnu (PEST, x1) un triptozī (10 %) līdz 70-100% konfluenci.

Visas šūnas tika audzētas inkubatorā pie 37 °C un 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.2. Šūnu infekcija ar SFV1/GFP un SFV1/ TNFalfa vīrusiem

1) BHK (4T1, Huh-7, B16, TS/A) šūnas (90% konfluences) skalo ar PBS++ (10 mL uz 75 cm<sup>2</sup> šūnu matrača) divas reizes. Pievieno vīrusu saturošu šķīdumu (6 mL). Vīrusu atšķaida ar PBS++ attiecībā 1:3 vai 1:5 (1 mL vīrusa + 4 mL PBS++). Šūnas inkubē pie 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 1 h, katras 15 min viegli pakratot šūnu matraci, lai vīruss spētu vienmērīgi iedarboties uz visām šūnām. Pēc tam vīrusa šķīdumu aizvieto ar standarta barotni (10-12 mL, lai veidotu lielāku koncentrāciju). Šūnas inkubē 24 h inkubatorā pie 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

Izmantotie vīrusi:

- SFV1/GFP ar titru  $4 \times 10^6$  i.u./ml
- SFV1/TNF-alfa  $4 \times 10^6$  i.u./ml

### 2.2.3. MNPs/vīrusu kompleksu veidošana un šūnu transdukcija

Plastmasas stobriņos safasē pa 90 µL DMEM + GlutaMAX (bez FS). Katrā stobriņā pievieno 10 µL SFV/Red vīrusa ( $4 \times 10^6$  i.u./ml). 1., 2. un 3. stobriņā pievieno 1 µL attiecīgo magnētisko daļiņu: Fluid-Mag Amine; Fluid-Mag Chitosan; Fluid-Mag CMX (daļiņas pirms pievienošanas kārtīgi samaisa). Atstāj istabās temperatūrā uz 30 min, katras 5 min savorteksējot plastmasas stobriņus. Pēc aptuveni 20 min sagatavotajām šūnām (audzētas 12 aiļu platē) nosūc barotni un

mazgā ar 1 mL 1x PBS++. Pēc 30 min stobriņos, kas satur MNPs, un negatīvo kontroli (k-) pievieno pa 900 µL 10% barotnes (DMEM + GlutaMax + 10% FS). Pozitīvajai kontrolei (k+) pievieno 900 µL PBS++. Samaisa un šķīdumu pievieno sagatavotajām šūnām. Šūnas inkubē uz **silta!** magnēta inkubatorā pie 37 °C, CO<sub>2</sub>. Pēc tam šūnām pievienoto šķīdumu nomaina ar barotni (DMEM + GlutaMax + FS 10%) un inkubē līdz nākamajai dienai.

#### **Nākamajā dienā:**

Šūnu paraugus aplūko fluorescences mikroskopā pie dažādiem palielinājumiem un saglabā iegūtos attēlus. Šūnas mazgā ar 1 mL PBS--. Šūnām pievieno 300 µL tripsīna 1:5 (1 mL tripsīna + 4 mL PBS--). Inkubē 4 min 37 °C. Kārtīgi suspendē šūnas. Pievieno 2 mL barotnes, lai apstādinātu tripsīna darbību, un centrifugē 5 min. Noņem augšējo slāni un pievieno 1 mL PBS-/- . Šūnas resuspendē un analizē ar plūsmas citometru.

#### **2.2.4. Vīrusa notveršana (koncentrēšana) ar MNPs**

Tiek izmantotas divas 12 aiļu plates ar BHK šūnām.

1,5 mL plastmasas stobriņos ielej pa 280 µL atbilstošās vides (DMEM, 500 mM NaCl, BHK 5%, 10 mM PBS-/- (pH 7.0)). Pievieno 10 µL SFV/-Red vīrusa, izņemot (k-). Pievieno 1 µL magnētisko daļiņu, izņemot (k-) un (k+). Paraugus rotē 1 h aukstajā istabā. Pēc tam 10 min paraugus tur magnētiskajā statīvā, lai izgulsnētu vīrusu/magnētisko daļiņu kompleksus un iegūtu no vīrusa atbrīvotu supernatantu. Supernatantu pārnes tīros stobriņos.. Pie palikušajām MNPs pievieno 300 µL atbilstošās vides. Visos stobriņos pievieno 700 µL PBS++.

Aptuveni 10 min pirms ir gatavi supernatanti, sagatavotās šūnas mazgā ar PBS++. Kad visi kompleksi un supernatanti ir gatavi, tos uzlej uz šūnām un inkubē 40 min uz plašu magnēta 37 °C. Pēc tam turpina inkubāciju vēl 30 min bez magnēta 37 °C. Beigās vīrusa šķīdumu nomaina pret 1% BHK barotni un inkubē 18 h.

#### **Nākamajā dienā:**

Šūnas mazgā ar 1 mL PBS--. Šūnām uzlej 300 µL tripsīna (1 mL tripsīna + 4 mL PBS--) un inkubē 4 min 37 °C. Suspendē 2 mL 1% BHK barotnes. Centrifugē, augšējo slāni nolej, lai atbrīvotos no tripsīna, un pie šūnu nogulsnēm pievieno PBS-- . Resuspendē 1 mL PBS-- un šūnas analizē ar plūsmas citometru.

### 2.2.5. Plūsmas citometrija

Plūsmas citometrija ir tehnika mikroskopisku daļiņu saskaitīšanai un analizēšanai, suspendējot tās šķidrums plūsmā un analizējot šādu plūsmu ar lāzeriem.

Inficētās šūnās tika savāktas 18-24 h pēc transdukcijas. Šūnas atdalīja no kultivēšanas platēm ar 0,05% tripsīna šķīdumu, mazgāja un atkārtoti suspendēja 1 ml PBS, un tūlīt apstrādāja analīzei ar plūsmas citometru. Ds-Red fluorescence tika mērīta, izmantojot FACSAria II (*Becton Dickinson Biosciences*, Sanhosē, Kalifornija, ASV) plūsmas citometru. Plūsmas citometrijas dati tika analizēti ar BD FACSDiva 6.1.2 programmatūru; neinficētās šūnas tika izmantotas kā negatīvā kontrole.

### 2.2.6. Vīrusa titra noteikšana

Vīrusa titra aprēķināšanai tika izmantots vidējais pozitīvo šūnu skaits vienā mikroskopa redzes laukā. Katram atšķaidījumam tika izvēlēts ne mazāk par astoņiem dažādiem redzes laukiem.

\* Titrs - šūnu skaits, kas var pārnest 1 ml vīrusu daļiņu (transdukcijas vienības, i.u./ml).

Redzes lauka lielumu aprēķina, izmantojot izvēlēto mikroskopa objektīva lēcas 10X vai 20X palielinājumu.

Vīrusa titra aprēķināšana 12 un 24 aiļu platē:

$$\text{Vīrusatitrs} = \frac{(\text{vidējais pozitīvais šūnu skaits/lauks}) \times (79 \text{ lauki/ailes}) \times (\text{vīrusa atšķaidījums})}{0,1 \text{ ml}}$$

## Redzes lauks objektīvam

Table 2.6.

## Field sizes of objective lenses

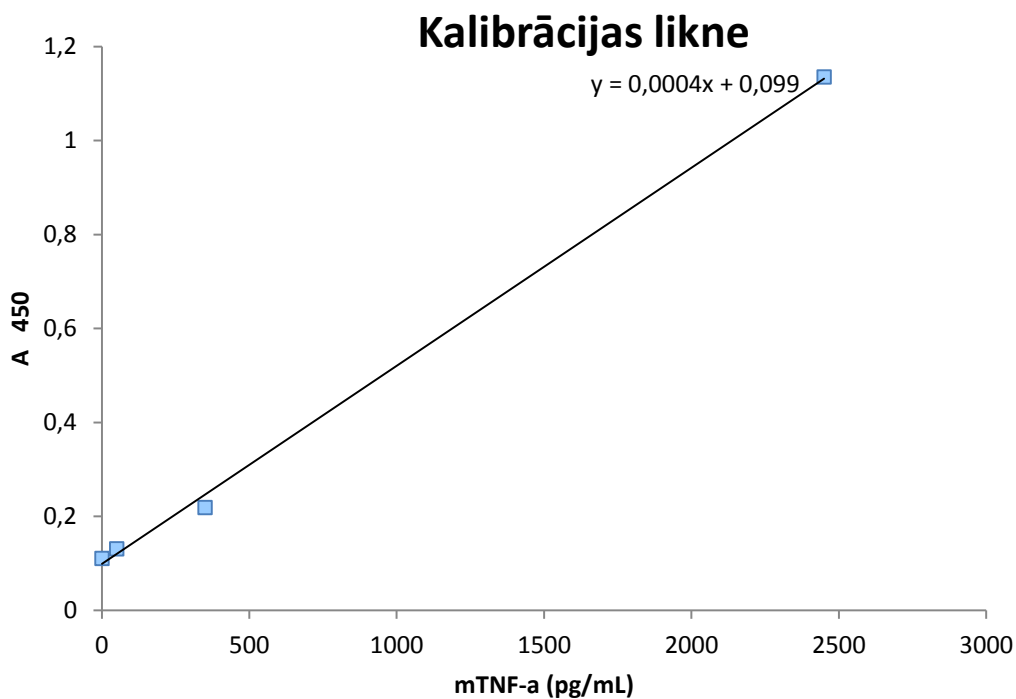
Objektīva lēca	Palielinājums	12 aiļu plate	24 aiļu plate	Laukuma diametrs, mm	Laukuma platība, mm <sup>2</sup>
10X	100X	150	79	5	2,54
20X	200X	594	313	0,9	0,64

## 2.2.7. ELISA metode

Darbā tika izmantots enzīmu imunosorbcijas tests ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). ELISA ir klasiska un viena no visbiežāk izmantotajām laboratorijas metodēm, un to galvenokārt izmanto diagnostikā, lai noteiktu specifiska antigēna vai antivielas esamību paraugā, kā arī šīs vielas daudzumu. Metodes pamatā ir noteikta antigēna piestiprināšana pie cietas virsmas, piemēram, mikroplatēm. Šim antigēnam tiek pievienotas specifiskas antivielas, kas saistās ar antigēnu. Antivielas, savukārt, ir saistītas ar specifisku enzīmu. Pēc antivielu pievienošanas veic mikroplašu skalošanu, lai atbrīvotos no antivielām, kas nav saistījušās. Nākamais solis ir attiecīgā enzīma substrāta pievienošana, kā rezultātā notiek enzīma katalizēta reakcija ar tā substrātu un rodas detektējams signāls, kas parasti novērojams kā krāsas izmaiņas. Parauga antigēna daudzumu nosaka, mērot to gaismas absorbciju ar speciālām mikroplašu lasīšanas iekārtām.

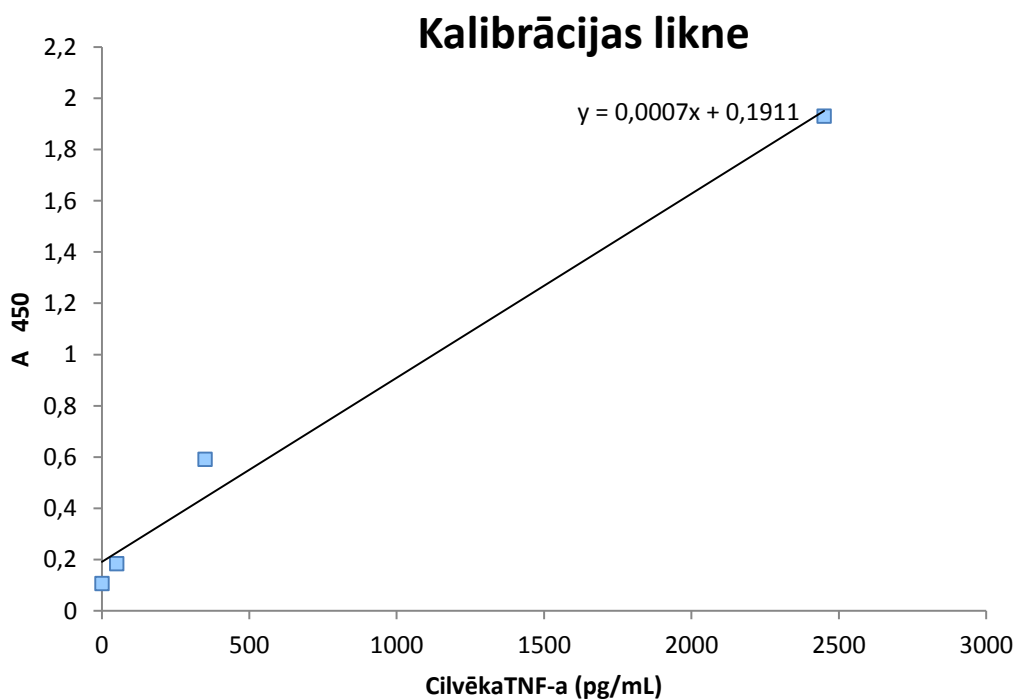
Šī darba ietvaros TNF-alfa daudzums tika mērīts, izmantojot *Sandwich* ELISA metodi ar TNFalfa ELISA komplektu (*Thermo Fisher*). Šajā metodē pētāmais substrāts tika ievietots starp divām antivielām (uztveršanas un detektēšanas antivielas). Lai iegūtu standartlīknei nepieciešamos datus, tika izmantoti standartšķīdumu sērijveida atšķaidījumi divos atkārtojumos.

Standartlīknes:



**2.1.att. Standartlikne peļu TNF alfa koncentrācijas aprēķināšanai**

*Figure 2.1. Calibration curve for mouse TNF alpha concentration*



**2.2.att. Standartlikne cilvēka TNF-alfa koncentrācijas aprēķināšanai**

*Figure 2.1. Calibration curve for human TNF alpha concentration*

Eksperimenta gaitā 96 aiļu mikroplate tiek pārklāta ar iepriekš sagatavotu peles antivielu pret cilvēka TNF-alfa (uztveršanas antiiviela). Pēc 24 h BHK šūnu infekcijas šūnu barotne tika savākta un centrifugēta pie 3000 rpm 10 min. Mikroplatēs tika iepilināti 100 µL paraugu atšķaidījumi un TNF-alfa standarta atšķaidījumi. Parauga un standarta šķīdumos esošais TNF-alfa saistās ar uztveršanas antiivielu, ar kuru ir pārklātas mikroplates. Mikroplates pārklāj ar caurspīdīgu pārklāju un inkubē 2 h istabas temperatūrā. Lai atbrīvotos no savienojumiem, kas nav saistījušies ar TNF-alfa uztveršanas antiivielu, plates trīs reizes skalo ar PBS, kas satur 0,05% Triton X-100 šķīdumu. Pēc tam pievieno 100 µL biotilētu kazas antiivielu pret cilvēka peļu (detektēšanas antiivielu), pārklāj ar caurspīdīgu pārklāju un inkubē 2 h istabas temperatūrā. Lai atbrīvotos no detektēšanas antiivielām, kas nav saistījušās, plates atkārtoti skalo ar PBS/0,05% Triton X-100 šķīdumu. Pēc tam pievieno 100 µL ar mārrotku peroksidāzi konjugētu streptavidīna šķīdumu, inkubē 20 min istabas temperatūrā, tumsā. Pēc tam plati skalo un pievieno 100 µL substrāta šķīdumu un inkubē 20 min istabas temperatūrā, tumsā. Pēc tam katrai mikroplates ailei pievieno 50 µL apstādināšanas šķīduma, viegli pakustina visu plati, lai nodrošinātu pilnīgu samaisīšanos, un novēro krāsu izmaiņas. Gaismas absorbciju mēra pie 450 nm gaismas viļņu garuma.

### **Rezultātu aprēķināšana:**

Rezultātu aprēķināšanai vispirms izveido standartlīknes grafiku, kur uz y ass attēlo ar standarta šķīdumu iegūtās absorbcijas vērtības, bet uz x ass attēlo standarta šķīdumu koncentrāciju. No standarta grafika iegūst grafika taisnes vienādojumu un pēc tā aprēķina TNF-alfa koncentrāciju pētāmajos paraugos. Standarta līknes konstruēšanai izmanto *Microsoft Excel* datorprogrammu.

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1.MNPs /vīrusa kompleksu veidošana un šūnu transdukcija

Šajā pētījumā tika pārbaudīta MNPs iedarbībā kopā ar SFV vektoru, kas uzlaboja gēnu piegādi TS/A un 4T1 peļu krūts vēža modeļos, B16 — peļu melanomas un Huh-7 — cilvēka hepatomas šūnu modelī *in vitro*, pielietojot magnētisko transdukciju. Turklāt tika analizēta MNPs iespējamā izmantošana efektīvai SFV vektoru koncentrēšanai no dažādiem šķīdumiem.

Asins seruma komponenti (pārsvara albumīns), kā arī FS, ko plaši izmanto šūnu kultivēšanai, būtiski inhibē alfavīrusu infekciju. Tāpēc šūnu infekciju ar alfavīrusiem veic bez seruma klātbūtnes. Diemžēl vairākas šūnu kultūras nespēj izturēt bezseruma kultivēšanas apstākļus, kas ierobežo alfavīrusu pielietošanu *in vitro*. Turklāt asins seruma komponenti samazina alfavīrusu gēnu piegādes efektivitāti *in vivo*. Šajā darbā mēs izpētījām MNPs potenciālu paaugstināt SFV transdukcijas spējas FS klātbūtnē četrās šūnu kultūrās:

TS/A un 4T1 – peļu krūts vēža karcinomas šūnu līnijas, ko plaši pielieto *in vivo* peļu eksperimentos, jo tās ir ātri augošas, agresīvas, metastazējošas kultūras, kas labi parāda luminālu histoloģisku morfoloģiju un audzēja hiperaktivāciju. Imūnhistoķīmiskā krāsošana ir parādījusi, ka šīm šūnu kultūrām piemīt augsts proliferācijas līmenis un tās ir ļoti līdzīgas cilvēka audzējiem. Tāpēc šīs kultūras ir labi pielietojamas preklīniskajos krūts vēža karcinomas pētījumos.

4T1 audzēja šūnu augšana un metastātiskā izplatība BALB/c pelēs ļoti līdzinās cilvēka krūts vēzim. Šis audzējs ir dzīvnieka modelis, kas atbilst IV stadijas cilvēka krūts vēzim. 4T1 inducētos audzējus var izmantot gan kā pēcoperācijas modeli, gan arī kā neķirurģisku modeli, jo 4T1 izraisītais audzējs spontāni metastazē abos modeļos ar līdzīgu kinētiku [57, 58].

B16 ir peļu audzēju šūnu līnija, ko izmanto pētījumiem cilvēka ādas vēža modelēšanai. B16 šūnas ir noderīgs modelis metastāžu un cietā audzēja veidošanās pētīšanai, un tas ir viens no pirmajiem efektīvajiem peļu instrumentiem metastāžu pētījumos.

B16 šūnas ir iegūtas no melanīnu ražojošām peles epitēlija šūnām, un tās ir viegli izsekot *in vivo* pēc transplantācijas. To metastāžu izplatība no ādas līdz plaušām, aknām un liesai padara B16 šūnas par noderīgu un paredzamu instrumentu metastātisko ceļu izpētei [58].

B16 ir galvenais peļu modelis melanomas pētījumos, kas pašlaik ir labi izpētīts, bet nezināmu iemeslu dēļ tā infekcija ar alfavīrusiem nav efektīva. Tāpēc ir nepieciešams pārbaudīt MNPs

spēju pastiprināt vīrusa iedarbību un palielināt tā efektivitāti gadījumos, kad šūnas nav viegli inficējamas ar alfavīrusiem. Huh-7 ir cilvēka aknu šūnu līnija (hepatokarcinoma). Tā ir labi diferencēta karcinomas šūnu līnija, kas izolēta no aknu audzēja hepatocītiem 1982. gadā. Huh-7 līnija tiek plaši izmantota C hepatīta vīrusa pētījumos [60]. To izmanto dažādu izcelsmes variantu hepatoprotektoru izpētei, piemēram, reģenerējošas un augošas aknas bioloģiskajai kombinācijai [61]. Viena no būtiskākajām īpatnībām, kas šīs šūnas atšķir no pārējām, ir tas, ka Huh-7 cilvēka šūnu līnija ir jutīga pret FS klātbūtni, kas nozīmē, ka šīs šūnas ātri iet bojā, ja to kultivēšanas barotnei neizmanto FS.

Visas šīs šūnu kultūras, to īpašības un atšķirības tika salīdzinātas un izpētītas šajā darbā, mainot šūnu kultivēšanas vidi.

### **Magnētiskās nanodaļiņas**

Nanodaļiņu magnētiskās īpašības nosaka daudzi faktori: ķīmiskais sastāvs, kristāla režģa veids, daļiņu izmērs (lielums) un forma, morfoloģija (daļiņām ar sarežģītu struktūru), daļiņu mijiedarbība ar apkārtējo matricu un blakus esošajām daļiņām. Mainot nanodaļiņu lielumu, formu, sastāvu un struktūru noteiktās robežās, ir iespējams kontrolēt to magnētiskās īpašības. Tomēr ne vienmēr ir iespējams kontrolēt visus šos faktorus aptuveni vienāda izmēra un ķīmiskā sastāva nanodaļiņu sintēzei, tāpēc līdzīgu nanomateriālu īpašības var ievērojami atšķirties.

Darbā tika izmantotas trīs veidu komerciāli pieejamas MNPs:

- Fluid-Mag Amine
- Fluid-Mag Chitosan
- Fluid-Mag CMX (*Carboxymethyl-dextran*)

MNPs ķīmiskās un fizikālās īpašības ir norādītas *3.1.tabulā*:

Table 3.1.

## Properties of magnetic nanoparticles

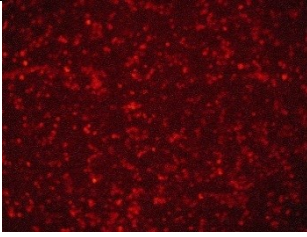
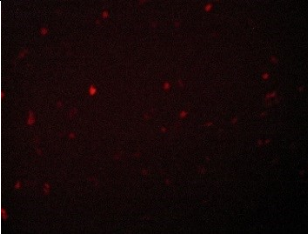
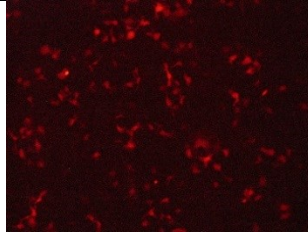
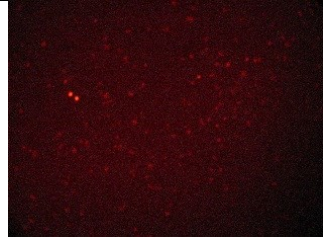
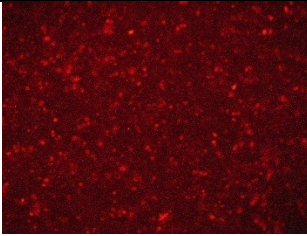
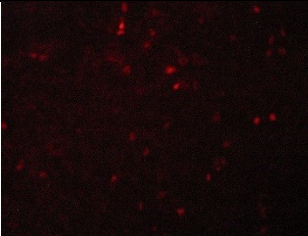
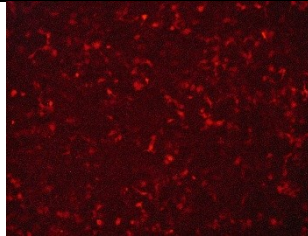
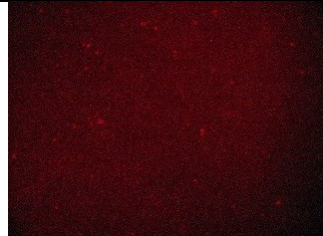
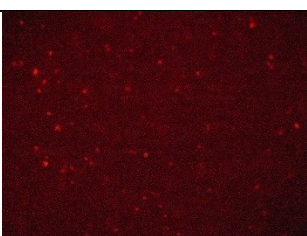
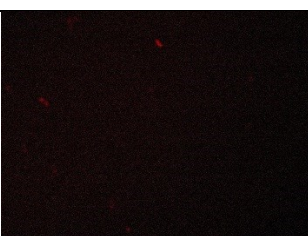
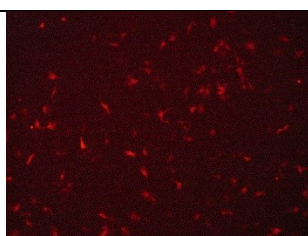

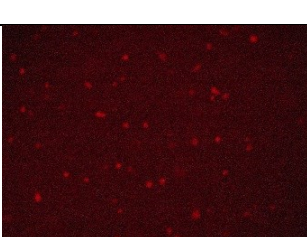
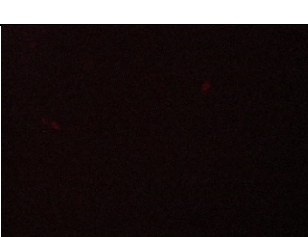
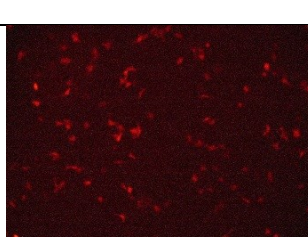
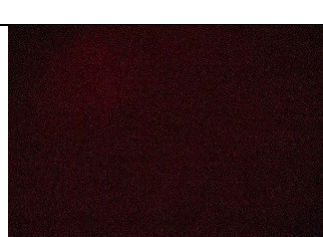
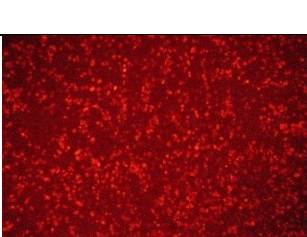
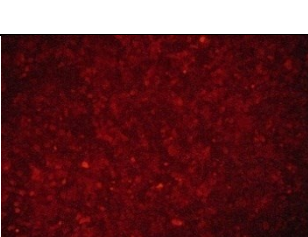
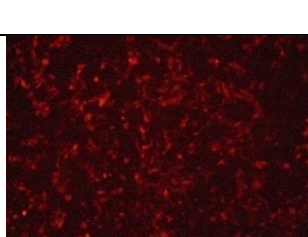
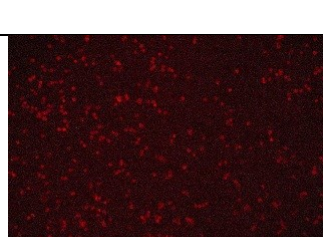
Nosaukums	Izmērs	Lādiņš	Virsmas pārklājums
<i>Fluid-Mag Amine</i>	50 nm	+	Aminosilāns
<i>Fluid-Mag Chitosan</i>	50 nm	+	Polisaharīds ir lineāri sadalīts $\beta$ -(1-4) savienojums ar D-glikozamīnu un N-acetil-D-glikozamīnu
<i>Fluid-Mag CMX</i> (Carboxymethyl-dextran)	50 nm	-	Karboksimetildekstrāns, nātrijs

## 3.2. Transdukcijas analīze, izmantojot fluorescences mikroskopiju

Magnētiskā transdukcija ir tikusi veiksmīgi izmantota, lai uzlabotu šūnu transdukciju un transgēna ekspresiju *in vitro* ar vairākiem vīrusu vektoriem, ieskaitot adenovīrusus [20, 21, 24, 25, 26, 27, 28]. Šajā darbā pirmo reizi, kombinējot rekombinanto SFV ar dažādu veidu pozitīvi lādētām MNPs, tika panākta efektīva vēža šūnu transdukcija ar SFV vektoru magnētiskā lauka ietekmē.

SFV infekcijas efektivitāte, ko stimulē MNPs, un uzlabota šūnu transdukcija FS klātbūtnē veicina MNPs/vīrusu kompleksu turpmāko izmantošanu *in vivo*. Vairāki pētījumi ir uzrādījuši panākumus magnētiski vadītā MNPs/vīrusu kompleksu piegādē *in vivo* [52, 53], un šis pētījums var kalpot kā pamats turpmākiem pētījumiem par potenciālo MNPs/SFV piegādi *in vivo*, pielietojot magnētiskā lauka spēku. Šī varētu būt daudzsolīga stratēģija, lai uzlabotu SFV vakcīnu drošību un efektivitāti preklīniskajos un klīniskajos pielietojumos.

Šūnu transdukcijas efektivitāte tika noteikta ar mikroskopijas analīzi un plūsmas citometriju. Transgēna ekspresijas līmenis tika analizēts, izmantojot imunofermentālo analīzi.

	TS/A šūnu līnija	4T1 šūnu līnija	Huh-7 šūnu līnija	B-16 šūnu līnija
1.Fluid-Mag Amine magn.d.				
2.Fluid-Mag Chitosan magn.d.				
3.Fluid-Mag CMX magn.d.				
Negatīvā kontrole				
Pozitīvā kontrole				

3.1.att. Transdukcijas efektivitātes noteikšana TS/A, 4T1, Huh-7 un B16 šūnu līnijās ar dažāda veida magnētiskām nanodaļiņām (Fluid-Mag Amine, Fluid-Mag Chitosan, Fluid-Mag CMX), izmantojot fluorescences mikroskopijas analīzi. Šūnu infekcija standarta apstākļos bez fetālā seruma klātbūtnes un magnētiskajām nanodaļiņām kalpo kā pozitīvā kontrole, bet infekcija fetālā seruma klātbūtnē un bez nanodaļiņām - kā negatīvā kontrole. Sarkana krāsojums norāda uz DS-Red proteīna (sarkana fluorescences proteīns) ekspresiju šūnās, kuras tika inficētas ar SFV1/DS-Red vektoru.

*Figure 3.1. Determination of transduction efficiency in TS/A, 4T1, Huh-7 and B16 cell lines with different types of magnetic nanoparticles (Fluid-Mag Amine, Fluid-Mag Chitosan, Fluid-Mag CMX) using fluorescence microscopy analysis.* Cell infection under standard conditions without the presence of fetal serum and magnetic nanoparticles serves as a positive control, but cell infection in the presence of fetal serum but without nanoparticles - as a negative control. The red staining indicates the expression of DS-Red protein (red fluorescence protein) in the cells infected with SFV1/DS-Red vector.

Lai noteiktu, kuras šūnas vislabāk ekspresē SFV/Red vīrusu un kura veida MNPs ir efektīvākas, tika veikta TS/A, 4T1, Huh-7 un B16 šūnu kultūru infekcija, izmantojot Fluid-Mag Amin, Fluid-Mag Chitosan un Fluid-Mag CMX magnētiskas nanodaļiņas. Kā negatīvā kontrole tika izmantotas šūnas, kas kultivētas tādos pašos apstākļos, bet bez MNPs un ar vai bez vīrusa pievienošanas. Kā pozitīvā kontrole tika izmantotas šūnas, kas audzētas barotnē bez seruma, aizstājot standarta barotni ar PBS++, un bez MNPs pievienošanas.

Fluorescences mikroskopija labi parādīja, ka šūnu transdukcija ir veiksmīga, izmantojot pozitīvi ladētās Fluid-Mag Amin un Fluid-Mag Chitosan MNPs, un vislabāk tā izpaužas TS/A un Huh-7 šūnu kultūrās.

4T1 un B16 šūnu līnijas uzrādīja ļoti vāju fluorescenci. Pārsteidzoši bija tas, ka 4T1 šūnu līnijā bija novērojama ļoti vāji izteikta fluorescence, jo literatūras dati liecina, ka šīm šūnām ir raksturīga augsta SFV inficēšanas spēja [42]. Taču pētījumi liecina, ka rekSFV vīrusam ir 4T1 audzēju tropisms, jo pelēm ar 4T1 audzējiem tika pierādīta zema vīrusa orgānu inficēšanas efektivitāte, salīdzinot ar augstu transgēna ekspresiju audzējos.

Negatīvi ladētās Fluid-Mag CMX MNPs neuzlaboja transdukciju nevienai šūnu kultūrai, un rezultāti ir ļoti līdzīgi negatīvajai kontrolei.

Tā kā mikroskopijas rezultāti mēdz būt neprecīzi, tad nedrīkst balstīties tikai uz tiem. Tāpēc tika veikta arī plūsmas citometrijas analīze, lai iegūtu skaitliskus datus.

### 3.3. Šūnu transdukcijas efektivitātes noteikšana ar plūsmas citometriju

Inficētās šūnas tika savāktas 24 h pēc transdukcijas, un Ds-Red proteīna fluorescences tika noteikta, izmantojot FACS Aria II plūsmas citometru.

Neinficētās šūnas bez MNPs tika izmantotas kā negatīvā kontrole. Kā pozitīvā kontrole tika izmantotas inficētās šūnas, bet bez MNPs, kas kultivētas standarta apstākļos bez FS. Tika pielietota arī parasta kontrole ar šūnām, kurām nekā netika pievienots.

FACS rezultāti ir parādīti 3.2, 3.3, 3.4 un 3.5 tabulās, kas atbilst katrai pētāmajai šūnu līnijai.

3.2.tabula.

#### FACS rezultāti TS/A šūnu līnijai

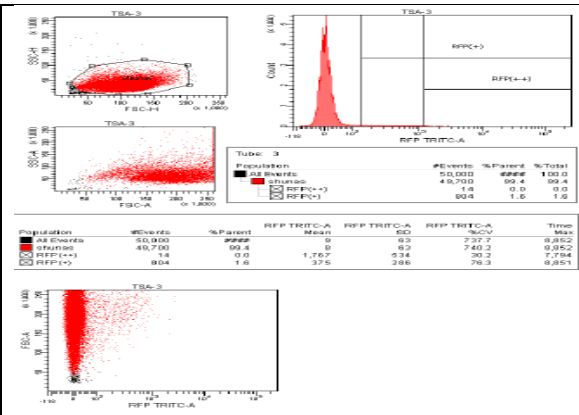
Table 3.2.

#### FACS results for TS/A cell line

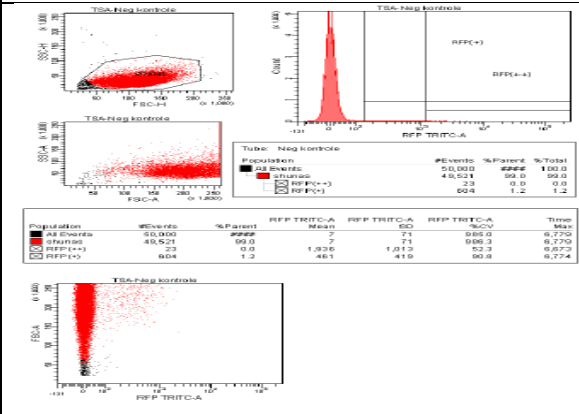
Apraksts	FACS bildes																																			
<p>1. Fluid-Mag Amine magn.d. TS/A šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag Amine un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	<table border="1" data-bbox="861 1220 1420 1276"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>Mean</th> <th>SD</th> <th>%CV</th> <th>Time</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>45,000</td> <td>100.0</td> <td>1.32</td> <td>38.1</td> <td>0.29</td> <td>0.200</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>40,024</td> <td>87.7</td> <td>3.7</td> <td>134</td> <td>35.7</td> <td>0.200</td> </tr> <tr> <td>RFP(-)</td> <td>5,1</td> <td>0.1</td> <td>1.988</td> <td>1.938</td> <td>97.0</td> <td>0.108</td> </tr> <tr> <td>RFP(+/-)</td> <td>4,455</td> <td>9.9</td> <td>3.58</td> <td>90</td> <td>25.0</td> <td>0.108</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	Mean	SD	%CV	Time	All Events	45,000	100.0	1.32	38.1	0.29	0.200	RFP(+)	40,024	87.7	3.7	134	35.7	0.200	RFP(-)	5,1	0.1	1.988	1.938	97.0	0.108	RFP(+/-)	4,455	9.9	3.58	90	25.0	0.108
Population	#Events	%Parent	Mean	SD	%CV	Time																														
All Events	45,000	100.0	1.32	38.1	0.29	0.200																														
RFP(+)	40,024	87.7	3.7	134	35.7	0.200																														
RFP(-)	5,1	0.1	1.988	1.938	97.0	0.108																														
RFP(+/-)	4,455	9.9	3.58	90	25.0	0.108																														
<p>2. Fluid-Mag Chitosan magn.d. TS/A šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag Chitosan un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	<table border="1" data-bbox="861 1579 1420 1635"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>Mean</th> <th>SD</th> <th>%CV</th> <th>Time</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>50,000</td> <td>100.0</td> <td>7.0</td> <td>174</td> <td>2.20</td> <td>0.056</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>49,132</td> <td>98.3</td> <td>7.0</td> <td>170</td> <td>2.18</td> <td>0.056</td> </tr> <tr> <td>RFP(-)</td> <td>78</td> <td>0.2</td> <td>2.257</td> <td>2.213</td> <td>98.0</td> <td>0.056</td> </tr> <tr> <td>RFP(+/-)</td> <td>6,991</td> <td>14.2</td> <td>3.19</td> <td>366</td> <td>11.6</td> <td>0.056</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	Mean	SD	%CV	Time	All Events	50,000	100.0	7.0	174	2.20	0.056	RFP(+)	49,132	98.3	7.0	170	2.18	0.056	RFP(-)	78	0.2	2.257	2.213	98.0	0.056	RFP(+/-)	6,991	14.2	3.19	366	11.6	0.056
Population	#Events	%Parent	Mean	SD	%CV	Time																														
All Events	50,000	100.0	7.0	174	2.20	0.056																														
RFP(+)	49,132	98.3	7.0	170	2.18	0.056																														
RFP(-)	78	0.2	2.257	2.213	98.0	0.056																														
RFP(+/-)	6,991	14.2	3.19	366	11.6	0.056																														

3. Fluid-Mag CMX magn.d. TS/A šūnās.

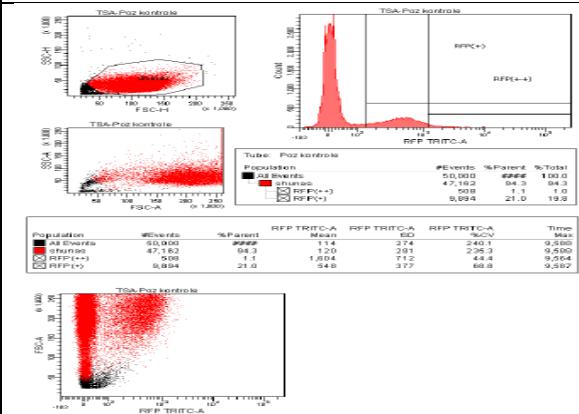
Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag CMX un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā sseruma klātbūtnē.



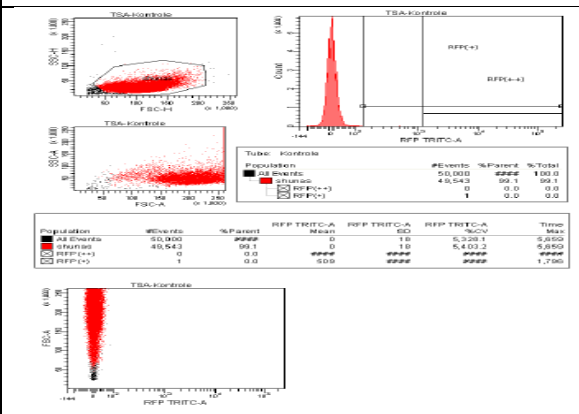
4. Negatīvā kontrole TS/A šūnās. Šūnas tika inficētas ar pSFV1/DS-Red vīrusu fetālā seruma klātbūtnē, bet magnētiskās daļiņas netika pievienotas.



5. Pozitīvā kontrole TS/A šūnās. Šūnas tika inficētas ar pSFV1/DS-Red vīrusu PBS++ standarta apstākļos bez fetālā seruma, un magnētiskās daļiņas netika pievienotas.



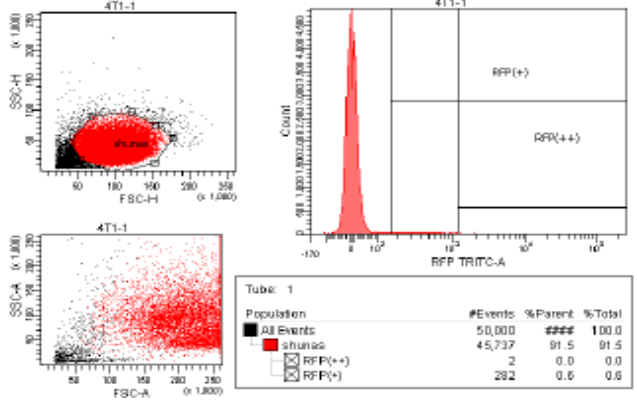
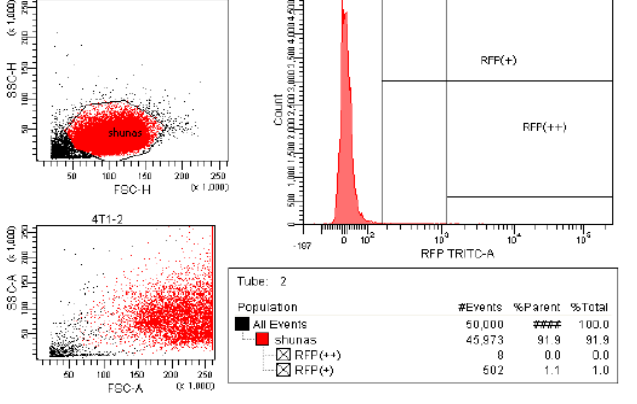
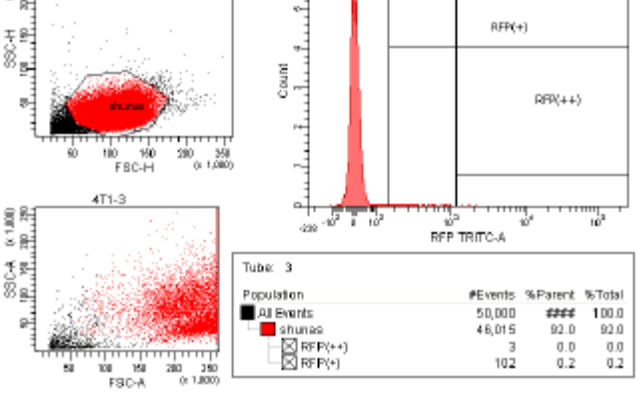
6. TS/A šūnu kontrole. Šūnas bez vīrusa un magnētisko daļiņu pievienošanas.



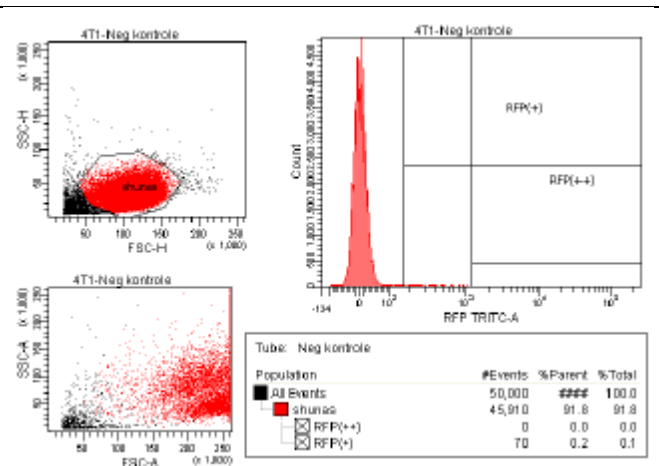
## FACS rezultāti 4T1 šūnu līnijai

Table 3.3.

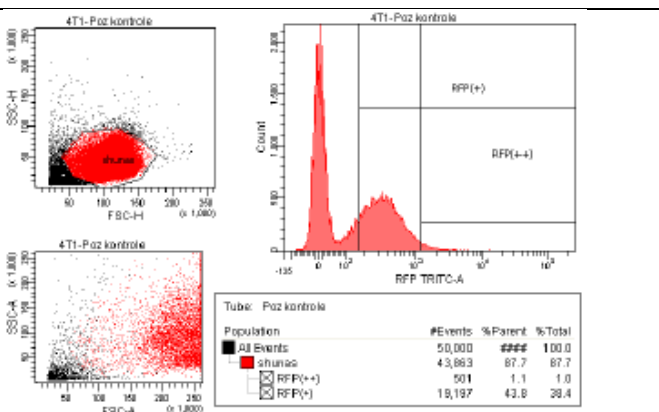
## FACS results for TS/A cell line

Apraksts	FACS bildes																				
<p>1. Fluid-Mag Amine magn.d. 4T1 šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag Amine un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	<p>FACSDiva Version 6.1.3</p>  <table border="1" data-bbox="1045 795 1444 907"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>50,000</td> <td>###</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>shunas</td> <td>45,737</td> <td>91.5</td> <td>91.5</td> </tr> <tr> <td>RFP(++)</td> <td>2</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>282</td> <td>0.6</td> <td>0.6</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	50,000	###	100.0	shunas	45,737	91.5	91.5	RFP(++)	2	0.0	0.0	RFP(+)	282	0.6	0.6
Population	#Events	%Parent	%Total																		
All Events	50,000	###	100.0																		
shunas	45,737	91.5	91.5																		
RFP(++)	2	0.0	0.0																		
RFP(+)	282	0.6	0.6																		
<p>2. Fluid-Mag Chitosan magn.d. 4T1 šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag Chitosan un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	<p>FACSDiva Version 6.1.3</p>  <table border="1" data-bbox="1045 1265 1444 1377"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>50,000</td> <td>###</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>shunas</td> <td>45,973</td> <td>91.9</td> <td>91.9</td> </tr> <tr> <td>RFP(++)</td> <td>0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>502</td> <td>1.1</td> <td>1.0</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	50,000	###	100.0	shunas	45,973	91.9	91.9	RFP(++)	0	0.0	0.0	RFP(+)	502	1.1	1.0
Population	#Events	%Parent	%Total																		
All Events	50,000	###	100.0																		
shunas	45,973	91.9	91.9																		
RFP(++)	0	0.0	0.0																		
RFP(+)	502	1.1	1.0																		
<p>3. Fluid-Mag CMX magn.d. 4T1 šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag CMX un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	<p>FACSDiva Version 6.1.3</p>  <table border="1" data-bbox="1045 1713 1444 1825"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>50,000</td> <td>###</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>shunas</td> <td>46,015</td> <td>92.0</td> <td>92.0</td> </tr> <tr> <td>RFP(++)</td> <td>3</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>102</td> <td>0.2</td> <td>0.2</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	50,000	###	100.0	shunas	46,015	92.0	92.0	RFP(++)	3	0.0	0.0	RFP(+)	102	0.2	0.2
Population	#Events	%Parent	%Total																		
All Events	50,000	###	100.0																		
shunas	46,015	92.0	92.0																		
RFP(++)	3	0.0	0.0																		
RFP(+)	102	0.2	0.2																		

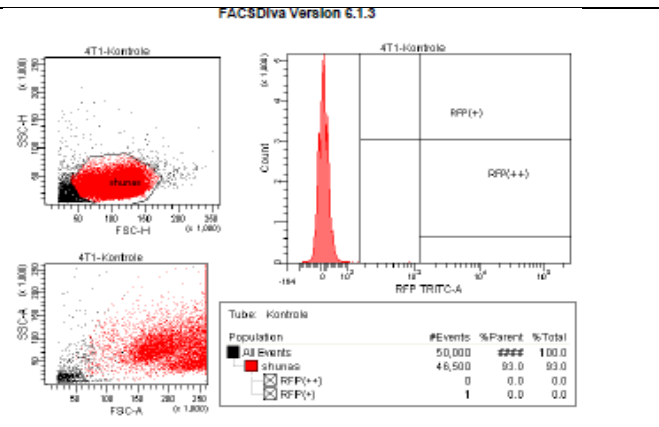
4. Negatīvā kontrole 4T1 šūnās. Šūnas tika inficētas pSFV1/DS-Red vīrusu fetālā seruma klātbūtnē, bet magnētiskās daļiņas netika pievienotas.



5. Pozitīvā kontrole 4T1 šūnās. Šūnas tika inficētas ar pSFV1/DS-Red vīrusu PBS++ standarta apstākļos bez fetālā seruma, un magnētiskās daļiņas netika pievienotas.



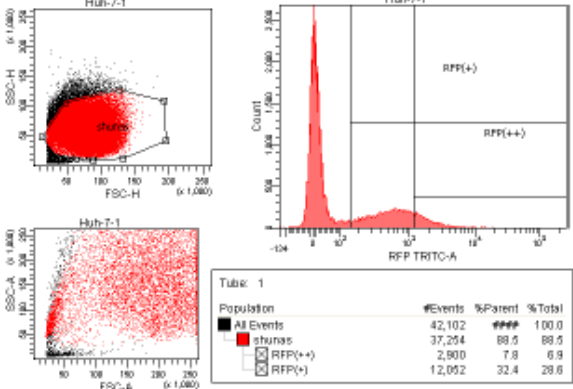
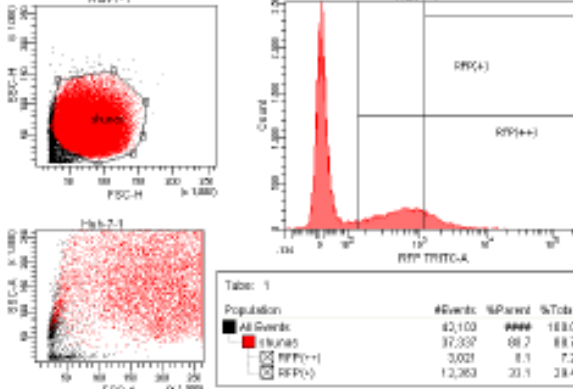
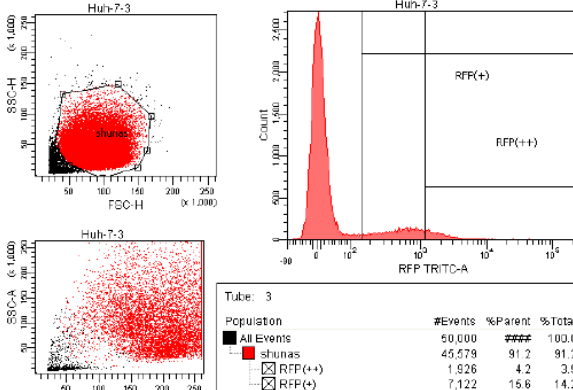
6. 4T1 šūnu kontrole. Šūnas bez vīrusa un magnētisko daļiņu pievienošanas.



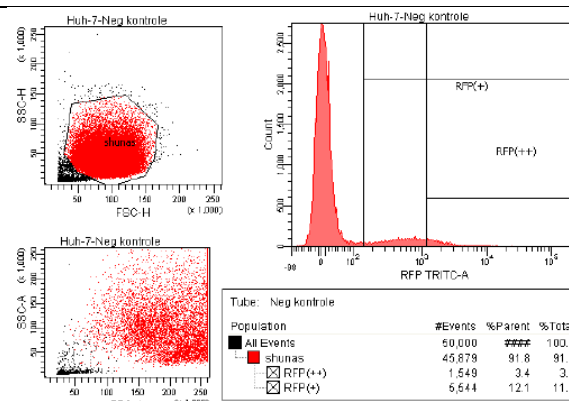
## FACS rezultāti Huh-7 šūnu līnijai

Table 3.4.

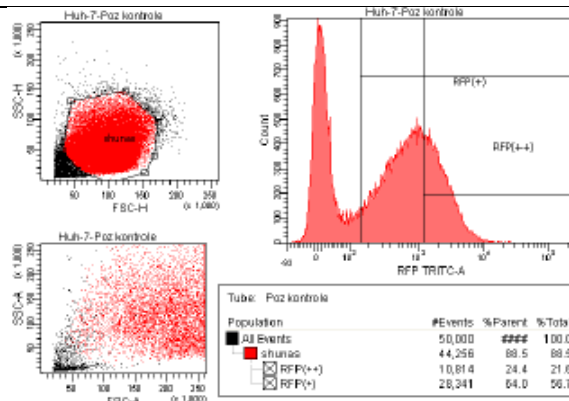
## FACS results for Huh-7 cell line

Apraksts	FACS bildes																				
<p>1. Fluid-Mag Amine magn.d. Huh-7 šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag Amine un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	 <table border="1" data-bbox="979 741 1342 860"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>42,102</td> <td>###</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>shunas</td> <td>37,254</td> <td>88.5</td> <td>88.5</td> </tr> <tr> <td>RFP(++)</td> <td>2,900</td> <td>7.8</td> <td>6.9</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>12,052</td> <td>32.4</td> <td>28.6</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	42,102	###	100.0	shunas	37,254	88.5	88.5	RFP(++)	2,900	7.8	6.9	RFP(+)	12,052	32.4	28.6
Population	#Events	%Parent	%Total																		
All Events	42,102	###	100.0																		
shunas	37,254	88.5	88.5																		
RFP(++)	2,900	7.8	6.9																		
RFP(+)	12,052	32.4	28.6																		
<p>2. Fluid-Mag Chitosan magn.d. Huh-7 šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag Chitosan un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	 <table border="1" data-bbox="979 1167 1342 1285"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>42,103</td> <td>###</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>shunas</td> <td>37,337</td> <td>88.7</td> <td>88.7</td> </tr> <tr> <td>RFP(++)</td> <td>3,021</td> <td>8.1</td> <td>7.2</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>12,263</td> <td>29.1</td> <td>29.4</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	42,103	###	100.0	shunas	37,337	88.7	88.7	RFP(++)	3,021	8.1	7.2	RFP(+)	12,263	29.1	29.4
Population	#Events	%Parent	%Total																		
All Events	42,103	###	100.0																		
shunas	37,337	88.7	88.7																		
RFP(++)	3,021	8.1	7.2																		
RFP(+)	12,263	29.1	29.4																		
<p>3. Fluid-Mag CMX magn.d. Huh-7 šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag CMX un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	 <table border="1" data-bbox="979 1592 1342 1711"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>50,000</td> <td>###</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>shunas</td> <td>45,579</td> <td>91.2</td> <td>91.2</td> </tr> <tr> <td>RFP(++)</td> <td>1,926</td> <td>4.2</td> <td>3.9</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>7,122</td> <td>15.6</td> <td>14.2</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	50,000	###	100.0	shunas	45,579	91.2	91.2	RFP(++)	1,926	4.2	3.9	RFP(+)	7,122	15.6	14.2
Population	#Events	%Parent	%Total																		
All Events	50,000	###	100.0																		
shunas	45,579	91.2	91.2																		
RFP(++)	1,926	4.2	3.9																		
RFP(+)	7,122	15.6	14.2																		

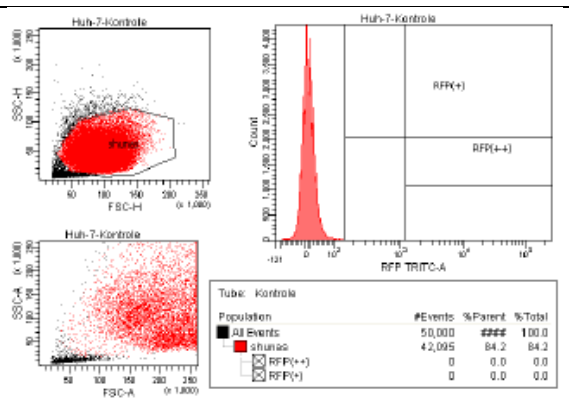
4. Negatīvā kontrole Huh-7 šūnās. Šūnas tika inficētas pSFV1/DS-Red vīrusu fetālā seruma klātbūtnē, bet magnētiskās daļiņas netika pievienotas.



5. Pozitīvā kontrole Huh-7 šūnās. Šūnas tika inficētas ar pSFV1/DS-Red vīrusu PBS++ standarta apstākļos bez fetālā seruma, un magnētiskās daļiņas netika pievienotas.



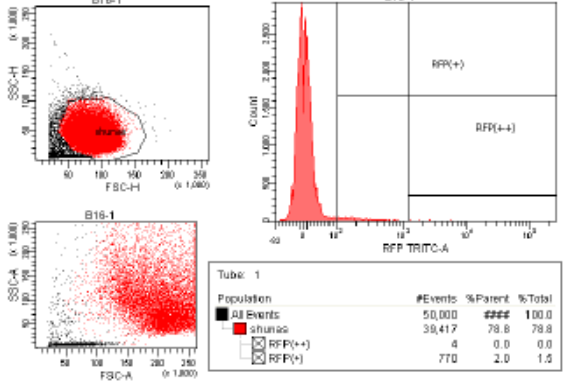
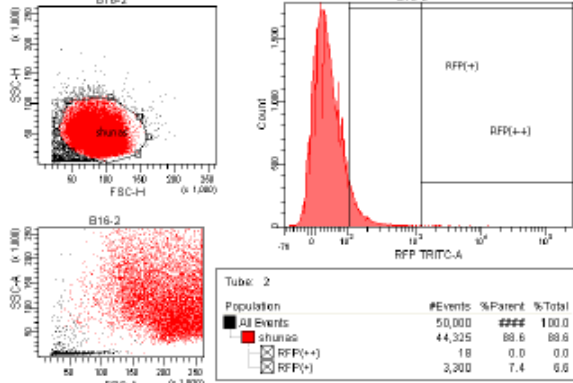
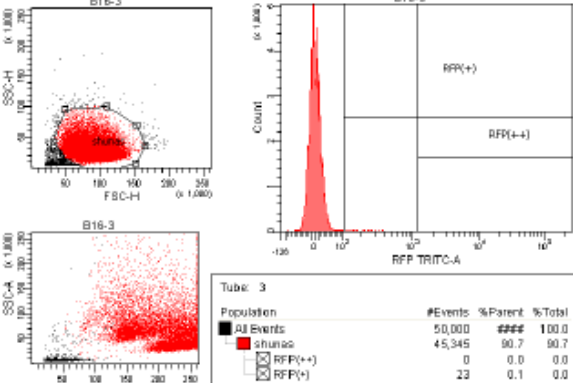
6. Huh-7 šūnu kontrole. Šūnas bez vīrusa un magnētisko daļiņu pievienošanas.



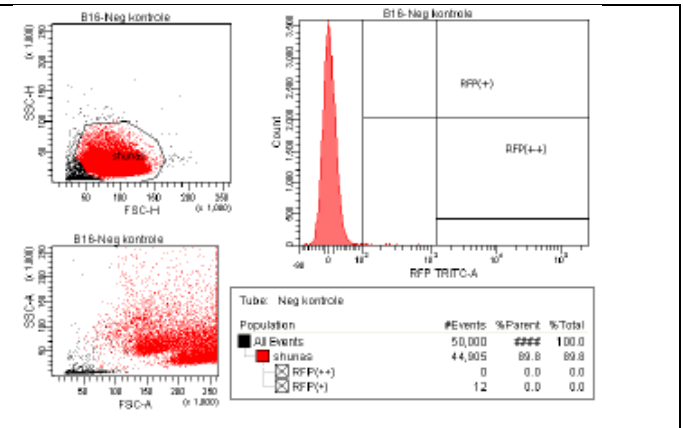
## FACS rezultāti B16 šūnu līnijai

Table 3.5.

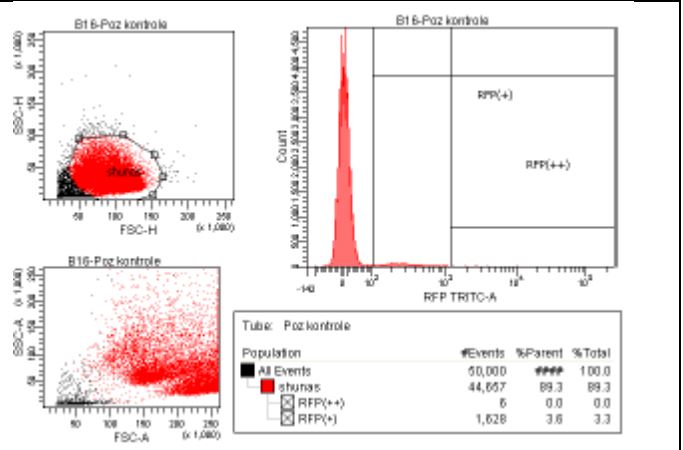
## FACS results for B16 cell line

Apraksts	FACS bildes																				
<p>1. Fluid-Mag Amine magn.d. B16 šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag Amine un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	 <table border="1" data-bbox="1023 741 1374 842"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>50,000</td> <td>###</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>shūnas</td> <td>39,417</td> <td>78.8</td> <td>78.8</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>4</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>770</td> <td>2.0</td> <td>1.5</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	50,000	###	100.0	shūnas	39,417	78.8	78.8	RFP(+)	4	0.0	0.0	RFP(+)	770	2.0	1.5
Population	#Events	%Parent	%Total																		
All Events	50,000	###	100.0																		
shūnas	39,417	78.8	78.8																		
RFP(+)	4	0.0	0.0																		
RFP(+)	770	2.0	1.5																		
<p>2. Fluid-Mag Chitosan magn.d. B16 šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag Chitosan un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	 <table border="1" data-bbox="1023 1149 1374 1249"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>50,000</td> <td>###</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>shūnas</td> <td>44,325</td> <td>88.6</td> <td>88.6</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>18</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>3,300</td> <td>7.4</td> <td>6.6</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	50,000	###	100.0	shūnas	44,325	88.6	88.6	RFP(+)	18	0.0	0.0	RFP(+)	3,300	7.4	6.6
Population	#Events	%Parent	%Total																		
All Events	50,000	###	100.0																		
shūnas	44,325	88.6	88.6																		
RFP(+)	18	0.0	0.0																		
RFP(+)	3,300	7.4	6.6																		
<p>3. Fluid-Mag CMX magn.d. B16 šūnās. Šūnas tika inficētas ar Fluid-Mag CMX un pSFV1/DS-Red vīrusu kompleksiem fetālā seruma klātbūtnē.</p>	 <table border="1" data-bbox="1023 1601 1374 1697"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>50,000</td> <td>###</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>shūnas</td> <td>45,345</td> <td>90.7</td> <td>90.7</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>RFP(+)</td> <td>23</td> <td>0.1</td> <td>0.0</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	50,000	###	100.0	shūnas	45,345	90.7	90.7	RFP(+)	0	0.0	0.0	RFP(+)	23	0.1	0.0
Population	#Events	%Parent	%Total																		
All Events	50,000	###	100.0																		
shūnas	45,345	90.7	90.7																		
RFP(+)	0	0.0	0.0																		
RFP(+)	23	0.1	0.0																		

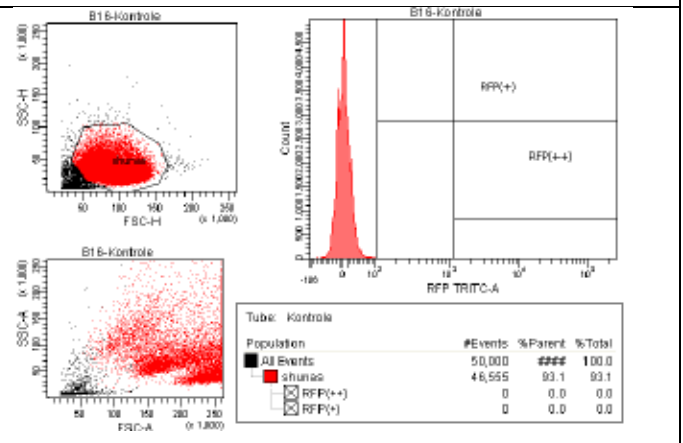
4. Negatīvā kontrole B16 šūnās. Šūnas tika inficētas pSFV1/DS-Red vīrusu fetālā seruma klātbūtnē, bet magnētiskās daļiņas netika pievienotas.



5. Pozitīvā kontrole B16 šūnās. Šūnas tika inficētas ar pSFV1/DS-Red vīrusu PBS++ standarta apstākļos bez fetālā seruma, un magnētiskās daļiņas netika pievienotas.



6. B16 šūnu kontrole. Šūnas bez vīrusa un magnētisko daļiņu pievienošanas.



Plūsmas citometrijas dati ir apkopoti 3.6.tabulā.

## MNPs/vīrusa kompleksu veidošana un šūnu transdukcijas FACS analīze

Table 3.6.

## Generation of MNPs/virus complexes and FACS analysis of cell transduction

Parauga nosaukums	RFP (+) pozitīvo šūnu skaits 24 h pēc transdukcijas, (%)			
	TS/A	4T1	Huh-7	B16
Kontrole	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Negatīvā kontrole</b> (ar vīrusu fetālā seruma klātbūtnē, bez magnētiskām daļiņām)	1,2	0,2	12,1	0,0
<b>Pozitīvā kontrole</b> (ar vīrusu, bez fetālā seruma un magnētiskām daļiņām)	21,0	43,8	64,0	3,6
<b>1. Fluid-Mag Amine</b> (ar vīrusu fetālā seruma klātbūtnē, ar magnētiskām daļiņām)	9,0	0,6	32,4	2,6
<b>2. Fluid-Mag Chitosan</b> (ar vīrusu fetālā seruma klātbūtnē, ar magnētiskām daļiņām)	14,2	1,1	33,1	7,4
<b>3. Fluid-Mag CMX</b> (ar vīrusu fetālā seruma klātbūtnē, ar magnētiskām daļiņām)	1,6	0,2	15,6	0,1

Pārbaudot trīs dažādu veidu MNPs ietekmi uz vairākām šūnu līnijām, tika atklāts, ka Fluid-Mag Amine un Fluid-Mag Chitosan pastiprina SFV vīrusa iedarbību TS/A un Huh-7 šūnās, salīdzinot ar Fluid-Mag CMX, kas nerādīja būtisku ietekmi un tikai minimāli atšķīrās no

negatīvās kontroles (3.6. tabula). Plūsmas citometrijas rezultāti sakrīt ar fluorescences mikroskopijas datiem 3.1. attēlā.

Pēc literatūras datiem Fluid-Mag Amine un Fluid-Mag Chitosan paaugstina infekciju, bet Fluid-Mag CMX neuzlabo vīrusa efektivitāti. Negatīvajai kontrolei nevajadzētu pārsniegt 3%, bet mūsu gadījumā Huh-7 negatīvā kontrole uzrādīja 12,1% RFP+. Taču arī Fluid-Mag CMX nanodaļiņas paaugstināja rezultātu, kas ir vienāds ar 15,6% un ir tuvu negatīvajai kontrolei.

FACS dati parāda, ka pozitīvā kontrole Huh-7 šūnu līnijā ir 64%, Amine - 32,4% un Chitosan - 33,1%, kas ir divreiz vairāk, nekā negatīvā kontrole un Fluid-Mag CMX. Iegūtie rezultāti ļauj izvirzīt teoriju, ka Chitosan un Amine MNPs uzlabo šūnu transdukcijas efektivitāti. Bet, lai pierādītu šo hipotēzi, eksperiments tika veikts atkārtoti.

4T1 šūnās bija novērojams ļoti minimāls transdukcijas efektivitātes pieaugums, izmantojot Amine (0,6%) un Chitosan (1,1%) MNPs.

TS/A un B16 šūnu līnijas uzrādīja līdzīgus rezultātus, jo abos gadījumos Chitosan MNPs demonstrēja vislabāko efektivitāti, bet Amine MNPs parādīja minimālu transdukcijas uzlabojumu. Fluid-Mag CMX MNPs neuzrādīja nekādu efektu, un to rezultāti sakrita ar negatīvo kontroli.

### **Transdukcijas efektivitātes paaugstināšanas eksperimenta atkārtojums.**

Atkārtojot eksperimentu, tika izmantotas visas četras augstāk minētās šūnu kultūras un divi MNPs veidi, kas uzrādīja lielāko efektivitāti iepriekšējās pārbaudēs. Lai labāk izsekotu šūnu infekcijai un vīrusa infekcijas pastiprināšanai, tika veikta arī standarta šūnu infekcija ar vīrusu. Viss eksperiments tika veikts divkārtšā atkārtojumā, lai iegūtu precīzākus rezultātus un nepieļautu kļūdas.

Papildus tika pielietotas divu veidu negatīvās kontroles - ar un bez MNPs, lai novērotu nanodaļiņu ietekmi uz citometrijas rezultātiem.

Viena veida negatīvajai kontrolei tika izmantotas šūnas, kam netika pievienots vīrus, bet tikai attiecīgās MNPs, un otra veida negatīvajai kontrolei netika pievienots nekas – ne vīrus, ne MNPs. Šīs abas negatīvās kontroles tika iekļautas tādēļ, ka iepriekšējā eksperimenta gaitā tika atklāts, ka viena tipa MNPs, iespējams, izraisa autofluorescenci. Tā kā MNPs autofluorescence traucē plūsmas citometrijas analīzei, magnētiskās daļiņas tika pārbaudītas atsevišķi, krāsojot šūnas tikai ar daļiņām, bez vīrusa RFP ekspresijas. Iegūti rezultāti ir parādīti 3.7. tabulā.

## MNPs/vīrusa kompleksu veidošana un atkārtota šūnu transdukcijas FACS analīze

Table 3.7.

## Generation of MNPs/virus complexes and repeated FACS analysis of transduced cells

Parauga nosaukums	RFP (+) pozitīvo šūnu skaits 24 h pēc transdukcijas, (%)			
	TS/A	4T1	Huh-7	B16
Magnētisko daļiņu kontrole	14,4 (amine)/ 12,2 (chitosan)	6,6 (amine)/ 9,2 (chitosan)	30,2 (amine)/ 29,0 (chitosan)	0,0 amine/ 0,7 (chitosan)
Negatīvā kontrole (vīruss fetālā seruma klātbūtnē, bez magnētiskām daļiņām)	1,1/2,1	3,9/4,9	11,1	0,0
1. Fluid-Mag Amine (vīruss fetālā seruma klātbūtnē, ar magnētiskām daļiņām)	23,5/25,6	20,9/18,5	46,4	1,2
2. Fluid-Mag Chitosan (vīruss fetālā seruma klātbūtnē, ar magnētiskām daļiņām)	40,3/38,3	22,3/23,4	45,4	1,5
Pozitīvā kontrole (tikai vīruss, bez magnētiskām daļiņām un fetālā seruma)	16,2	4,6	67,0	0,7

Atkārtojot eksperimentu, iegūtie rezultāti atšķirās no iepriekšējās pārbaudes. Iespējams, ka iepriekšējā reizē Huh-7 šūnu līnijai MNPs bija nestabilas un tāpēc augsta fluorescences tika novērota arī negatīvās kontroles un Fluid-Mag CXM MNPs paraugiem. Šajā reizē tika izmantotas jaunas piegādes partijas MNPs.

Jauniegūtie plūsmas citometrijas dati demonstrēja, ka Huh-7 šūnās Chitosan un Amine MNPs pielietojums rada lielu autofluorescenci: 30,2% (amine) un 29,0% (chitosan). Pievienojot Huh-7 šūnām MNPs/vīrusa kompleksu, fluorescence pastiprinās (46,4% Fluid-Mag Amine un 45,4% Fluid-Mag Chitosan), kas norāda uz RFP proteīna ekspresiju. Rezultāti apstiprināja, ka Fluid-Mag Chitosan un Fluid-Mag Amine MNPs pastiprina vīrusa infekciju.

B-16 šūnas uzrādīja zemas rezultātus, bet ir jāņem vērā fakts, ka FACS analīzei tika izmantots neliels skaits šūnu, jo vīrusa ietekme izrādījās ļoti toksiska B-16 šūnām. Pārējām šūnu kultūrām šāda reakcija netika novērota, lai gan tika izmantoti identiski augšanas un infekcijas apstākļi. Tas parādīja, ka SFV vīruss izraisa pārāk lielu toksisku efektu B-16 šūnās un pakļauj tās apoptozei [39].

Šūnu apoptoze notiek 1-2 dienu laikā, tāpēc jāņem vērā tas, ka šūnās noris citopātiskais efekts pēc šūnu kultūras inficēšanas ar vīrusu. Arī 4T1 šūnas bija pakļautas apoptozei, par ko liecināja strauja šūnu daudzuma samazināšanās. Literatūras dati rāda, ka rekombinantam alfavīrusam mēdz būt citopātiskais efekts. Šūnas apoptozi inducē kaspāzes proteīnu aktivācija SFV replikācijas procesā [39]. Interesanti, ka šajā eksperimentā 4T1 šūnas relatīvi labi inficējās ar SFV/DS-Red vīrusu, kas varētu būt saistīts ar iepriekšējo MNPs nestabilitāti, jo no jauna iegādātās MNPs uzrādīja pozitīvus rezultātus.

Visām izvēlētajām šūnu kultūrām ir atšķirīgas gan augšanas, gan bioķīmiskās īpašības. Piemēram, savu lomu nospēlēja tas, ka tām ir atšķirīgas membrānas, kas pastiprināja TS/A un Huh-7 šūnu autofluorescenci, ko izraisīja Chitosan MNPs, kas veido efektīvu suspensiju un spēj iekļauties šūnu membrānā, iekrāsojot šūnas.

Tomēr tās pašas Fluid-Mag Chitosan un Fluid-Mag Amine MNPs nerada tik lielu autofluorescenci 4T1 un B16 šūnās. 4T1 šūnas kopā ar MNPs neveido tik efektīvu suspensiju, jo šīs šūnas grūtāk saistās ar nanodaļiņām, salīdzinot, piemēram, ar TS/A šūnām.

Visās vēža šūnu līnijās tika novērota pastiprināta gēna ekspresija un šūnu transdukcija, bet visefektīvākā tika novērota TS/A un Huh-7 šūnu līnijās. Iegūtie rezultāti pierādīja, ka *in vitro* eksperimentos SFV TNF-alfa vīrusi kopā ar MNPs var efektīvi ietekmēt transdukcijas pastiprināšanos un piegādāt rekSFV gēnu. Tāpat visas darbā pētītās šūnu kultūras var pielietot vīrusa gēnu piegādei audzēju modeļos.

### **3.4. Citokīna TNF-alfa ekspresijas un sekrēcijas paaugstināšana, inficējot vēža šūnas ar SFV/TNFalfa vīrusu un magnētisko nanodaļiņu kompleksiem**

TNF-alfa ir potenciāls terapeitisks citokīns. Lai paaugstinātu vēža šūnu transdukciju ar TNF-alfa kodējošo SFV vīrusu, tika pielietotas MNPs, kas uzrādīja efektīvu transdukciju iepriekšējos eksperimentos. Tika izvēlētas peļu TS/A un cilvēka Huh-7 šūnas infekcijai ar atbilstošu SFV1/mTNFalfa (peļu TNF-alfa) un SFV1/hTNFalfa (cilvēka TNF-alfa). Vīrusi tika pielietoti komplektā ar Fluid-Mag Amine un Fluid-Mag Chitosan MNPs. SFV1/GFP vai SFV1/DS-Red vīrusi tika izmantoti kā negatīvā kontrole.

Enzīmu imunosorbcijas tests ELISA ir plaši pielietojama metode, kas ļauj kvantitatīvi vai kvalitatīvi noteiktu antigēnu un antivielu klātbūtni klīniskajos un eksperimentālajos paraugos, pamatojoties uz specifisku antigēna-antivielas reakciju. Iegūto kompleksu identificē, izmantojot kolorimetrisku reakciju. ELISA teorētiskais pamats balstās uz mūsdienu imūnķīmiju un ķīmiskajiem enzīmiem, zināšanām par antigēnu-antivielu reakciju fizikāli ķīmiskajiem likumiem, kā arī analītiskās ķīmijas pamatprincipiem.

Šajā darbā tika izmantots gatavs komerciālais peles un cilvēka TNF-alfa ELISA komplekts saskaņā ar ražotāja instrukciju.

No sākuma tika iegūta kalibrācijas līkne, izmantojot attiecīgos TNF-alfa standarta atšķaidījumus. Eksperiments tika veikts gan uz peļu TS/A šūnām, gan uz cilvēka Huh-7 šūnām. Iegūtie rezultāti ir atspoguļoti 3.8. un 3.9. tabulās.

**Peļu TNF-alfa (mTNFalfa) koncentrācija pēc šūnu infekcijas ar MNPs un SFV/mTNFalfa vīrusu kompleksiem**

Table 3.8.

**Concentration of mouse TNF-alpha (mTNFalfa) after cell infection with MNPs and SFV/mTNFalfa complexes**

<b>Peles TNF-alfa ar magnētiskām nanodaļiņām (TS/A šūnas)</b>	<b>mTNF-alfa (pg/mL) šūnu barotnē 24 h pēc infekcijas</b>
mTNFalfa vīruss ar Fluid-Mag Amine 1:100	147,25
mTNFalfa vīruss ar Fluid-Mag Chitosan 1:100	138,25
mTNFalfa vīruss bez MNPs 1:100	39,50
Negatīvā kontrole (šūnas inficētas ar pSFV/GFP)	0,00

ELISA testā veiktajos mērījumos tika pielietots vīruss ar atšķaidījumu 1:100, un visaugstākā mTNFalfa koncentrācija tika novērota peļu TS/A šūnās, izmantojot Amine MNPs (147,25 pg/mL). Chitosan MNPs uzrādīja nedaudz zemāku, taču tāpat ievērojamu, rezultātu (138,25 pg/mL). Kā negatīvā kontrole tika izmantotas neinficētas šūnas.

Tika iegūta kalibrācijas līkne ar vienādojumu:  $y = 0,0007x + 0,1911$ . Balstoties uz to, tika izrēķināta alfavīrusa koncentrācija.

**Cilvēka TNF-alfa (hTNFalfa) koncentrācija pēc šūnu infekcijas ar MNPs un SFV/hTNFalfa vīrusu kompleksiem**

Table 3.9.

**Concentration of human TNF-alpha (hTNFalfa) after cell infection with MNPs and SFV/hTNFalfa complexes**

<b>Cilvēka TNF-alfa ar magnētiskām nanodaļiņām (Huh-7 šūnas)</b>	<b>Cilvēka TNF-alfa (pg/mL)</b>
hTNFalfa vīruss ar Fluid-Mag Amine 1:50	812,83
hTNFalfa vīruss ar Fluid-Mag Chitosan 1:50	786,26
hTNFalfa vīruss bez MNPs 1:50	225,40
Negatīvā kontrole (šūnas inficētas ar pSFV/GFP)	0,00

Huh-7 šūnās cilvēka TNF-alfa vīrusa koncentrācijas noteikšanai tika izmantots vīruss ar atšķaidījumu 1:50.

Gan peļu šūnu līnijā (TS/A), gan cilvēka šūnu līnijā (Huh-7) tika detektēta vienāda sakarība - Mag-Fluid Amine MNPs visefektīvāk uzlabo vīrusa infekciju TS/A (147,25 pg/mL) un Huh-7 (812,83 pg/mL) šūnās un atbilstošā citokīna TNF-alfa sekrēciju. Fluid-Mag Chitosan MNPs arī uzlabo infekcijas efektivitāti, bet nedaudz vājākā līmenī: TS/A - 138,25 pg/mL un Huh-7 - 786,26 pg/mL. Kopumā TNF-alfa sekrēcija paaugstinājās, inficējot šūnas ar SFV/TNF un MNPs kompleksiem, salīdzinot ar vienkāršu SFV/TNF infekciju bez MNPs: peļu šūnās - 39,50 pg/mL un cilvēka šūnās - 225,40 pg/mL.

Iegūtie rezultāti parādīja, ka gan Fluid-Mag Amine, gan Fluid-Mag Chitosan MNPs var būt vienlīdz labi izmantojamas vīrusa infekcijas efektivitātes uzlabošanai un terapeitisko citokīnu sekrēcijas paaugstināšanai.

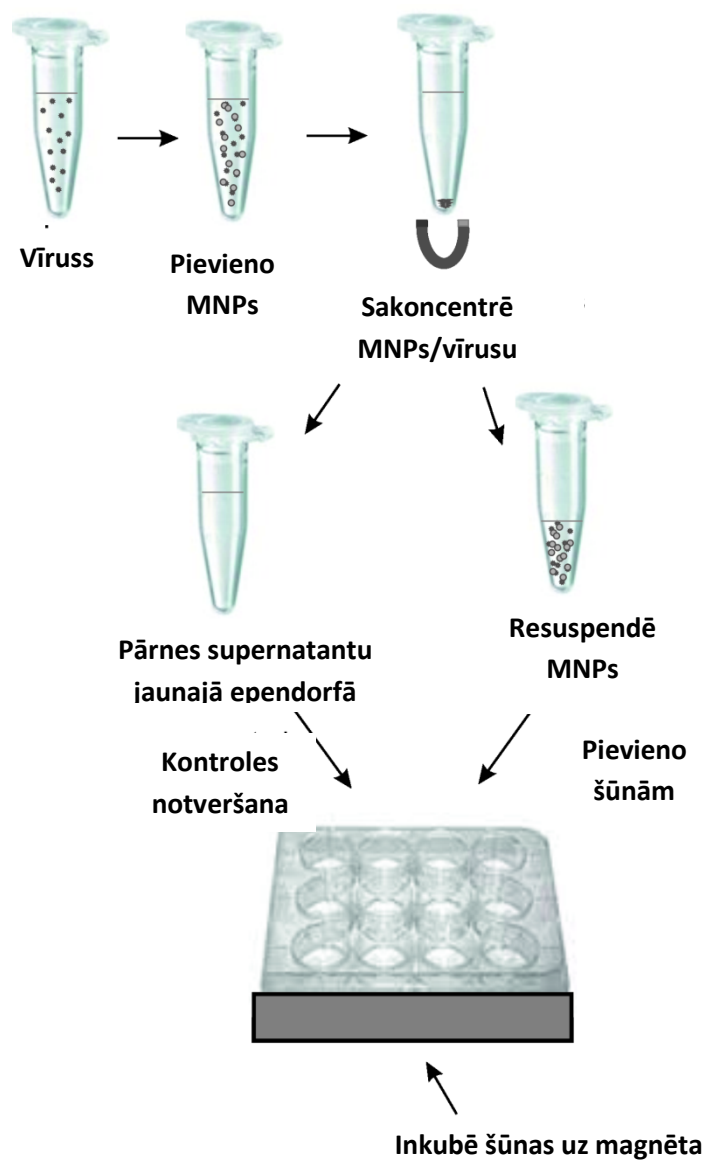
### 3.5. Vīrusa koncentrēšana ar magnētiskām nanodaļiņām

#### Infekcija ar SFV1/DS-Red vīrusu pēc vīrusa magnētiskās izgulsnēšanas

Lai pārbaudītu vīrusu koncentrēšanas iespējas, pielietojot MNPs, tika izmantotas divas 12 aiļu plates ar BHK šūnām (90% konfluence). SFV1/DS-Red vīrusa magnētiskā izgulsnēšana tika veikta 1,5 ml plastmasas stobriņos dažādās vidēs: DMEM (bez FS), NaCl (500 mM), BHK barotne (bez FS) un PBS, kur tika pievienots SFV1/DS-Red vīruss un atbilstošās MNPs (Fluid-Mag Amine un Fluid-Mag Chitosan). Lai izgulsnētu vīrusa un MNPs kompleksus, tika izmantots magnētiskais statīvs (*Magnetic rack*), ar kura palīdzību kompleksi tika atdalīti no supernatanta (3.2. att). Kompleksi tika resuspendēti atbilstošā vidē tādā pašā apjomā, kā supernatanti. Kad visi kompleksi un supernatanti tika sagatavoti, tie tika pievienoti šūnām, un tika veikta šūnu infekciju, kā aprakstīts metodēs.

Negatīvā kontrole - šūnas tika kultivētas tādos pašos apstākļos, bet bez MNPs un vīrusa pievienošanas.

Pozitīvā kontrole: šūnām tiek pievienots vīruss PBS++ šķīdumā standarta infekcijas apstākļos bez MNPs.

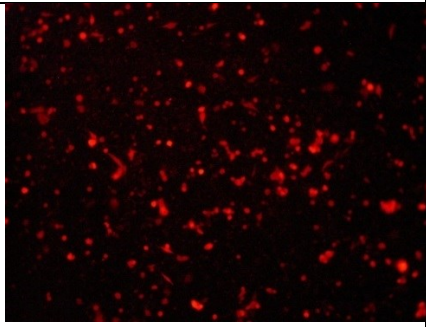
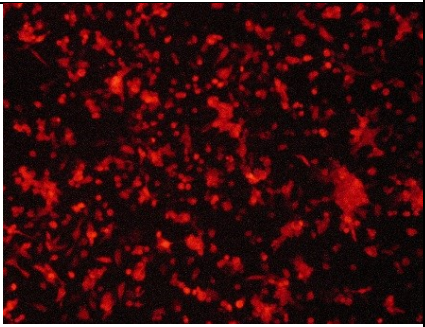
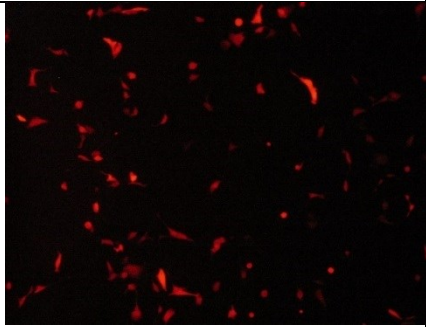
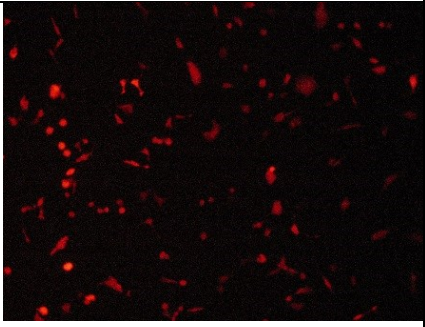
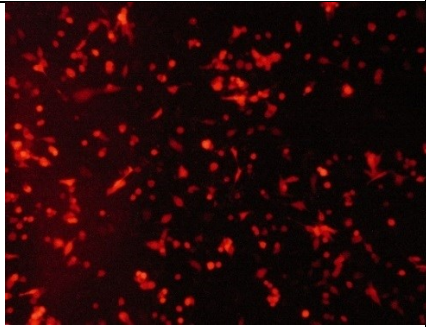
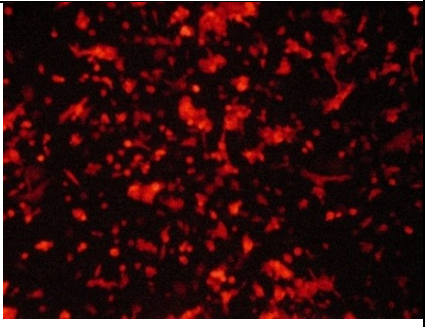
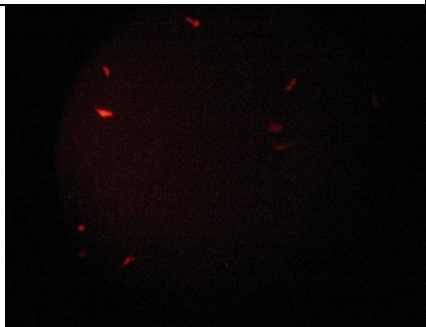
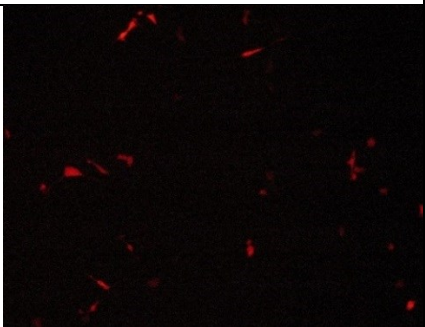
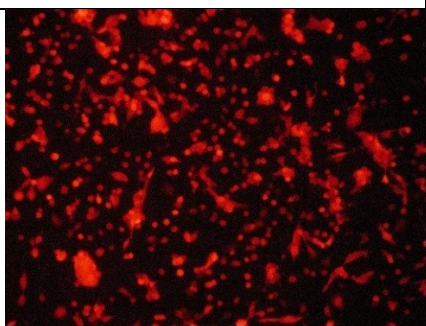
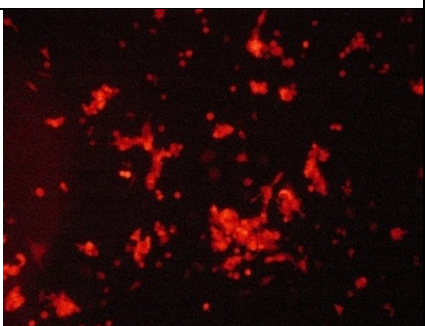


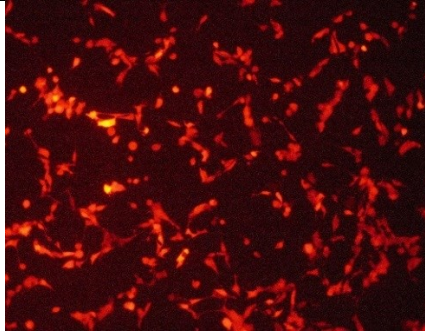
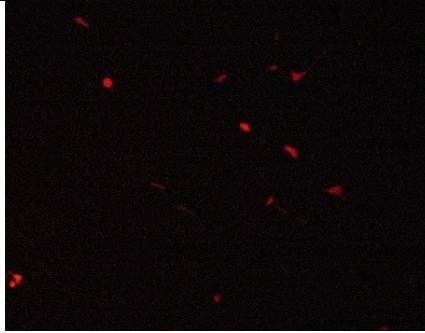
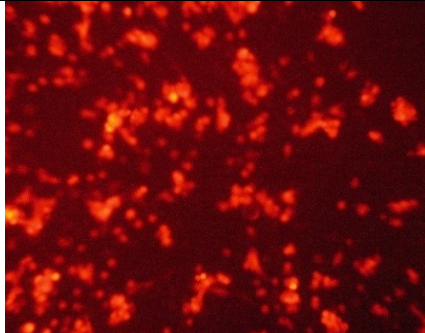
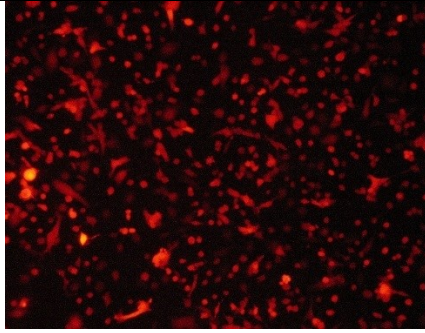
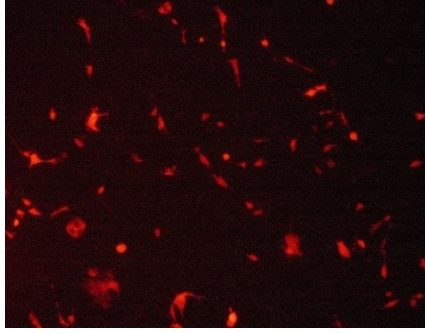
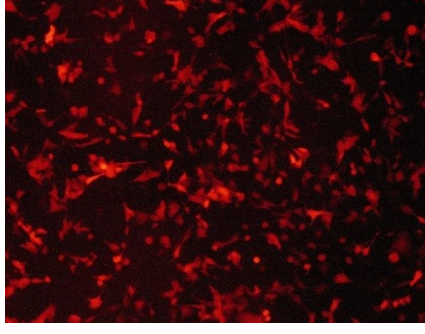

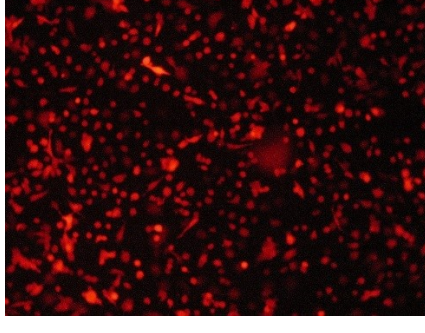
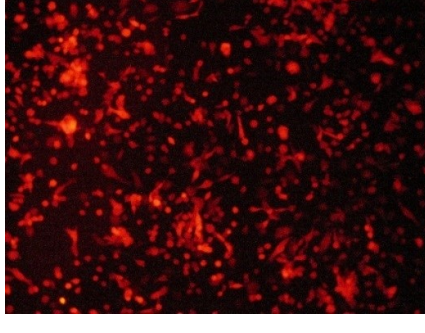
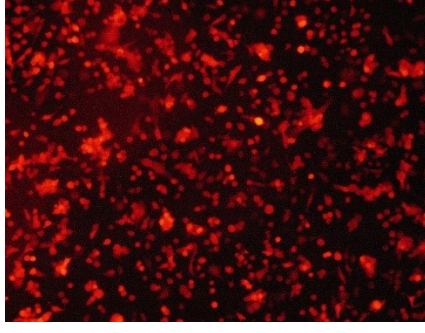
3.2.att. Vīrusa magnētiskās izgulsnēšanas eksperimenta shēma (sk. tekstu)

Figure 3.2. Experimental scheme of virus capturing (see text)

Tā kā BHK šūnu kultūra uzrāda visefektīvākos rezultātus gēnu ekspresijā, tā tika izvēlēta kā pozitīvā kontrole. Salīdzinot ar BHK šūnu līniju, gēnu ekspresija audzēju šūnu līnijās ir zemāka. Tas parāda, ka vīrusa infekcijas efektivitāte ir atkarīga no izmantotās šūnu kultūras. Visaugstākā gēnu ekspresija tika sasniegta Huh-7 un TS/A šūnās. Taču arī pārējās pētāmajās vēža šūnu līnijās tika konstatēta gēna ekspresijā, kas nozīmē, ka visas šīs šūnu līnijas ir iespējams izmantot kā audzēju modeļus *in vivo* eksperimentos.

### Mikroskopijas rezultāti:

	<b>BHK šūnu līnija + Fluid-Mag Chitosan magnētiskās daļiņas dažādos šķīdumos</b>	<b>BHK šūnu līnija + Fluid-Mag Amine magnētiskās daļiņas dažādos šķīdumos</b>	
<b>a)</b> kompleksu precipitāts DMEM šķīd. ar Fluid-Mag Chitosan			<b>A)</b> kompleksu precipitāts DMEM šķīd. ar Fluid-Mag Amine
<b>b)</b> DMEM šķīd. supernatants pēc Fluid-Mag Chitosan izgulsnēšanas			<b>B)</b> DMEM šķīd. supernatants pēc Fluid-Mag Amine izgulsnēšanas
<b>c)</b> kompleksu precipitāts NaCl šķīd. ar Fluid-Mag Chitosan			<b>C)</b> kompleksu precipitāts NaCl šķīd. ar Fluid-Mag Amine
<b>d)</b> NaCl šķīd. supernatants pēc Fluid-Mag Chitosan izgulsnēšanas			<b>D)</b> NaCl šķīd. supernatants pēc Fluid-Mag Amine izgulsnēšanas
<b>e)</b> kompleksu precipitāts BHK šķīd. ar Fluid-Mag Chitosan			<b>E)</b> kompleksu precipitāts BHK šķīd. ar Fluid-Mag Amine

<p><b>f)</b> BHK šķīd. supernatants pēc Fluid- MAg Chitosan izgulsnēšanas</p>			<p><b>F)</b> BHK šķīd. supernatants pēc Fluid- Mag Amine izgulsnēšanas</p>
<p><b>g)</b> kompleksu precipitāts PBS šķīd. ar Fluid-Mag Chitosan</p>			<p><b>G)</b> šūnu infekcija DMEM barotnē (bez FS)</p>
<p><b>h)</b> PBS šķīd. supernatants pēc Fluid-Mag Chitosan izgulsnēšanas</p>			<p><b>H)</b> Šūnu infekcija NaCl šķīd.</p>
<p><b>i)</b> BHK šūnas ar Chitosan magn.daļ. bez vīrusa klātbūtnes (negatīvā kontrolē)</p>			<p><b>I)</b> BHK šūnu infekcija ar SFV vīrusu BHK šķīd.</p>
<p><b>j)</b> BHK šūnas ar Chitosan magn.daļ. un SFV vīrusu (pozitīvā kontrolē), bez izgulsnēšanas</p>			<p><b>J)</b> BHK infekcija ar SFV vīrusu PBS šķīd.</p>

Iepriekšējos šūnu transdukcijas eksperimentos tika pārbaudīti trīs MNPs veidi, un pēc iegūtiem rezultātiem tika izvēlētas visefektīvākās MNPs – Fluid-Mag Chitosan un Fluid-Mag Amine nanodaļiņas. Turpmākajos vīrusa koncentrēšanas eksperimentos tika izmantotas tikai šīs. Abu veidu MNPs tika salīdzinātas savā starpā, izmantojot BHK šūnas, un kā vienas, tā otras uzrādīja pozitīvu efektu, izmantojot dažādas vides (DMEM, NaCl, PBS, BHK barotni).

Iedarbība šūnu kultūrā tika salīdzināta, izmantojot gan MNPs/vīrusu kompleksus, gan supernatantus attiecīgajos šķīdumos. Fluid-Mag Chitosan MNPs uzrādīja visaugstāko efektu NaCl šķīdumā, bet Fluid-Mag Amino MNPs pastiprināja efektivitāti gan NaCl šķīdumā, gan DMEM.

5% BHK barotne tika izvēlēta kā pozitīvā kontrole, un rezultāti ļoti skaidri atspoguļoja, ka BHK vide ir visatbilstošākā ekspresijas nodrošināšanai. PBS šķīdumā ar Chitosan MNPs ekspresija bija ļoti labi novērojama, bet tika detektēta šūnu agregācija, jo bija sācies apoptozes process. Līdz ar to, zīmantojot supernatantu, ekspresija bija krietni zemāka.

#### **FACS rezultātu apkopojums:**

Inficētās šūnas tika analizētas ar FACS metodi. Ņemot vērā, ka iepriekš Fluid-Mag Chitosan MNPs uzrādīja lielu autofluorescenci, plūsmas citometrija tika pielietota tikai Fluid-Mag Amine MNPs paraugiem (3.10. tab).

Kā negatīvā kontrole tika izmantotas BHK šūnas, kam tika pievienotas tikai MNPs. Bet par pozitīvo kontroli kalpoja šūnas, kas tika inficētas ar SVF vīrusu un kam tika pievienotas Fluid-Mag Amine MNPs.

**Fluid-Mag Amine MNPs un SFV/DS-Red vīrusa kompleksu magnētiskās izgulsnēšanas FACS rezultāti**

Table 3.10.

**FACS results of magnetic precipitation of the Fluid-Mag Amine MNPs and SFV/DS-Red virus complexes**

Parauga nosaukums	RFP (+), (%)
Negatīvā kontrole	0,0
Pozitīvā kontrole (Fluid-Mag Amine un SFV/DS-Red, bez izgulsnēšanas)	68,3
1.DMEM + Fluid-Mag Amine	6,7
2.DMEM + supernatants	0,2
3.NaCl + Fluid-Mag Amine	74,9
4.NaCl + supernatants	1,2
5.BHK + Fluid-Mag Amine	67,7
6.BHK + supernatants	3,1
7.PBS -/- + Fluid-Mag Amine	8,7
7.PBS -/- + supernatants	0,1

Salīdzinot iegūtos rezultātus no eksperimenta, kurā tika izmantotas dažādas vides un BHK šūnas, kuras inficētas ar SFV/Red vīrusu, var redzēt, ka MNPs vairakkārt pastiprina infekciju, salīdzinot ar šūnām, kuras tika vienkārši inficētas ar SFV/-Red vīrusu.

BHK standarta barotne (bez FS) uzrādīja labu rezultātu kā optimālākā BHK šūnu kultivēšanas barotne.

Kopumā šie rezultāti parāda, ka magnētiskajām laukam ir izšķiroša nozīme, ļaujot uzlabot šūnu transdukciju ar SFV-MNPs kompleksiem vairākas reizes, salīdzinot ar transdukciju bez magnētiskā lauka ietekmes. Šūnu transdukcijas efektivitāti ar MNPs/SFV kompleksiem dažādos vides apstākļos, iespējams, ir ietekmējušas MNPs, kas vairakkārt pastiprina magnētisko lauku. Lai spētu izvērtēt magnētisko iedarbību, inficējot ar SFV dažādos šķīdumos, tika pārbaudīta viena paša vīrusa iedarbība dažādos šķīdumos. Visos četros gadījumos (DMEM, NaCl, BHK barotne un PBS) vīrusa ekspresija bija ļoti augsta (3.11. tab).

## Ar SFV inficētas BHK šūnas dažādās vidēs bez magnētiskām daļiņām

Table 3.11.

## BHK cells infected with SFV in different media without magnetic particles

Parauga nosaukums	RFP (+), (%)
Negatīvā kontrole (BHK šūnas)	0,00
Pozitīvā kontrole (standarta infekcija PBS++ šķīdumā)	90,9
1.DMEM + SFV/-Red vīrus	89,6
2.NaCl + SFV/-Red vīrus	49,6
3.BHK bar.+ SFV/-Red vīrus	93,9
4.PBS -/- + SFV/-Red vīrus	90,5

Nanodaļiņu magnētiskā iedarbība ļauj ātri koncentrēt vīrusu daļiņas ar minimāli bīstamu apstrādi, lai panāktu augstu vīrusu uztveršanas un reģenerācijas līmeni. Magnētiskā lauka izmantošana ir vienkārša, ātra un viegli lietojama, kā arī ļauj izvairīties no laikietilpīgas ultracentrifugēšanas un hromatogrāfijas vīrusu koncentrēšanas paņēmieniem [50].

Kādas pielietojuma iespējas ir ar magnētiskām daļiņām koncentrētā vīrusam? Pēc magnētiskās koncentrācijas vīrusus var izmantot vairākiem testiem un pētījumiem. Šādi sakoncentrētus vīrusus var tieši izmantot *in vitro* un *in vivo* infekcijām. Šī metode ļauj koncentrēt vīrusa devu, paātrinot šūnu transdukcijas procesu un šūnu infekciju ar gēnu piegādi. Turklāt vīrusu infekcijas efektivitāte ir ievērojami palielināta un arī šūnu adsorbēšana/infekcija var tikt uzlabota. Ir iespējams veikt arī mērķtiecīgu/ierobežotu transdukciju konkrētā apgabalā (magnētiskā marķēšana) [53]. Ir pierādīts, ka daudzi pielietojumi ir piemēroti vīrusam, kas ir koncentrēts ar magnētiskām daļiņām [54], piemēram, PCR, Western blot, ELISA, *in vitro* un *in vivo* infekcijas utt.

Eluācijas buferi paralēli piedāvā iespēju atdalīt vīrusu daļiņas no magnētiskajām daļiņām, un tie ir pilnīgi saderīgi ar vīrusa dzīvotspēju un šūnu bioloģiju. Koncentrētās vīrusu daļiņas var uzglabāt glabāšanas buferī. Tādā veidā uzglabāšanas apstākļos uzlabojas vīrusu stabilitāte [52]. Glabāšanas buferi ir specifiski adenovīrusiem un retrovīrusiem. Šī darba ietvaros visas pētītās vides tika atzītas par labiem buferšķīdumiem. Visefektīvākais bija DMEM ar Fluid-Mag Amine un Fluid-Mag Chitosan MNPs, kam sekoja PBS ar Fluid-Mag Amine un Fluid-Mag Chitosan

MNPs, un visbeidzot NaCl ar Fluid-Mag Amine un Fluid-Mag Chitosan MNPs. Kopumā iegūtie rezultāti apliecināja, ka to izmantošana ir atkarīga no nepieciešamjiem apstākļiem.

Rezultāti liecina, ka MNPs varētu būt ātrs un efektīvs veids, kā izdalīt, attīrīt un koncentrēt SFV daļiņas ar magnētisko izgulsnēšanu. MNPs/vīrusu kompleksus var izgulsnēt ar magnētiskā lauka palīdzību, pēc tam mazgāt un atkārtoti resuspendēt nelielā tilpumā attiecīgajā buferšķīdumā, kas nodrošina ievērojamu koncentrāciju un attīrīšanas ātrumu. Rezultātā MNPs var izmantot augstu SFV titru ražošanai, tādējādi ļaujot uzlabot šūnu transdukciju.

Šūnu transdukcija veicina MNPs/vīrusu kompleksu izmantošanu arī *in vivo* apstākļos. Vairāki pētījumi ir uzrādījuši panākumus magnētiski uzlādēto MNPs/vīrusu kompleksu piegādē *in vivo* [15, 26, 27, 29], un šis darbs var kalpot kā pamats, lai attīstītu SFV potenciālu *in vivo* apstākļos, izmantojot magnētisko spēku. Šāds mērķtiecīgais magnētisms būtu daudzsoļa stratēģija, kas ļautu uzlabot SFV vektoru drošību un efektivitāti preklīniskajos un klīniskajos pielietojumos. Turklāt, MNPs ir iespējams detektēt ar magnētiskās rezonanses (MR) palīdzību [34]. Tas ļauj iezīmēt vīrusu daļiņas ar MNPs, dodot iespēju izsekot vīrusu lokalizāciju *in vivo* [23] ar MR. Tas nozīmē, ka MNPs un SFV vektoru kompleksus var izmantot terapijā.

Noslēgumā, pastiprinātu vēža šūnu transdukciju ar SFV/MNPs kompleksiem magnētiskā lauka ietekmē varēs izmantot nākotnē, piemēram, mērķtiecīgā un uzlabotā SFV gēnu terapijā, vienlaikus nosakot ārstēšanu/vizualizāciju ar MR. SFV asociācija ar pozitīvi lādētām MNPs var būt ātrs un efektīvs veids, kā izolēt, attīrīt un koncentrēt SFV daļiņas ar MNPs neatkarīgi no vides.

## SECINĀJUMI

1. Magnētiskas nanodaļiņas Fluid-Mag Amine un Fluid-Mag Chitosan būtiski pastiprina SFV1/DS-Red un SFV1/TNFalfa transdukciju TS/A un Huh-7 šūnās.
2. Negatīvi lādētas Fluid-Mag CMX magnētiskas nanodaļiņas neuzlabo SFV vīrusa transdukciju šūnās.
3. Fluid-Mag Chitosan un Fluid-Mag Amine magnētiskām nanodaļiņām piemīt autofluorescence, kas labi novērojamā TS/A un Huh-7 šūnu kultūrās.
4. Vīrusa koncentrācijas palielināšanai visefektīvāk izmantot DMEM buferšīdumu, bet arī PBS un NaCl šķīdumi uzrāda augstas efektivitātes vīrusa koncentrācijas palielināšanas spējas, pielietojot magneto-precipitāciju.

## PATEICĪBAS

Izsaku lielu pateicību sava maģistra darba vadītājai Dr. biol. Annai Zajakinai par apmācību, darba vadīšanu, padomiem un darba izstrādes palīdzību.

Paldies Ancei Bogdanovai par palīdzību un atbalstu darba tapšanā.

Paldies Aleksandrai Vežānei par šūnu kultūru audzēšanu un sagatavošanu nepieciešamajiem eksperimentiem. Kā arī par atbalstu un palīdzību.

Paldies Jurisam Jansonam par darba recenzēšanu.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Aranda, A., Ruiz-Guillen, M., Quetglas, J.I., Bezunartea, J., Casales, E., Smerdou, C., 2011. Recent patents on alphavirus protein expression and vector production. *Recent Pat. Biotechnol.* 5, 212–226.
2. Derek WTrobaugh, William BKlimstra, 2017. Alphaviruses suppress host immunity by preventing myeloid cell replication and antagonizing innate immune responses. *Current Opinion in virology*, 30-34.
3. Elaine M.Morazzani, Jaimee R.Compton, Dagmar H.Leary, Angela V.Berry, Xin Hu, Juan J.Marugan, Pamela J.Glass, Patricia M.Legler, 2018. Proteolytic cleavage of host proteins by the Group IV viral proteases of Venezuelan equine encephalitis virus and Zika virus. *Antiviral Research*, Volume 164, Pages 106-122.
4. Brian D.Carey, Allison Bakovic, Victoria Callahan, Aarthi Narayanan. Kylene Kehn-Hall, 2019. New World alphavirus protein interactomes from a therapeutic perspective. *Antiviral Research*, Volume 163, Pages 125-139.
5. Strauss, J.H., Strauss, E.G., 1994. The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. *Microbiology Rev.* 58, 491–562.
6. Liljeström, P., Garoff, H., 1991. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology* 9, 1356–1361.
7. Pushko, P., Parker, M., Ludwig, G.V., Davis, N.L., Johnston, R.E., Smith, J.F., 1997. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* 239, 389–401.
8. Jose I.Quetglas, Marta Ruiz-Guillen, Alejandro Aranda, Erkuden Casales, Jaione Bezunartea, Cristian Smerdou, 2010. Alphavirus vectors for cancer therapy. *Virus Research*, Volume 153, Issue 2, Pages 179-196.
9. Tina Saren, Mohanraj Ramachandran, Miika Martikainen, Di Yu. 2017. Insertion of the Type-I IFN Decoy Receptor B18R in a miRNA-Tagged Semliki Forest Virus Improves Oncolytic Capacity but Results in Neurotoxicity. *Department of Immunology, Genetics, and Pathology*, 67-75.
10. Lundstrom, K., 2014. Alphavirus-based vaccines. *Viruses* 6, 2392–2415.
11. Lundstrom, K., 2015. Alphaviruses in gene therapy. *Viruses* 7, 2321–2333.
12. Madoz, J.R.R., Prieto, J., Smerdou, C., 2007. Biodistribution and tumor infectivity of Semliki Forest virus vectors in mice: effects of re-administration. *Mol. Ther.* 15, 2164–2171.

13. Vasilevska, J., Skrastina, D., Spunde, K., Garoff, H., Kozlovska, T., Zajakina, A., 2012. Semliki Forest virus biodistribution in tumor-free and 4T1 mammary tumor-bearing mice: a comparison of transgene delivery by recombinant virus particles and naked. *Technol. Cancer Res. Treat.* 1, 83–88.
14. Lundstrom, K., 2002. Alphavirus vectors as tools in cancer gene therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* 1, 83–88.
15. Vähä-Koskela, M.J.V., Kallio, J.P., Jansson, L.C., Heikkilä, J.E., Zakhartchenko, V.A., Kallajoki, M.A., Kaähaäri, V.M., Hinkkanen, A.E., 2006. Oncolytic capacity of attenuated replicative Semliki Forest virus in human melanoma xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 66, 7185–7194.
16. Pereyra, A.S., Mykhaylyk, O., Lockhart, E.F., Taylor, J.R., Delbono, O., Goya, R.G., Plank, C., Hereñu, C.B., 2016. Magnetofection enhances adenoviral vector-based gene delivery in skeletal muscle cells. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 7, 364.
17. Castellani, S., Orlando, C., Carbone, A., Gioia, S., Conese, M., 2016. Magnetofection enhances lentiviral-mediated transduction of airway epithelial cells through extracellular and cellular barriers. *Genes* 7.
18. Haim, H., Steiner, I., Panet, A., 2005. Synchronized infection of cell cultures by magnetically controlled virus. *J. Virol.* 79, 622–625.
19. Tai, M.F., Chi, K.M., Lau, K.H.W., Baylink, D.J., Chen, S.T., 2003. Generation of magnetic retroviral vectors with magnetic nanoparticles. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 5, 319–323.
20. Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Krüger, A., Gänsbacher, B., Plank, C., 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 9, 102–109.
21. Almstätter, I., Mykhaylyk, O., Settles, M., Altomonte, J., Aichler, M., Walch, A., Rummeny, E.J., Ebert, O., Plank, C., Braren, R., 2015. Characterization of magnetic viral complexes for targeted delivery in oncology. *Theranostics* 5, 667–685.
22. Hwang, J.H., Lee, S., Kim, E., Kim, J.S., Lee, C.H., Ahn, I.S., Jang, J.H., 2011. Heparin-coated superparamagnetic nanoparticle-mediated adeno-associated virus delivery for enhancing cellular transduction. *Int. J. Pharm.* 421, 397–404.
23. Kadota, S., Kanayama, T., Miyajima, N., Takeuchi, K., Nagata, K., 2005. Enhancing of measles virus infection by magnetofection. *J. Virol. Methods* 128, 61–66.
24. Tresilwised, N., Pithayanukul, P., Mykhaylyk, O., Holm, P.S., Holzmüller, R., Anton, M., Thalhammer, S., Adigüzel, D., Döblinger, M., Plank, C., 2010.

- Boosting oncolytic adenovirus potency with magnetic nanoparticles and magnetic force. *Mol. Pharm.* 7, 1069–1089.
25. Sapet, C., Pellegrino, C., Laurent, N., Sicard, F., Zelphati, O., 2012. Magnetic nanoparticles enhance adenovirus transduction in vitro and in vivo. *Pharm. Res.* 29, 1203–1218.
  26. Kim, E., Oh, J.S., Ahn, I.S., Park, K.I., Jang, J.H., 2011. Magnetically enhanced adenovirus-associated viral vector delivery for human neural stem cell infection. *Biomaterials* 32, 8654–8662.
  27. Bhattarai, S.R., Kim, S.Y., Jang, K.Y., Lee, K.C., Yi, H.K., Lee, D.Y., Kim, H.Y., Hwang, P.H., 2008. N-Hexanoyl chitosan-stabilized magnetic nanoparticles enhancement of adenoviral-mediated gene expression both in vitro and in vivo. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 4, 146–154.
  28. Kamei, K., Mukai, Y., Kojima, H., Yoshikawa, T., Yoshikawa, M., Kiyohara, G., Yamamoto, T.A., Yoshioka, Y., Okada, N., Seino, S., Nakagawa, S., 2009. Direct cell entry of gold/iron-oxide magnetic nanoparticles in adenovirus mediated gene delivery. *Biomaterials* 30, 1809–1814.
  29. Tresilwised, N., Pithayanukul, P., Mykhaylyk, O., Holm, P.S., Holzmüller, R., Anton, M., Thalhammer, S., Adigüzel, D., Döblinger, M., Plank, C., 2010. Boosting oncolytic adenovirus potency with magnetic nanoparticles and magnetic force. *Mol. Pharm.* 7, 1069–1089.
  30. Tresilwised, N., Pithayanukul, P., Holm, P.S., Schillinger, U., Plank, C., Mykhaylyk, O., 2012. Effects of nanoparticle coatings on the activity of oncolytic adenovirus magnetic nanoparticle complexes. *Biomaterials* 33, 256–269.
  31. Hashimoto, M., Hisano, Y., 2010. Directional gene-transfer into the brain by an adenoviral vector tagged with magnetic nanoparticles. *J. Neurosci. Methods* 194, 316–320.
  32. Sun, C., Lee, J.S.H., Zhang, M., 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1252–1265.
  33. Smithburn K. C, Haddow A.J, 1944. Semliki Forest Virus I. Isolation and Pathogenic Properties. *J. Immunol.* 49: 141–157.
  34. Jose J., Snyder J.E., Kuhn R.J., 2009. A structural and function perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*, 4 (7): 837-856.
  35. Hyde J.L., Chen R., Trobaugh D.W., Diamond M.S., Weaver S.C., Klimstra W.B., Wilusz J., 2015. The 5' and 3' end of alphavirus RNAs – Non-coding is not non-functional. *Virus Research*, S0168-1702(915)00026-X.

36. Marta Ruiz-Guillen, Nicola G.A. Abrescia, Cristian Smerdou, 2017. Neurotropic alphaviruses can propagate without capsid. *Oncotarget*; 8(6): 8999–9000.
37. B. Weiss, R. Levis, and S. Schlesinger, 1983. Evolution of virus and defective-interfering RNAs in BHK cells persistently infected with Sindbis virus. *J Virology*: 48(3): 676–684.
38. Smit JM, Waarts B.L, Kimata K, Klimstra W.B., Bittman R., Wilschut J., 2002. Adaptation of alphaviruses to heparan sulfate: interaction of Sindbis and Semliki forest viruses with liposomes containing lipid-conjugated heparin. *J Virol.*;76(20):10128-37.
39. Vander Veen R.L., Hank Harris D.L., Kamrud K.I., 2012. Alphavirus replication vaccines. Cambridge University Press, 1-9.
40. Riezebos-Brilman A., De Mare A., Bungener L., Huckriede A., Wilschut J., Daemen T., 2006. Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumor and anti-microbial immunotherapy. *Journal Of Clinical Virology.*, 35(3): 223-243.
41. Sammy Detry, Katarzyna Składanowska, Marnik Vuylsteke, Savvas N. Savvides, Yehudi Bloch, 2019. Revisiting the combinatorial potential of cytokine subunits in the IL-12 family. *Biochemical Pharmacology*.
42. M.Lee Lucas, Loree Heller, Domenico Coppola, Richard Heller, 2002. IL-12 Plasmid Delivery by in Vivo Electroporation for the Successful Treatment of Established Subcutaneous B16. F10 Melanoma. *Molecular Therapy*. Volume 5, Issue 6, Pages 668-675.
43. Chikkanna-Gowda CP<sup>1</sup>, Sheahan BJ, Fleeton MN, Atkins GJ., 2005. Regression of mouse tumours and inhibition of metastases following administration of a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-12. *Gene Ther.*;12(16):1253-63.
44. Sean E.Mazloom, Di Yan, Jeffery Z.Hu, JasonYa, M. Elaine Husni, Christine B.Warren, Anthony P.Fernandez, 2018. TNF- $\alpha$  Inhibitor-Induced psoriasis: A decade of experience at the Cleveland Clinic. *Journal of the American Academy of Dermatology*.
45. La Linn M., Eble J.A., Lubken C., Slade R.W., Heino J., Davies ., Suhrbier A., 2005. An arthritogenic alphavirus uses the alpha I beta I integrin collagen receptor. *Virology*, 336(2); 229-239.
46. Paulo C.M. Urbano, Raúl Aguirre-Gamboa, Angel Ashikov, Bennie van Heeswijk, Anja Krippner-Heidenreich, Henk Tijssen, Yang Li, Valderilio F. Azevedo, Lisa J.T. Smits, Frank Hoentjen, Irma Joosten, Hans J.P.M. Koenen, 2018. Chapter Two - Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily in T Cell Priming and Effector Function. *Advances in Immunology*, Volume 140, Pages 21-57.

47. Paulo C.M. Urbano, Raúl Aguirre-Gamboa, Angel Ashikov, Bennie van Heeswijk, Anja Krippner-Heidenreich, Henk Tijssen, Yang Li, Valderilio F. Azevedo, Lisa J.T. Smits, Frank Hoentjen, Irma Joosten, Hans J.P.M. Koenen, 2018. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- $\alpha$  agents – Comparison among therapeutic TNF- $\alpha$  antagonists. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 142, Issue 2, Pages 517-529
48. Maria Leticia de Castro Barbosa<sup>1,2</sup>, Milla Machado Fumian, Ana Luísa Palhares de Miranda, Eliezer J. Barreiro, Lídia Moreira Lima, 2011. Therapeutic approaches for tumor necrosis factor inhibition. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 47, n.3.
49. Carrasco L, Sanz M.A, González-Almela E., 2018. The Regulation of Translation in Alphavirus-Infected Cells. *Viruses*; 10(2).
50. Tadic, Marin; Kralj, Slavko; Jagodic, Marko; Hanzel, Darko; Makovec, Darko (December 2014). "Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment". *Applied Surface Science*. 322: 255–264. Almstätter, I., Mykhaylyk, O., Settles, M., Altomonte, J., Aichler, M., Walch, A., Rummeny, E.J., Ebert, O., Plank, C., Braren, R., 2015. Characterization of magnetic viral complexes for targeted delivery in oncology. *Theranostics* 5,667–685.
51. Aranda, A., Ruiz-Guillen, M., Quetglas, J.I., Bezunartea, J., Casales, E., Smerdou, C., 2011. Recent patents on alphavirus protein expression and vector production. *Recent Pat. Biotechnol.* 5, 212–226.
52. Akikazu Sakudo, Koichi Baba, Kazuyoshi Ikuta, 2016. Capturing and concentrating adenovirus using magnetic anionic nanobeads. *Int J Nanomedicine*.
53. Joshua A. Jackman, Eric Linardy, Daehan Yoo, Jeongeun Seo, Wei Beng Ng, Daniel J. Klemme, Nathan J. Wittenberg, Sang-Hyun Oh, Nam-Joon Cho, 2015. Plasmonic Nanohole Sensor for Capturing Single Virus-Like Particles toward Virucidal Drug Evaluation.
54. Sakudo A, Baba K, Tsukamoto M, Sugimoto A, Okada T, Kobayashi T, Kawashita N, Takagi T, Ikuta K, 2009. Anionic polymer, poly (methyl vinyl ether-maleic anhydride)-coated beads-based capture of human influenza A and B virus. Department of Virology, Center for Infectious Disease Control, Research Institute for Microbial Diseases.
55. Kurena B, Müller E, Christopoulos PF, Johnsen IB, Stankovic B, Øynebråten I, Corthay A, Zajackina A., 2017. Generation and Functional In Vitro Analysis of Semliki Forest Virus Vectors Encoding TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . *Front Immunology*.

56. Vasilevska J, De Souza GA, Stensland M, Skrastina D, Zhulenvovs D, Paplausks R, Kurena B, Kozlovska T, Zajakina A., 2016. Comparative protein profiling of B16 mouse melanoma cells susceptible and non-susceptible to alphavirus infection: Effect of the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther.*;17(10):1035-1050.
57. Pulaski , Ostrand-Rosenberg S.,2001. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 20.
58. Borowsky AD, Namba R, Young LJ, Hunter KW, Hodgson JG, Tepper CG, McGoldrick ET, Muller WJ, Cardiff RD, Gregg JP., 2005. Syngeneic mouse mammary carcinoma cell lines: two closely related cell lines with divergent metastatic behavior. *Clinical and Experimental Metastasis*, Pages 47-59.
59. Nanni P, de Giovanni C, Lollini PL, Nicoletti G, Prodi G., 1983. TS/A: a new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis*.
60. Bruno Sainz, Veronica TenCate, Susan L. Uprichard. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection // *Virology Journal*. — 2009. — Т. 6. — С. 103. — ISSN 1743-422X. — DOI:10.1186/1743-422X-6-103.
61. Дюжева Т.Г., Ковина М.В., Платонова Л.В., Люндуп А.В., Куимов А.Н., Клабуков И.Д., Гао С., Балясин М.В., Гальперин Э.И. Влияние биологической комбинации (экстракт из растущей печени) на культуры клеток различного происхождения (рус.) // *Анналы хирургической гепатологии*. — 2018. — Т. 23, № 1. — С. 88–95. — ISSN 2408-9524. — DOI:10.16931/1995-5464.2018-1-88-95.

## DOKUMENTĀRĀ LAPA

Latvijas Universitātes bioloģijas fakultātes pilna laika (klātienes) bioloģijas maģistra studiju programmas 2. kursa studentes Jeļenas Sorokinas (stud. Apl. Nr. js11145) maģistra darbs tika izstrādāts biomedecīnas pētījumu un studiju centrā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: Jeļena Sorokina/ \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_. (paraksts) (paraksta atšifrējums)  
(datums)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Darba vadītāja: Dr. biol. Anna Zajakina / \_\_\_\_\_ / 2019.g.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.

Recenzents: Dr. biol. Juris Jansons / \_\_\_\_\_ / 2019.g.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.

Darbs iesniegts Latvijas Universitātes bioloģijas fakultātes molekulārās bioloģijas katedrā  
2019.g.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.

Katedras vadītājs: \_\_\_\_\_ / Dr. biol. Kaspars Tārs/ 2019.g.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

2019.gada \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_. , prot. Nr. \_\_\_\_\_ , vērtējums \_\_\_\_\_

Komisijas sekretārs(-e): \_\_\_\_\_