

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

BAKTERIOFĀGA IZCELSMES
DSRNS (LARIFAN) IETEKME UZ MELANOMAS
AUGŠANU PEĻU AUDZĒJU MODEĻOS

Maģistra darbs

Autors: Irina Verhovcova
Stud. apl. Nr. ib10080
Darba vadītājs: Dr. biol. Dace Pjanova

RĪGA 2020

SATURA RĀDĪTĀJS

KOPSAVILKUMS	3
SUMMARY	4
SAĪSINĀJUMI	5
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. MELANOMA	8
1.2. TERAPIJAS VEIDI	9
1.3. MELANOMAS IMŪNTERAPIJA	11
1.4. TOLL-LIKE RECEPTORI UN TO AGONISTU PRET-AUDZEJU AKTIVITĀTE	12
1.5. DSRNS PRET-AUDZEJU AKTIVITĀTE	15
2. MATERIĀLI UN METODEDES	16
2.1. MATERIĀLI	16
2.1.1. <i>Peles</i>	<i>16</i>
2.1.2. <i>Šūnu līnija.....</i>	<i>16</i>
2.2. METODEDES	16
2.2.1. <i>Pētījuma dizains</i>	<i>16</i>
2.2.2. <i>Larifan terapija</i>	<i>17</i>
2.2.3. <i>Audzēju mērīšana primārās melanomas modelī.....</i>	<i>19</i>
2.2.4. <i>Plaušu metastāžu skaitīšana.....</i>	<i>19</i>
2.2.5. <i>Peļu dzīvildzes noteikšana primārajā modelī.....</i>	<i>19</i>
2.2.6. <i>Histoloģija un morfometrija</i>	<i>19</i>
2.2.7. <i>Plūsmas citometrija.....</i>	<i>20</i>
2.2.8. <i>Citokīnu analīze.....</i>	<i>20</i>
2.2.9. <i>Statistikā analīze.....</i>	<i>21</i>
3. REZULTĀTI	22
3.1. LARIFAN ANTIMETASTĀTISKAIS EFEKTS	22
3.2. LARIFAN IETEKME UZ PRIMĀRAJIEM AUDZĒJIEM.....	25
3.3. PRIMĀRO AUDZĒJA NOVĒRTĒJUMS.....	29
3.4. MIKROMETASTĀŽU NOVĒRTĒJUMS PRIMĀRĀS MELANOMAS MODELĪ	30
4. DISKUSIJA	32
5. SECINĀJUMI	36
6. PATEICĪBAS	37
7. LITERATŪRAS SARAKSTS	38

KOPSAVILKUMS

Melanoma ir ļaundabīgs audzējs, kas veidojas galvenokārt ādā no tur esošajiem melanocītiem. Melanomai ir raksturīga strauja slimības gaita un agrīna metastazēšanās. Tā ir rezistenta pret standarta terapeitiskajām metodēm. Ievērojamais nesens progress melanomas ārstēšanā arī nav devis gaidītos rezultātus, tāpēc joprojām tiek meklēti jauni melanomas ārstēšanas paņēmieni.

Larifan ir bakteriofāga izcelsmes dsRNS (bf-dsRNS), kas iegūta biotehnoloģiskā ceļā no ar bakteriofāgu inficētām *E.Coli* šūnām. Tai piemīt spējas inducēt interforus (IFN), un tā tiek veiksmīgi pielietota kā pretvīrusu līdzeklis ar retām blakusparādībām. Larifan piemīt arī pret-audzēju aktivitāte.

Maģistra darba mērķis bija noskaidrot Larifan ietekmi uz primāro audzēju un uz melanomas metastazēšanos B16 melanomas peļu modelī.

Noskaidrots, ka Larifan kavē plaušu metastāžu veidošanos B16 peļu melanomas modelī un Larifan darbība visdrīzāk realizējas caur IFN sistēmu.

Vislabākos rezultātus primārajā melanomas modelī deva Larifan ievadīšana intraperitoneāli. Interesanti, ka ap primārajiem audzējiem veidojās saistaudu kapsula, kuras esamība varēja ietekmēt terapijas iznākumu.

Darbs izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā laika posmā no 2018. gada septembra līdz 2020. gada maijam.

Atslēgas vārdi: melanoma, Larifan, dsRNS, audzējs, metastāzes, B16 šūnas

SUMMARY

Melanoma is a type of skin cancer that begins in melanocytes – melanin producing cells. Melanoma is characterized by rapid development of the disease and early metastasis. It is resistant to standard therapeutic methods. Recent progress in the treatment of melanoma has not brought the expected results, so new treatments are still required.

Larifan is a heterogeneous population of dsRNA molecules, which has been isolated from *E.coli* cells infected with RNA bacteriophage f2 mutant. It is mostly known for its ability to induce type (I) interferons (IFNs) and it is used as antiviral agent with rare side effects. Nonetheless, it has also been shown to exhibit an anti-tumoral effect in some tumour models.

The aim of the master's thesis was to elucidate the effect of Larifan on primary tumors and melanoma metastasis in a mouse model of B16 mouse melanoma.

The results showed that Larifan inhibits the development of lung metastases in the B16 mouse melanoma that is likely mediated by the IFN system.

Intraperitoneal administration of Larifan gave the best results in the primary melanoma model. We have observed a connective tissue capsule formed around the primary tumors, the presence of which could affect the outcome of the treatment.

The research for the master's thesis was carried out at the Latvian Biomedical Research and Study Centre from September 2018 till May 2020.

Key words: melanoma Larifan, dsRNA, tumor, metastasis, B16 cells.

SAĪSINĀJUMI

dsRNS – dubultspiralizētā ribonukleīnskābe

IFN – interferoni

TLR – “*Toll-like*” receptori

TIR - Toll/interleikin-1 receptors

poly(I:C) - poli-inozīn:policitidīnskābe

Poly-ICLC - Polyinosinic-polycytidylic acid-poly-l-lysine carboxymethylcellulose

IL-6 – interleikins – 6

IL-12 – interleikins - 12

CCR7 (C-C Motiva Hemokinu Receptors 7)

DŠ – dendrītiskās šūnas

PAMP - Pathogen associated molecular pattern

IEVADS

Ļaundabīgā melanoma ir viena no nopietnākajām ādas audzēju formām dēļ tās agrīnas metastazēšanās limfmezglos un attālākajos orgānos (Karaman *et al.*, 2017). No visiem ādas audzējiem 80% gadījumu nāves iemesls ir tieši melanoma (Kabilova *et al.*, 2016). Turklāt tās incidence baltādaino cilvēku populācijā joprojām turpina pieaugt visā pasaulē. Eiropa tūlīt pēc Austrālijas un ASV ir viens no visvairāk melanomas skartajiem reģioniem pasaulē un viens no reģioniem ar visstraujāk augošajiem izplatības rādītājiem (Sommarivaa *et al.*, 2018). Turklāt melanoma ir viens no izplatītākajiem audzēju veidiem, kas ir sastopams arī gados jauniem cilvēkiem (20–35 gadi) (Liu *et al.*, 2018).

Agrīnās stādijās melanoma ir ārstējama ar ķirurģisku iejaukšanos. Taču attīstoties metastāzēm, melanoma vairs nepakļaujas parastām terapeitiskām intervencēm (Liu *et al.*, 2018). Piecu gadu dzīvildze pacientiem ar metastātisko melanomu samazinās līdz pat 17% salīdzinot ar agrīnas stadijas melanomu, kur piecu gadu dzīvildze sasniedz 98%. Līdz ar to ir nepieciešamas jaunas terapeitiskās stratēģijas (Liu *et al.*, 2018).

Jauno mērķētās terapijas metožu, tādu kā proto-onkogēna BRAF un proteīna kināzes MEK specifiskie inhibitori, pagarina pacientu dzīvildzi, taču panākumu līmenis metastātiskās melanomas ārstēšanā salīdzinājumā ar citiem audzēja veidiem joprojām ir salīdzinoši zems, galvenokārt, pret zāļu rezistences attīstības un sistēmiskās toksicitātes dēļ (Liu *et al.*, 2018). Arī imūnterapija, izmantojot monoklonālās antivielas pret citotoksisko T limfocītu asociētiem antigēniem, ir devusi rezultātu tikai daļā pacientu. Tāpēc joprojām tiek meklētas jaunas melanomas terapijas iespējas, ieskaitot dažādas kombinētās terapijas (Vilgelm *et al.*, 2016). Tā kā melanoma tiek uzskatīta par vienu no imunogēnākajiem, ja ne par pašu imunogēnāko ļaundabīgo audzēju (Haanen *et al.*, 2013), tad īpaša uzmanība tiek pievērsta pret-audzēja imunitātes stimulēšanas iespējām.

Gan iedzimto, gan adaptīvo imunitāti var aktivēt ar eksogēno nukleīnskābju palīdzību (bakteriālas, vīrusālas, sēnīšu dabas izcelsmes nukleīnskābēm), caur tā dēvētajiem "*pattern recognition*" receptoriem, tai skaitā "*Toll-like*" receptoriem (TLR) 3/7/8/9 (Kabilova *et al.*, 2016). Dažādu TLR 3/7/8/9 agonistu pret-audzēju aktivitāte ir parādīta vairākos audzēju tipos, ieskaitot melanomu (Kabilova *et al.*, 2016). Turklāt *in vitro* pētījumos ir parādīts, ka no TLR agonistiem nukleīnskābes pret-audzēja atbildi stimulē efektīvāk, nekā pārējie TLR ligandi, piemēram, lipoproteīni un liposaharīdi, (Kabilova *et al.*, 2016), kā arī ir parādīts, ka nukleīnskābes specifiski piesaistās pie TLR3 (Bell *et al.*, 2006). Attiecīgi svešo nukleīnskābju endosomālo sensoru aktivācija noved pie pro-inflammatōro citokīnu, t.sk. interferonu sintēzes,

komplementa sistēmas, koagulācijas, opsonizācijas un fagocitozes stimulācijas, kā rezultātā tiek ierosināta audzēju šūnu apoptoze (Kabilova *et al.*, 2016). Kā viens no TLR3 agonistiem pret-audzēju imunitātes stimulēšanai tiek izmantota “*polyinosinic:polycytidylic*” skābe (poly (I:C)), kas ir mākslīgi rādīta dsRNS ar līdzīgu darbības mehānismu kā vīrusu dsRNS, un kurai piemīt imūnas sistēmas stimulācijas potenciāls, kā arī pret-audzēju aktivitāte (Zhao *et al.*, 2018, Ammi *et al.*, 2014). Diemžēl klīniskajos pētījumos poly (I:C) gadījumā ir atklāti nevēlami blakusefekti - paaugstināta ķermeņa temperatūra, hipotensija, artralģija, mialģija, asins šūnu skaita samazināšanās, gripai līdzīgi simptomi, nieru mazspēja, kaulu sāpes, ka arī toksiska iedarbība uz aknām, kaulu smadzenēm un centrālo nervu sistēmu (Ammi *et al.*, 2014). Tāpēc potenciālo dsRNS analoģu meklēšana ir joprojām aktuāla.

Šajā pētījumā tika izmantota bakteriofāga izcelsmes dsRNS (bf-dsRNS), kas iegūta biotehnoloģiskā ceļā no ar bakteriofāgu inficētām E.Coli šūnām, un ir pazīstama arī ar nosaukumu Larifan (SIA “Larifāns”). Larifan, galvenokārt, piemīt spējas inducēt IFNus, un tas tiek veiksmīgi pielietots kā pretvīrusu līdzeklis ar retām blakusparādībām (Loža and Feldmane, 1996). Turklāt jaunākie pētījumi ir parādījuši, ka Larifan inducēto citokīnu spektrs ir ievērojami plašāks (Veinalde *et al.*, 2013, Pjanova *et al.*, 2019).

Tāpat ir parādīts, ka Larifan piemīt arī pret-audzēju aktivitāte (Loža and Feldmane, 1996), taču sistemātisku pētījumi ar mūsdienīgām metodēm iztrūkst.

Maģistra darba mērķis bija noskaidrot Larifan ietekmi uz primāro audzēju, kā arī ietekmi uz melanomas metastazēšanos B16 melanomas peļu modelī. Izvirzītā hipotēze - pielietotās terapijas ietekmē samazināsies audzēja augšana, attiecīgi, primārās melanomas gadījumā tas reducēsies, bet metastātiskās melanomas gadījumā samazināsies plaušu metastāžu skaits.

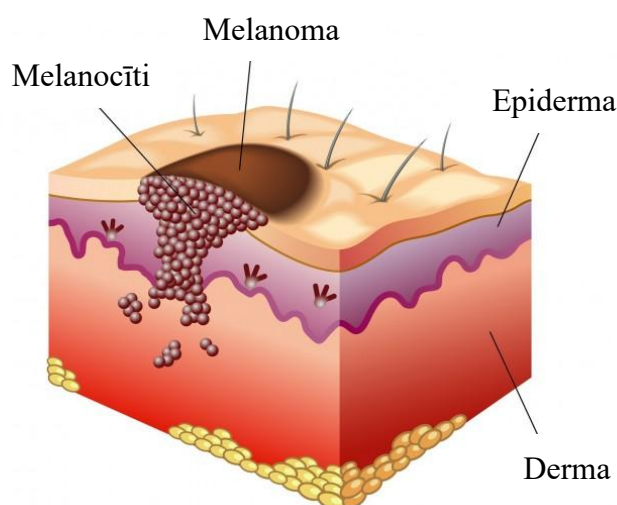
Mērķa sasniegšanai bija izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- a. izanalizēt Larifan ietekmi uz melanomas metastāžu skaitu B16 peļu melanomas modelī;
- b. izanalizēt Larifan ietekmi uz primārā audzēja augšanu B16 peļu melanomas modelī;
- c. izvērtēt primārās melanomas modelī labāko Larifan ievadīšanas veidu, salīdzinot Larifan efektus pēc tā intratumorālas, intraperitoneālas vai perorālas ievadīšanas;
- d. noteikt Larifan inducētos citokīnus peļu asinīs;
- e. noteikt Larifan inducētos limfocītus peļu liesās;
- f. izvērtēt primāro melanomu histopatoloģiskos rādītājus.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Melanoma

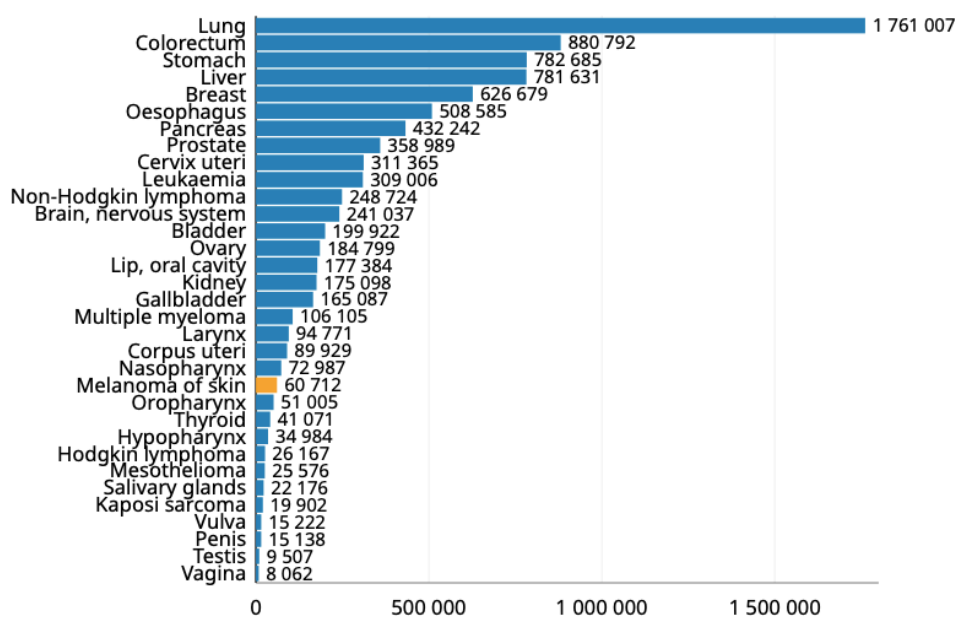
Melanoma ir ļaundabīgs audzējs, kas veidojas no melanocītiem, specializētām pigmentšūnām, kuras atrodas epidermas bazālajā slānī (1.1.1.attēls). Normālā fizioloģiskā stāvoklī melanocītu augšana tiek regulēta ar sekrēciju no keratinocītiem (Mabeta *et al*, 2020). Ja dažādu mutāciju dēļ melanocīti nevar adekvāti reaģēt uz keratinocītu regulatorajiem signāliem, tas noved pie patoloģiskās melanocītu augšanas un melanomas attīstības (Mabeta *et al*, 2020).



1.1.1. Attēls. Ādas melanoma

https://mediad.publicbroadcasting.net/p/wbfo/files/styles/x_large/public/201307/melanoma.jpg

Saslimstība ar ādas melanomu joprojām turpina pieaugt, turklāt ar tendenci attīstīties salīdzinoši arvien jaunākiem cilvēkiem. Pacientu izdzīvošana pēc melanomas diagnozes arī ir ļoti atšķirīga (Ko *et al*, 2017). Melanomai ir raksturīga strauja metastazēšanās ar augstu potenciālu izplāties viscerālajos orgānos, un tas notiek samērā agrā melanomas progresēšanas fāzē (Ko *et al*, 2017). Metastātiskā melanoma ir arī viena no heterogēnākajiem un mutāciju visvairāk skartajiem audzējiem. Turklāt arī viena no letālākajiem audzēju veidiem (Kozar *et al*, 2019). Neskatoties uz to, ka melanoma ir salīdzinoši rets ādas audzēja paveids, tā ir atbildīga par lielāko nāves gadījumu skaitu, kas saistīti ar ādas audzējiem (Kozar *et al.*, 2019) (1.1.2.attēls). Zīmīgi, ka attīstītajās valstīs, neskatoties uz iespējām gan melanomas diagnostikā, gan ārstēšanā, situācija arvien pasliktinās, galvenokārt, audzēja novēlotas diagnosticēšanas dēļ (Mabeta *et al.*, 2020). Vēl piedevām metastātiskajai melanomai ir slikta prognoze. Atkarībā no slimības stadijas vidēja dzīvildze melanomas pacientiem ir vidēji 5,3 – 10,0 mēneši (Saleh *et al.*, 2018).

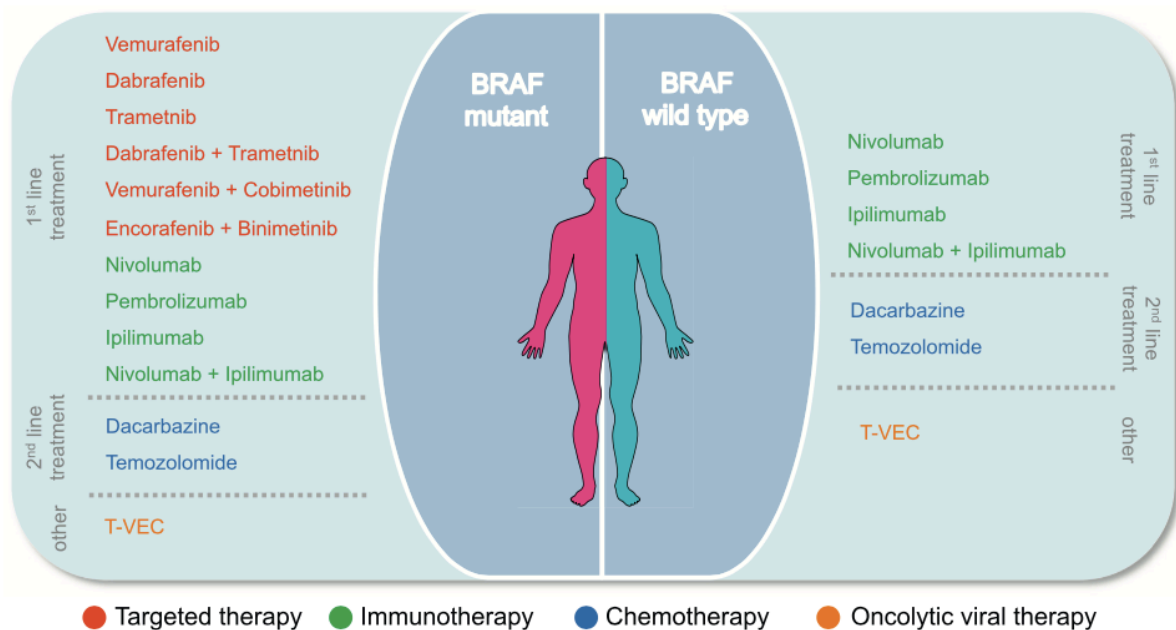


1.1.2. Attēls. Audzēju mirstības rādītāji pasaulē 2018.gadā (saskaņā ar Globocan 2018 datiem (Bray *et al.*, 2018)).

Jaunās zāles, piemēram, Vemurafenib un Dabrafenib, kuras lieto gan atsevišķi vai kombinācijā ar MEK inhibitoru Trametinib, ir ievērojami uzlabojušas pacientu stāvokli (Mabeta *et al.*, 2020). Taču par problēmu ir kļuvusi rezistence pret minētajiem preparātiem un to kombinācijām (Mabeta *et al.*, 2020).

1.2. Terapijas veidi

Vēl pavisam nesen pacientu ar metastātisko melanomu ārstēšana bija ierobežota ar apstarošanu un ar parastajiem ķīmijterapijas preparātiem ar zemu efektivitāti un ierobežotu terapeitisko efektu (Kozar *et al.*, 2019). Tikai pēdējos gados no progresijas brīvo pacientu skaists un kopējā melanomas pacientu dzīvildze uzlabojas. Tas noticis pateicoties mērķterapijas un imūnterapijas ieviešanai (Kozar *et al.*, 2019). Tomēr neskatoties uz šo progresu melanomas ārstēšanā, smago blakusefektu un rezistences dēļ joprojām tiek meklēti jauni, labāki ārstēšanas varianti (Kozar *et al.*, 2019).



1.2.1. Attēls. Neoperablas metastātiskās melanomas ārstēšanas varianti. Pirmās līnijas ārstēšana melanomas pacientiem ir ļoti atkarīga no BRAF mutācijas esamības, kā arī no tā, cik ātri slimība progresē (Kozar *et al.*, 2019).

Pašreizējās terapijas iespējas melanomas pacientiem galvenokārt sastāda ķirurģiskā ārstēšana, ķīmijterapija, imūnterapija un mērķterapija (1.2.1. attēls) (Kozar *et al.*, 2019). Atkarībā no slimības stadijas, audzēja atrašanās vietas un ģenētiskā profila, kā arī no pacienta vispārējā veselības stāvokļa un vecuma, šīs metodes var tikt pielietotas gan atsevišķi, gan dažādās kombinācijās (Kozar *et al.*, 2019).

Pacientiem ar agrīnas stadijas melanomu pamata ārstēšana ir ķirurģiskā operācija.

Metastātisko melanomu nevar izārstēt ar ķirurģisku iejaukšanos vien, galvenokārt, dēļ metastāzēm, un nereti dēļ lielā metastāžu skaita. Turklāt pastāv arī papildus grūtības atklāt metastāzes. (Kozar *et al.*, 2019). Pacientiem ar vēlīnas stadijas progresējošu melanomu vai melanomas recidīviem parasti lieto ķīmijterapiju, kas sastāv no temozolomīda (TMZ) un dakarbazīna (DTIC) (Kozar *et al.*, 2019). Pacientiem ar II/III un retos gadījumos IV stadijas melanomu, joprojām pielieto arī interferonu α -2b (IFN α -2b) un interleikīnu-2 (IL-2) augstās devas (Kozar *et al.*, 2019). Progress melanomas ārstēšanā tika panākts ar monoklonālo antivielu pielietošanu, kas darbojas kā šūnas cikla kontrolpunktu inhibitori (Kozar *et al.*, 2019).

1.3. Melnomas imūnterapija

Melanoma tiek uzskatīta par vienu no imunogēnākajiem audzējiem, galvenokārt, dēļ lielā mutāciju skaita, ko rada UV starojums un kā dēļ rodas daudz jaunu neoantigēnu. Šos neoantigēnus kā svešus atpazīt saimnieka imūnsistēma un vēršas pret tiem (Ko *et al.*, 2017). Taču uzskats, ka melanoma ir imunogēns audzējs ir balstīts arī uz vairākiem citiem novērojumiem:

- 1) ik pa laikam notiek remisijas;
- 2) aptuveni 5% gadījumu neatrod primāro audzējus,
- 3) kā primārajos audzējos, tā arī metastāzēs bieži atrod limfocītu infiltrātus,
- 4) pētot limfocītu infiltrāciju melanomas audos, ir atklāts, ka daļa no T-limfocītiem spēj atpazīt melanomas antigēnus,
- 5) melanoma atbild uz imūnterapiju (Haanen *et al.*, 2013).

Metastātiskā melanoma ir pazīstama ar savu rezistenci pret tradicionālajām audzēju ārstēšanas metodēm, ieskaitot ķīmijterapiju, staru terapiju, kā arī, salīdzinot ar citiem audzējiem, relatīvo jutību pret imūnterapiju (Ko *et al.*, 2017).

Imūnterapijas galvenais darbības virziens ir imūnsistēmas uzbrukuma virzīšana pret audzēja šūnām, mērķējot tieši pret audzēja antigēniem, kā arī pastiprinot jau esošās pretaudzēja imūnās atbildes. Šobrīd pielietotajās pretaudzēju imūnterapijas stratēģijās ietilpst nespecifiska imūnterapija, pretaudzēju vakcīnas, onkolītisko vīrusu terapija, monoklonālās antivielas un T šūnu terapija. Efektīvu minēto pieeju kombinācija var palielināt imūnterapijas efektivitāti, izraisot noturīgu pretaudzēju imūnreakciju (Taefehshokra *et al.*, 2019).

Pretaudzēju imūnā atbilde ir sekojoša. Pirmajā posmā audzēja šūnās parādās neoantigēni, kurus atpazīst dendrītiskās šūnas un tiek atbrīvoti tādi imunoloģiskie signāli kā citokīni un hemokīni. Tālāk dendrītiskās šūnas prezentē antigēnus T šūnām. Tas noved pie efektoro T šūnu aktivācijas, kas vērstas pret audzēja specifiskiem antigēniem. Aktivētās T šūnas, tādas kā CD8⁺ efektorās Tšūnas, nokļūst līdz audzējam, infiltrējas tajā, atpazīst tās un sāk iznīcināt. Pēc audzēja šūnu iznīcināšanas veidojas ar audzēju asociētie antigēni turpmāko pret-audzēju imūno atbilžu ciklu efektivitātes pastiprināšanai. Taču ne vienmēr pacientiem audzēja šūnu iznīcināšanas cikls darbojas optimāli. Dendrītiskās un T šūnas var neuztvert audzēja antigēnus kā svešus, tādējādi radot T regulējošo šūnu atbildes un veidojot disfunkcionālās T šūnas (Taefehshokra *et al.*, 2019). Audzēju imūnterapijas galvenais mērķis ir noskaidrot, kādā veidā audzēju šūnas spēj izvairīties no imūnsistēmas un pielietojot atbilstošas stratēģijas veicināt pret-audzēja imunitāti (Taefehshokra *et al.*, 2019).

1.4. Toll-like receptori un to agonistu pret-audzēju aktivitāte

Gan iedzimto, gan arī iegūto imunitāti ir iespējams stimulēt ar eksogēnām nukleīnskābēm, piemēram, baktēriju un vīrusu nukleīnskābēm. Tas notiek caur vairākiem tā dēvētiem “*pattern recognition receptor*” receptoriem, pie kuriem pieder arī “*Toll-like*” receptori (TLR) (1.4.1 attēls). Pie viena no TLR, konkrēti TLR3, piesaistās arī dubultspirāliskā RNS (dsRNS) (Starkhammar *et al.*, 2012).

Būtībā *Toll-like* receptoru aktivizēšana it kā brīdina imūnsistēmu par mikrobu izcelsmes produktiem un ierosina iedzimtās un adaptīvās imūnas atbildes (Adams *et al.*, 2009). *Toll-like* receptoru dabiskās imūnstimulējošās īpašības līdz ar to var izmantot aktīvai pret-audzēju imūnterapijai (Adams *et al.*, 2009). Iedzimtā imūnā sistēma izmantoto dažādus transmembrānu vai sekrētos patogēnu atpazīšanas receptorus (PRR - *Pathogen recognition receptor*), kas ir nepieciešami komplementa un koagulācijas kaskāžu aktivizēšanai, opsonizācijai, fagocitozei, apoptozei un pro-inflamatoro mediatoru indukcijai (Adams *et al.*, 2009).

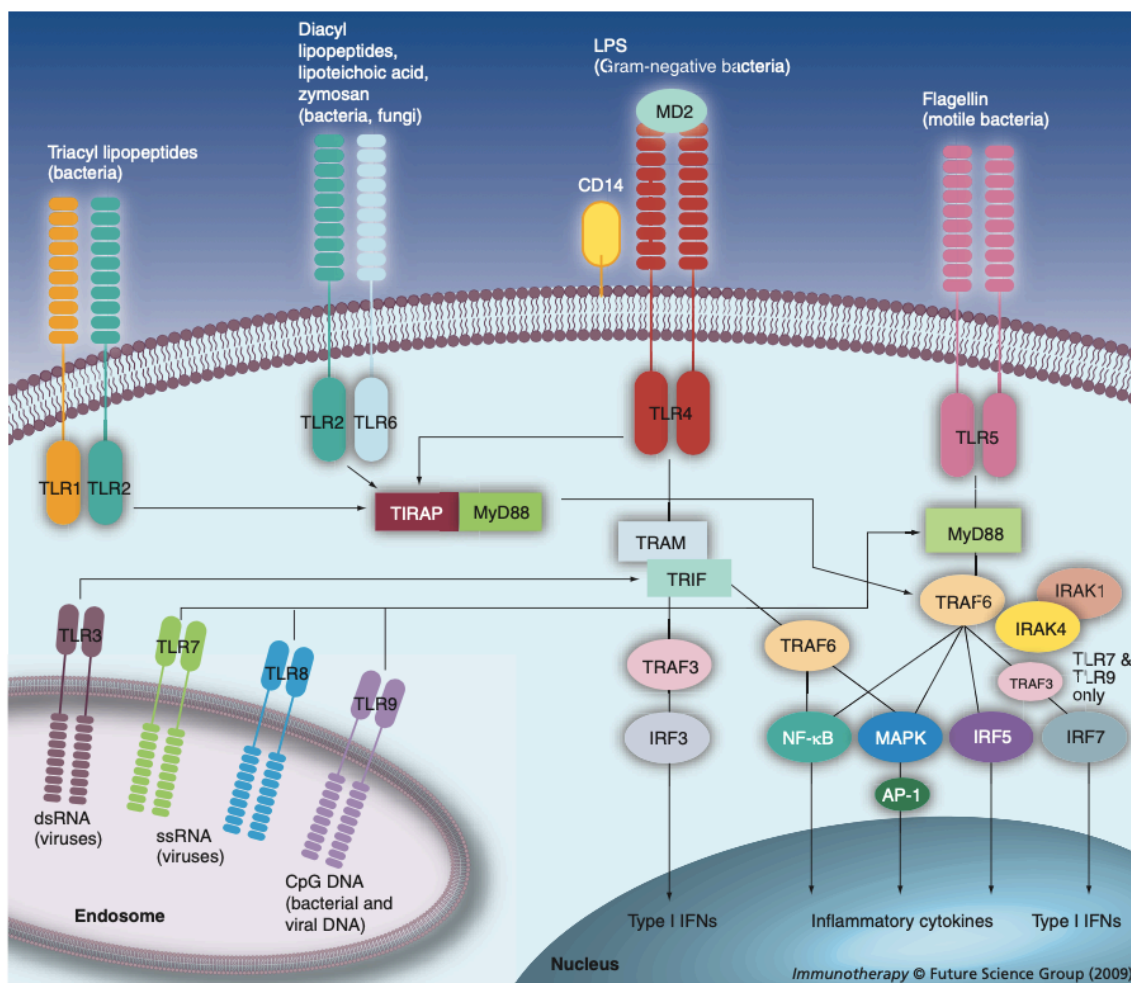
Patogēniem raksturīgās molekulārās struktūras jeb PAMP (*Pathogen associated molecular pattern*) ir konservēti motīvi, kas ir sastopami vairākām baktērijām, vīrusiem, vienšūņiem un sēnītēm. Pie tiem tiek arī pieskatīti, piemēram, liposaharīds (LPS) (atpazīst TLR4); peptidoglikāni (šūnu sienas sastāvdaļas), lipoproteīni (baktēriju kapsulu sastāvdaļas) un zimosāns (tos visus atpazīst TLR2 pēc heterodimerizācijas ar TLR1 vai TLR6); flagelīns (baktēriju flagela, ko atpazīst TLR5), metilēts baktēriju vai vīrusu CpG DNS (atpazīst TLR9) un vīrusu RNS (vienpavediena RNS, ko atpazīst TLR7 un TLR8 un divpavediena RNS, ko atpazīst TLR3) (Adams *et al.*, 2009).

Toll-like receptori pieder pie TLR-IL-1 receptoru (TIR - Toll/interleikin-1 receptors) virsdzimtas. Tiem ir ektodomēns, kas sastāv no ar leicīnu bagātiem atkārtotiem PAMP un intracitoplazmatiskā TIR domēna, kas veic adaptera molekulu rekrutēšanu, piemēram, tādu kā mieloīda diferenciācijas faktors-88 (MyD88), ar TIR saistītais proteīns (TIRAP), ar Toll-receptoriem saistīts interferonu aktivators un/vai ar Toll receptoriem saistītā molekula (TRAM). Lielākā TLR daļa ir eksponēta uz šūnu virsmas, bet tādi receptori kā TLR3, 7, 8 un 9 ir atrodamī endosomās, kur tie aktivizējas pēc patogēnu vai to produktu uztveršanas un internalizācijas (Adams *et al.*, 2009).

Toll-like receptori galvenokārt tiek ekspresēti iedzimtās imūnas sistēmas šūnās. Tie nodrošina sensoru sistēmu visā ķermenī (Adams, 2009).

TLR3, 4, 7/8 un 9 agonisti ir daudzsoļi audzēju imūnterapijas līdzekļi un tie ir iekļauti Nacionālā vēža institūta imūnterapeitisko līdzekļu sarakstā ar visaugstāko audzēju ārstēšanas potenciālu. Tie nodrošina pamatprasības, kuri nepieciešami T šūnu imunitātes ierosināšanai:

antigēnu uztveršanu, dendrītisko šūnu un citu antigēnprezentējošo šūnu nobriešanu un aktivēšanu, un tai sekojošu T šūnu aktivizēšanu (Adams, 2009). TLR mediētā dendrītisko šūnu aktivizēšana noved pie pastiprinātas fagocitozes, MHC un kostimulējošo molekulu (CD80, CD86 un CD40) pastiprinātas ekspresijas, CCR7 (C-C Motīva Hemokīnu Receptors 7) pastiprinātas ekspresijas un migrācijas uz limfmezgliem. Arī pie citokīnu pastiprinātas sekrēcijas un antigēnu prezentācijas limfocītiem. Pirmā tipa interferoni (IFN α) ir visizplatītākie citokīni, ko inducē TLR3, 7, 8 un 9 aktivizācija. Neskatoties uz to, ka I tipa IFN α bieži ir saistīti ar pretvīrusu aizsardzību, tie ir nepieciešami arī vairākos adaptīvās imūnās atbildes aspektos, ieskaitot antigēna savstarpējas prezentācijas atvieglošanu, atmiņas T-šūnu proliferāciju, T-šūnu apoptozes novēršanu, dendrītisko šūnu nobriešanas indukciju un NK šūnu aktivizēšanu (Adams *et al.*, 2009). Īpaša interese TLR agonistu attīstībā pret-audzēju terapijas saistībā ir TLR inducēto citokīnu IL-6 un IL-12 efekti. IL-6 var pastiprināt antigēn-specifisku T šūnu aktivāciju, nomācot Treg šūnas, kuras supresē imūno atbildi. Savukārt IL-12 sagroza efektora atbildi uz Th1 pusi (Adams *et al.*, 2009). Th1 tipa citokīniem ir arī tendence izraisīt pretiekaisuma reakcijas, kas ir atbildīgas par intracelulāro parazītu iznīcināšanu un autoimūnām reakcijām (Berger *et al.*, 2000).



1.4.1 Attēls. *Toll-like* receptoru signāli. *Toll-like* receptori (TLR) atpazīst mikrobu izcelsmes produktus, endogēnos ligandus (piemēram, HGMB1, nav parādīts) un sintētiskus agonistus (nav parādīti), tieši vai ar palīgmolekulu palīdzību, piemēram, CD14 un MD2. TLR iedarbina MyD88 adaptera molekulu, kas signalizē caur TRIF. TLR4 signalizācija var sekot no MyD88 / TIRAP un / vai no TRIF / TRAM atkarīgiem ceļiem. NF-κB, aktivatora proteīna (AP) -1 un interferona regulējošo faktoru (IRF) aktivizēšana inducē gēnus, kas kodē iekaisuma citokīnus, I tipa IFNus un IFN inducējamu gēnu ekspresiju. MyD88: mieloīdu diferenciācijas faktors-88; TIRAP: ar TIR saistīts proteīns; TRAM: ar *Toll-like* receptoriem saistīta molekula; TRIF: ar *Toll-like* receptoriem saistīts interferona aktivators (Berger *et al.*, 2000).

1.5. dsRNS pret-audzēju aktivitāte

Divpavediena RNS (dsRNS) neatkarīgi no tās izcelšanās un nukleotīdu secības piemīt daudzveidīga bioloģiskā aktivitāte, ieskaitot pretvīrusu darbību, šūnu proliferācijas inhibēšanu un imūnas atbildes modulāciju (Loža and Feldmane, 1996).

Vispēcīgākais I tipa IFNu induktors, ko atpazīst TLR3 ir poli-inozīn:policitidīnskābe (poly I:C). Poly I:C ir vīrusu dsRNS sintētiskais analogs, kas stimulē ar endosomālo TLR3 un/vai ar melanomas diferenciāciju saistīto proteīnu 5 (MDA5), izraisot pastiprinātu I tipa IFN produkciju.

Poly I:C un tās stabilākais paveids, poli I:C-poli-I-lizīns (poli ICLC), ir arī pielietoti klīnikā audzēju terapijā. Intravenoza vai intramuskulārā poli I:C ievadīšana vairākos gadījumos neuzrādīja klīnisko aktivitāti, iespējams, dēļ tā straujās sadalīšanās cilvēka organismā. Taču stabilākais savienojums poli ICLC inducēja IFN (Adams *et al.*, 2009). Kā arī bija atklāts, ka poly-ICLC ir daudz plašāka bioloģiskā iedarbība, ieskaitot specifiskas pret-audzēja un pretvīrusu darbības. Poly-ICLC aktivizē vairākus iedzimtās un adaptīvās imunitātes elementus t.sk. dažādus citokīnus un hemokīnus, NK šūnas, T šūnas, mieloīdās dendrītiskās šūnas, proteīna kināzi R (PKR) un vēl citas no dsRNS atkarīgas saimniekorganisma aizsargsistēmas (Kyj *et al.*, 2018).

Larifan ir bakteriofāga izcelsmes dsRNS, kas iegūta 1980.gados biotehnoloģiskā ceļā no ar bakteriofāgu inficētām *E.Coli* šūnām. Tā satur dsRNS ar vidējo garuma 500 kad un 750 bāzu pāri. Preklīniskie pētījumi demonstrēja preparāta plejotropo bioloģisko aktivitāti un Larifan spēja inducēt interferonus bija parādīta vairākās dzīvnieku sistēmās. Pēc savas spējas inducēt interferonus, Larifan var salīdzināt ar iepriekš minēto poly I:C. Larifan pretvīrusu efekti bija pierādīti gan *in vitro*, gan *in vivo*. Tas uzrādīja terapeitisko efektu herpes vīrusa, papillomas vīrusa un gripas gadījumā. Larifan ir izmantots arī pret-audzēju pētījumos, piemēram, sarkomas, leukēmijas, leikozes un arī melanomas gadījumā. Ir minēts arī, ka Larifan piemīt pret-audzēja aktivitāte, inhibējot audēju augšanu un metastāžu veidošanos (Loža and Feldmane, 1996).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1. Peles

Eksperimentā tika izmantotas C57BL/6 peles, mātītes, 10 - 11 nedēļu vecas, 14 – 16g smagas. Izcelsmes vieta – Tartu Universitātes Laboratorijas dzīvnieku centrs (Igaunija). Peles nebija ģenētiski modificētas un bija audzētas no specifiskiem patogēniem brīvos (SPF) apstākļos. BMC peles tika uzturētas SPF apstākļos ar automātiski kontrolētiem un reģistrētiem dzīvnieku standartam atbilstošiem apstākļiem. Visas procedūras ar dzīvniekiem tika veiktas saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes direktīvu par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību. Pētījumam tika saņemta Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja Nr. 94.

2.1.2. Šūnu līnija

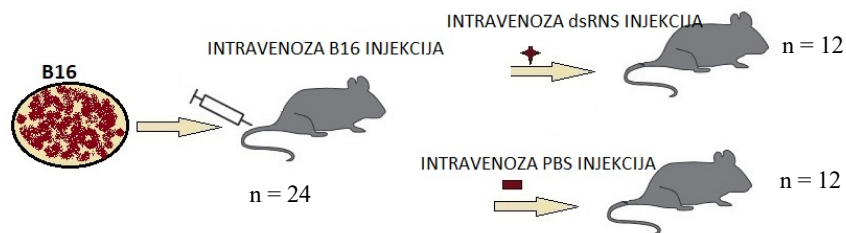
Izmantotā B16 peļu melanomas šūnu līnija, kas vēsturiski izdalīta no mājas peles (*Mus musculus*), bija no BMC šūnu kolekcijas. Šūnas tika kultivētas modificētā DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) barotnē (Invitrogen Life Technologies), kas saturēja L-glutamīnu (2 mM) un bija papildināta ar 10% liellopa augļa serumu, 100 U/ml penicilīna un 100 mg/ml streptomicīna (Sigma-Aldrich), 5% CO₂ atmosfērā pie 37 ° C.

2.2. Metodes

2.2.1. Pētījuma dizains

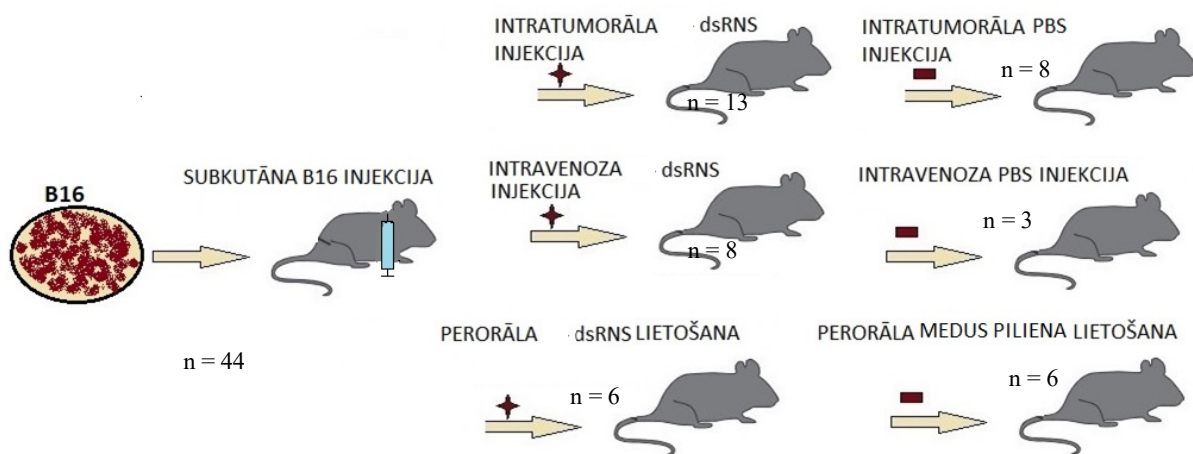
Darbā izmantoti divi melanomas modeļi - primārās melanomas jeb subkutānās melanomas modelis un metastātiskās melanomas modelis.

Metastātiskās melanomas modelī 4×10^5 B16 melanomas šūnas/pele injicēja pelei intravenozi (i.v.) astes vēnā, panākot ka tādejādi metastāzes pārsvarā veidojas specifiski tikai plaušās (Ya *et al.*, 2016; Kabilova *et al.* 2016). Metastātiskās melanomas modelī tika izveidotas divas peļu grupas - attiecīgi eksperimentālo dzīvnieku grupa un kontroles grupa, katrā grupā iekļaujot 12 peles. Kopā 24 peles. Peļu skaits grupā bija noteikts iepriekš piloteksperimentā un aprēķināts izmantojot brīvpiecejas statistiskās analīzes rīku G*power (<http://www.gpower.hhu.de/>), kā kritērijus izvēloties statistisko spēku (1- beta) 80% un alpha=0.05 (2.1. attēls).



2.1. attēls. Metastātiskais melanomas modelis

Primāras melanomas modelī 1.5×10^5 melanomas šūnas/pele ievadīja pelei zemādās injekcijas veidā skausta rajonā. Primāras melanomas modelī bija izveidotas sešas dzīvnieku grupas - trīs eksperimentālo dzīvnieku grupas, kurās atšķīrās Larifan ievadīšanas veids (intratumorāli (i.p.), intraperitoneāli (i.p.) vai perorāli), un attiecīgi trīs kontroles grupas, kas saņēma PBS injekcijas. Dzīvnieku skaits katrā no grupām parādīts 2.2. attēlā. Kopā 44 dzīvnieki.



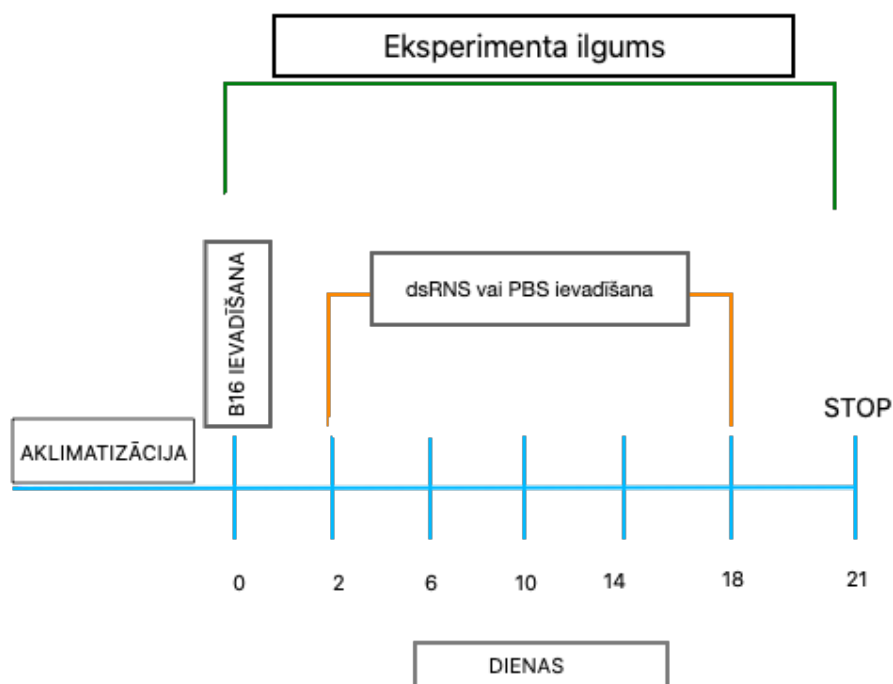
2.2. attēls. Primārās jeb subkutānās melanomas modelis.

2.2.2. Larifan terapija

Terapijas laikā dzīvnieki saņēma 10 $\mu\text{g}/\text{pele}$ Larifan 100 μl PBS (terapijas grupas) vai 100 μl PBS (kontroles grupas).

Metastātiskās melanomas modelī Larifan vai PBS tika ievadīti intravenozi astes vēnā. Injekcijas veica ik pēc četrām dienām, sākot ar otro dienu pēc B16 šūnu ievadīšanas. Kopsummā peles saņēma piecas injekcijas un 21. dienā eksperiments tika pārtraukts (2.3.

attēls). Eksperimenta beigu diena tika noteikta iepriekš piloteksperimentā. Visām pelēm terminālajā anestēzijā tika veikta sirds kardiocentēze, pēc kuras nekavējoties peles tika eitanazētas, izmantojot kakla skriemeļu dislokāciju, un veikta nekropsija orgānu izņemšanai tālākām analīzēm. Savāktas tika plaušas, liesas un aknas. Papildus terapijas laikā 11. dienā tika paņemti asins paraugi no astes vēnas.



2.3. attēls. Terapijas shēma metastātiskajā modelī.

Primārās melanomas modelī audzēja attīstībai katrā pelē sekoja individuāli, un terapija tika uzsākta brīdī, kad bija izveidojies neliels palpējams veidojums. Terapijas laikā peles saņēma Larifan vai PBS injekcijas ar četru dienu intervālu atbilstoši grupas piederībai – i.t., i.p. vai perorāli, attiecīgi 1., 5. un 9. dienā. Eksperiments tika pārtraukts, kad audzējs sasniedza 1 cm³ tilpumu vai 13. dienā pelēm i.t. un perorālās ievadīšanas grupās un 14. dienā i.p. ievadīšanas grupā. Līdzīgi kā metastātiskajā modelī visām pelēm tika veikta sirds kardiocentēze un nekropsijas laikā ievākts gan audzēja materiāls, gan iekšējie orgāni (plaušas, liesas, aknas). Papildus terapijas laikā 6. dienā tika paņemti arī asins paraugi no astes vēnas.

2.2.3. Audzēja mērīšana primārās melanomas modelī

Audzēja attīstībai primārās jeb subkutānās melanomas modelī sekoja līdzīgi un dzīvniekus apsekoja katru dienu. Pēc palpējama veidojuma izveidošanās, audzējus mērīja katru otro dienu izmantojot Vernier kaliperu. Audzēja tilpumu aprēķināja pēc formulas $V=(L \times W^2)/2$, kur V ir audzēja tilpums, L ir garums un W ir platums.

2.2.4. Plaušu metastāžu skaitīšana

Metastātiskajā modelī plaušu metastāžu klātbūtnes noteikšanai un skaita izvērtēšanai tika izmantots Feketa šķīdums (Ya et al., 2016), un metastāzes saskaitītas manuāli. Feketa šķīduma sastāvs uz 1L: 580mL 95% etanols, 200mL H₂O, 80mL 37% formaldehīda šķīdums, 40mL ledus etiķskābe.

2.2.5. Peļu dzīvildzes noteikšana primārajā modelī

Primārās melanomas modelī visām pelēm tika noteikta dzīvildze par beigu punktu uzskatot brīdi, kad audzējs sasniedza 1 cm³ tilpumu vai eksperimenta beigu dienu. Dzīvildze tika noteikta izmantojot Kaplana-Meijera metodi un MedCalc 19.2 programma (MedCalc Software bv, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).

2.2.6. Histoloģija un morfometrija

Savāktos audzēja audus, aknas, nieres, 1/2 liesas, plaušas no primārās melanomas modeļa fiksē 4% formalīnā un ieguldīja parafīnā pēc standarta metodes (Accart *et al.*, 2014). Parafīnā ieguldītos audus ar mikrotoma palīdzību sagrieza 4 μm plānās šķēlītēs, deparafinēja un krāsoja ar hemotoksilīnu un eozīnu. Proti, paraugu griezumus karsēja termostātā pie temperatūras 64 °C 1 stundu, tad 3 reizes pa 5 min izlaida cauri ksilolam, kam sekoja 2 reizes pa 5 min 96° etanolā un 1 reize 5 min 70° etanolā. Ar hematoksilīnu krāsoja 3 min, kam sekoja skalošana krāna ūdenī 3 min un destilētā ūdenī 3 min. Ar eozīnu krāsoja 1 min, kam sekoja skalošana 1 min destilētā ūdenī un izturēšana 96° etanolā 1 min, un ksilolā 1 min. Nokrāsotajiem paraugiem uzpilināja *Histomount* ieslēgšanas vidi (Thermo Fisher Scientific) un pārklāja ar segstikliņu. Preparātus apskatīja ar LEICA DM3000 mikroskopu, kas aprīkots ar digitālo kameru DFC490 (Leica, Germany). Mikroskopiskā novērtēšana notika ar 40x objektīvu.

Visos savāktajos orgānos tika noteikta mikrometastāžu klātbūtne. To novērtēšanai tika ieviesta vērtējuma skala: 1 - metastāzes bija atrodamas vienā vietā un nelielā skaitā, 2 - metastāzes bija atrodamas vairākās vietās nelielā skaitā, 3 - metastāzes bija atrodamas vairākās vietās lielā skaitā un 4 - metastāžu skaits paraugā bija ļoti liels. Nekrozes izteica % no

redzeslauka un izrēķināja vidējo % daudzumu 20 redzeslaukiem. Vaskularizāciju noteica kā vidējo asinsvadu skaitu 20 redzeslaukos.

2.2.7. Plūsmas citometrija

Ar plūsmas citometrijas palīdzību tika vērtētas T un B limfocītu izmaiņas liesā terapijas ietekmē. Puse no liesas tika apstrādāta 1 U/ml kolagenāzes (Sigma-Aldrich) un izlaista cauri 70 mm sietiņam (BD Biosciences). Šādi apstrādāta šūnu suspensija tika iesaldēta pie -80 °C līdz brīdim, kad tika izmantota plūsmas citometrijas analīzei. T šūnu noteikšanai izmantoja peļu CD3 marķieri (CD3 Monoclonal Antibody (17A2), FITC, eBioscience) un B šūnu noteikšana izmantoja CD20 marķieri (CD20 Monoclonal Antibody (QCH6A7), PE, eBioscience). Šūnas atkausēja ūdens vannā (37 °C), kam sekoja šūnu atmazgāšana 2 reizes PBS, centrifugējot 300 G 10 min uz 5810R Eppendorf centrifūgas. Šūnas resuspendēja PBS, atšķaidīja 1:20 un saskaitīja Gorjajeva kamerā. Šūnu daudzumu 1 ml aprēķināja pēc formulas - šūnu skaits/16 (lodziņi) x 250000 x 20. Šūnas 1×10^6 100 μ l PBS ienesa 2ml stobriņos. Katram stobriņam, izņemot nekrāsotas kontroles šūnas, pievienoja 0.02 μ g/ μ l DAPI un inkubēja 5 min istabas temperatūrā, tumsā. Sekoja šūnu atmazgāšana PBS, centrifugējot 300 G 10 min uz 5810R Eppendorf centrifūgas. Tālāk sagatavoja antivielu kokteili: 2.5 μ l CD20 un 0.25 μ l CD3, un 47.25 μ l krāsošanas bufera (PBS + 1% BSA). Sagatavoto antivielu kokteili pievienoja šūnām un inkubēja 30 min tumsā, istabas temperatūrā. Pēc inkubācijas šūnas atmazgāja PBS, resuspendēja 500 μ l PBS un analizēja uz plūsmas citometra FACSAria (BD Bioscience). Plūsmas citometrijas datus ieguva izmantojot programmu BD FACSDiva™ 6.0 (BD Bioscience), kurā tika veikta arī automātiskā kompensācija. Iegūtos datus apstrādāja ar *FACS Express 6 Low Cytometry* programmatūru (De Novo Software, Inc., USA).

2.2.8. Citokīnu analīze

Citokīnu analīzei tika izmantota Luminex® 200™ sistēma un Milliplex MAP multipleksa reaģentu komplekts peļu citokīnu noteikšanai (Merk), kas ietvēra sekojošus citokīnus - IL-10, IL-2, IL-4, IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, IL-12p70, GM-CSF, TNF-a un IL17a. Analīze tika veikta saskaņā ar ražotāja specifikācijām. Visi standarti, kvalitātes kontroles un paraugi tika sagatavoti un izanalizēti divos eksemplāros. Rezultātus uzskatīja par derīgiem, ja katra atsevišķa citokīna analīzē lodīšu skaits paraugā bija > 35 un variācijas koeficients starp atkārtotiem mērījumiem bija < 30%.

2.2.9. Statistiskā analīze

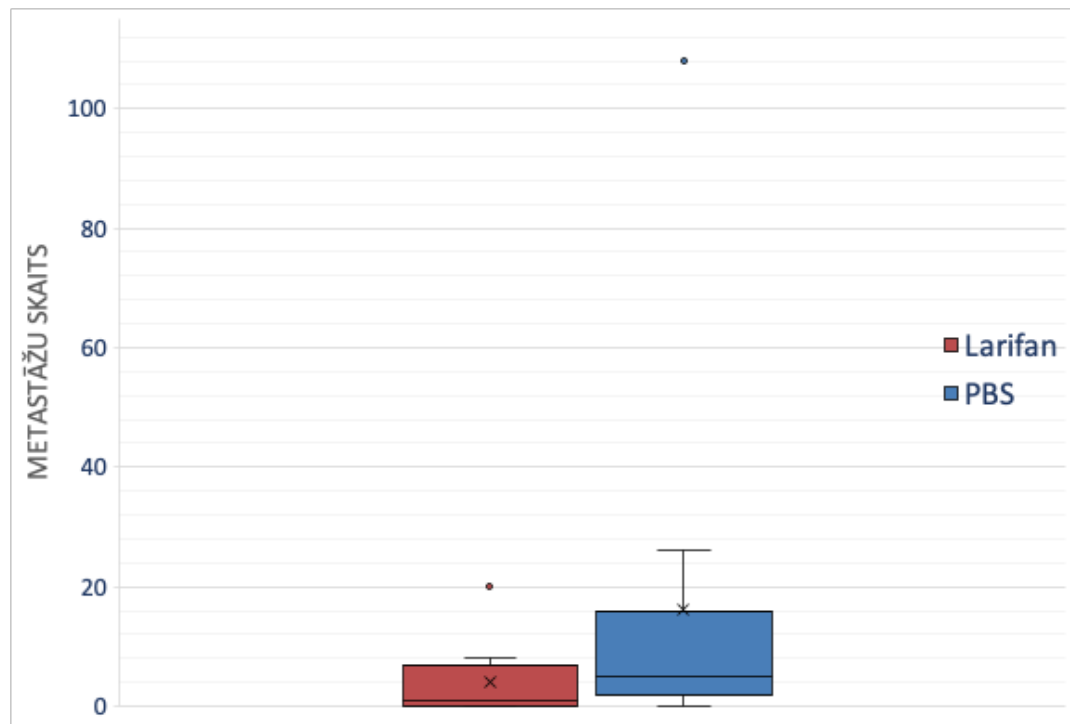
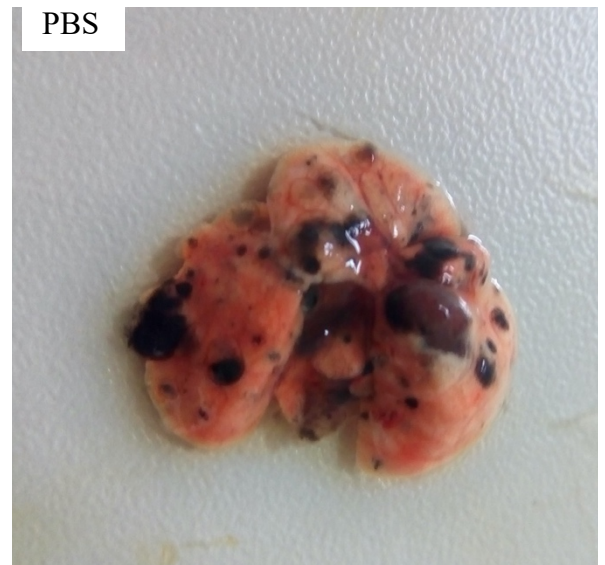
Statistisko analīzi metastāzēm, audzēju tilpumiem, nekrozēm, vaskularizācijai veica R programmā, izmantojot `t.test()` funkciju neatkarīgiem mainīgiem. Atšķirības starp divām grupām tika uzskatītas par būtiskām, ja P vērtība bija $< 0,05$.

3. REZULTĀTI

3.1. Larifan antimetastātiskais efekts

Larifan spēja kavēt metastāžu veidošanos tika pārbaudīta metastātiskajā B16 pelu melanomas modelī, kurā B16 melanomas šūnas pelēm tika ievadītas astes vēnā, tādējādi panākot metastāžu veidošanos specifiski peles plaušās (Ya *et al.*, 2016; Kabilova *et al.*, 2016). Pēc melanomas šūnu ievadīšanas peles eksperimentālajā grupā saņēma Larifan injekcijas intravenozi astes vēnā (10 µg/pele 100 µl PBS), sākot jau ar otro dienu pēc melanomas šūnu ievadīšanas un tālāk ik pa četrām dienām. Kopā piecas injekcijas attiecīgi 2., 6., 10., 14. un 18. dienā (2.3. attēls). Kontroles grupas peles attiecīgi saņēma 100 µl PBS. Divdesmit pirmajā dienā visas peles eitanazēja un saskaitīja plaušu metastāzes. Ar Larifan ārstētajās pelēs novēroja plaušu metastāžu skaita samazināšanos salīdzinājumā ar kontroles pelēm (3.1.attēls). Vidējais metastāžu skaits ar larifan ārstētajām pelēm bija 3.92 (±5.85). Savukārt kontroles pelēm vidējais metastāžu skaits bija 16.25 (± 29.95). Attiecīgi mediāna Larifan grupas pelēm bija 1, bet kontroles grupai – 5. Lai gan atšķirības bija acīmredzamas, tās nebija statistiski ticamas (p=0.158). Kā redzams 3.1. attēlā abās grupās bija arī “izlecēji”. Neiekļaujot “izlecējus” statistiskajā analīzē, atšķirības starp grupām sasniedza statistiskās ticamības robežu (p vērtību 0.04).

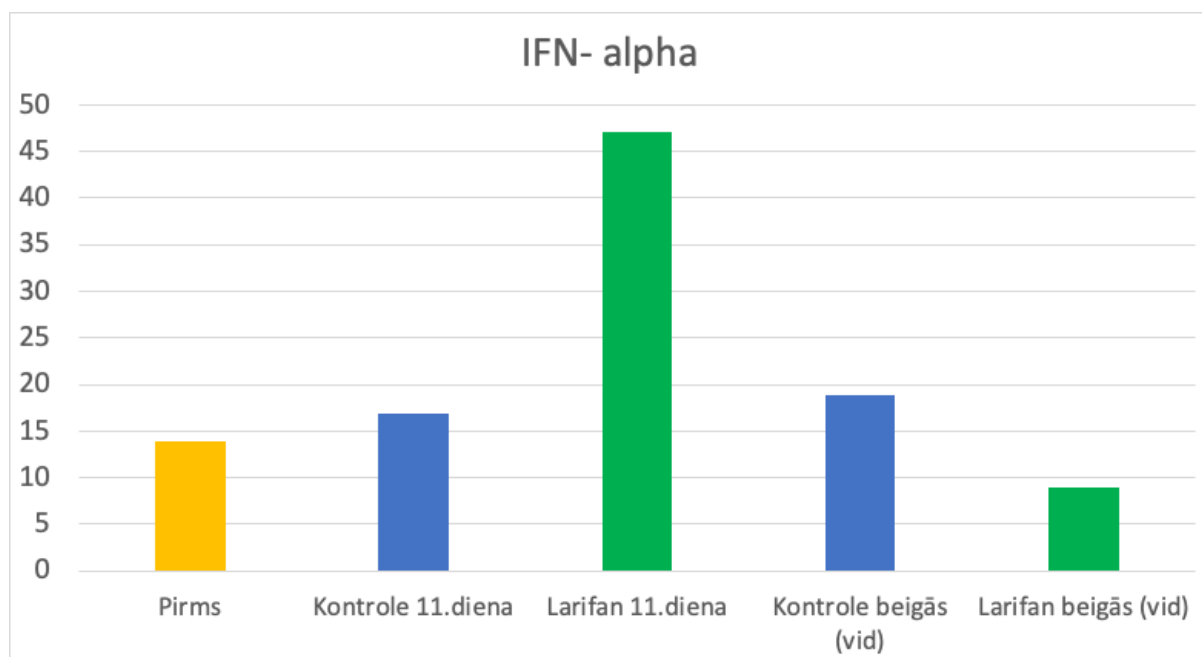
a



3.1. Attēls. Plaušu metastāzes ar Larifan ārstētajās pelēs un kontroles grupas pelēs: a – plaušu metastāžu vizualizācija ar Feketa šķīdumu; b - plaušu metastāžu skaits ārstētajās un kontroles pelēs.

Lai noskaidrotu iespējamo mehānismu metastāžu skaita samazinājumam Larifan ietekmē, tika veikta citokīnu analīze asinīs. Asins paraugi tika ievākti pirms terapijas, terapijas laikā (11. dienā) un terapijas beigās. Pirms terapijas un terapijas laikā ievāktie paraugi pirms analīzes tika apvienoti vienā paraugā. Pēc terapijas ņemtie paraugi tika analizēti katrs atsevišķi. Analizēti tika sekojoši citokīni: IL-10, IL-2, IL-4, IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, IL-12p70, GM-CSF,

TNF-a un IL17a. Būtiskas IL-10, IL-2, IL-4, IL-6, IFN-gamma, IL-12p70, GM-CSF, TNF-a un IL17a citokīnu izmaiņas netika konstatētas. Larifan grupas pelēm terapijas 11. dienā vienīgi pieauga IFN- α līmenis, salīdzinot ar kontroles grupu (3.2. Attēls).



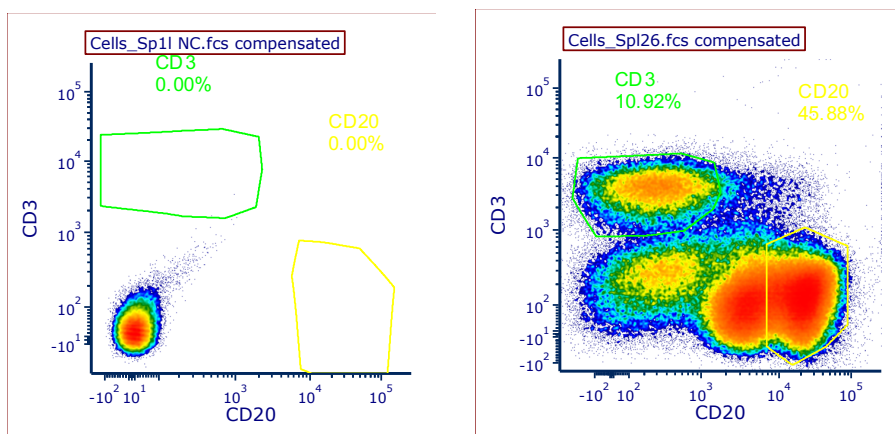
3.2. Attēls. IFN- α izmaiņas terapijas gaitā peļu B16 melanomas metastātiskajā modelī.

T un B limfocītu procentuālais sastāvs tika noteikts terapijas beigās liesā. T šūnu noteikšanai tika izmantots marķieris CD3, bet B šūnas tika noteiktas izmantojot CD20 marķieri. Būtiskas CD3⁺ un CD20⁺ šūnu atšķirības liesā starp metastātiskā modeļa dzīvniekiem, kas bija saņēmuši Larifan terapiju vai PBS netika novērotas (3.1. tabula).

3.1. tabula. CD3⁺ un CD20⁺ šūnu procentuālais sastāvs liesā metastātiskā modeļa pelēm.

Grupa	CD3 (%)	CD20 (%)
Larifan	10,08	42,51
PBS	11,29	46,65

B šūnu daudzums atbilda normai, kādu novēro peles liesā (parasti 45-50%), taču T šūnu daudzums bija samazināts (parasti 30-35%). Tipiskākā plūsmas citometrijas aina parādīta 3.3. attēlā.



3.3. attēls. CD3⁺ un CD20⁺ šūnu procentuālais sastāvs liesā terapijas beigās (representatīvs attēls): a, nekrāsotas šūnas; b, krāsotas šūnas.

Jāpiebilst, ka CD20 marķiera gadījumā diezgan skaidri iezīmējās divas šūnu subpopulācijas. Pelēs CD20 ir ekspresēts arī uz granulocītiem un monocītu/makrofāgu līnijas šūnām

(http://static.bdbiosciences.com/documents/BD_Reagents_CDMarkerMouse_Poster.pdf).

Acīmredzot vismaz daļa no detektētajām šūnām bija granulocīti vai monocīti/makrofāgi, kas apgrūtināja rezultātu interpretāciju.

3.2. Larifan ietekme uz primārajiem audzējiem

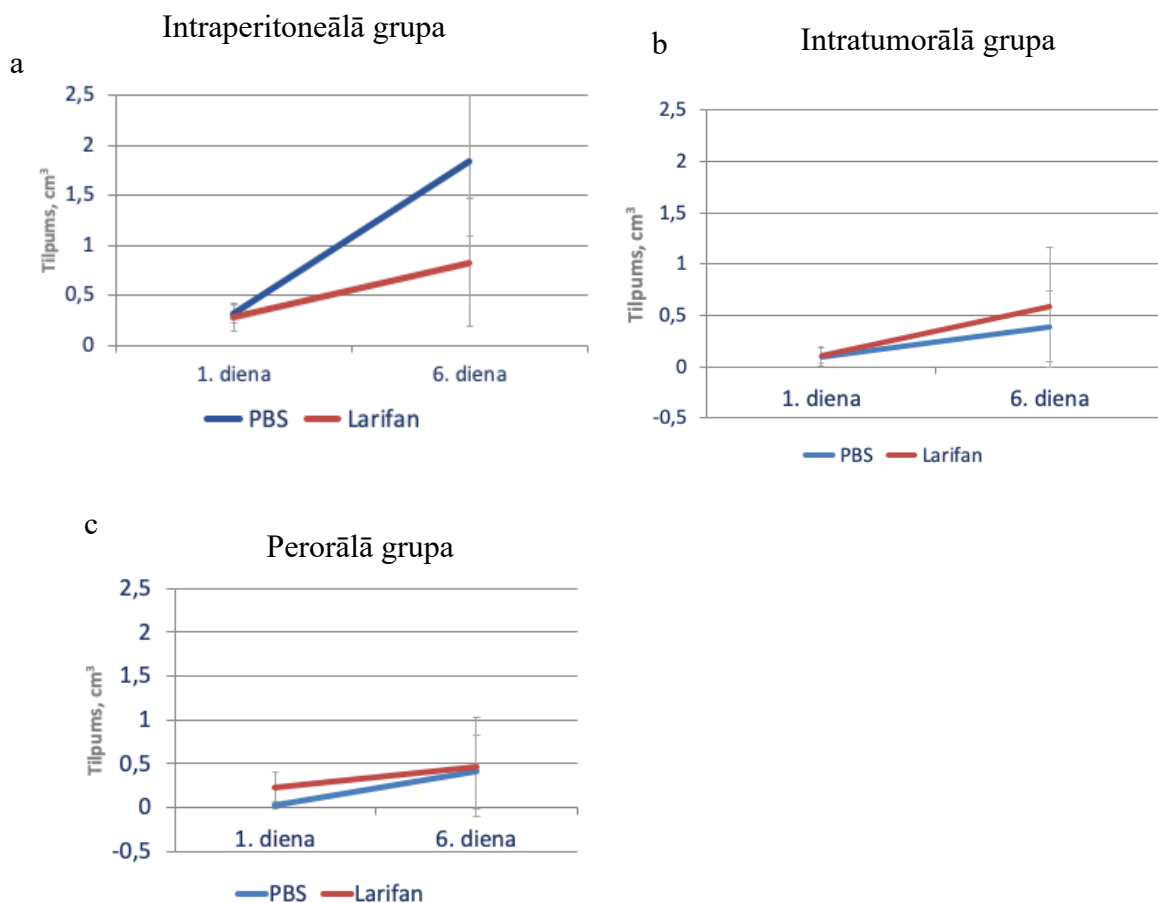
Primārās melanomas modelī katra pele saņēma 1.5×10^5 B16 melanomas šūnu injekciju subkutāni skausta rajonā. Audzēja attīstībai katrā pelē sekoja individuāli, un terapija tika uzsākta brīdī, kad bija izveidojies neliels palpējams veidojums. Terapijas laikā peles saņēma kopsummā trīs Larifan devas (katra 10 μg/pele) ar četru dienu intervālu, kuras atbilstoši grupai ievadīja i.t., i.p. vai perorāli. Dzīvnieku skaits pa grupām attēlots 3.2. tabulā.

3.2. tabula. Dzīvnieku sadalījums pa grupām primārās melanomas modelī un nekrožu skaits.

Terapijas veids	Grupa	Dzīvnieku skaits	Nekrozes (%)	Dzīvnieku skaits bez nekrozēm
Intratumorāla ievadišana	Larifan	13	5 (38.5)	8
	PBS	8	2 (25.0)	6
Intraperitoneāla ievadišana	Larifan	8	2 (25.0)	6
	PBS	3	0 (0.0)	3
Perorāla ievadišana	Larifan	6	1 (16.7)	5
	PBS	6	1 (16.7)	5

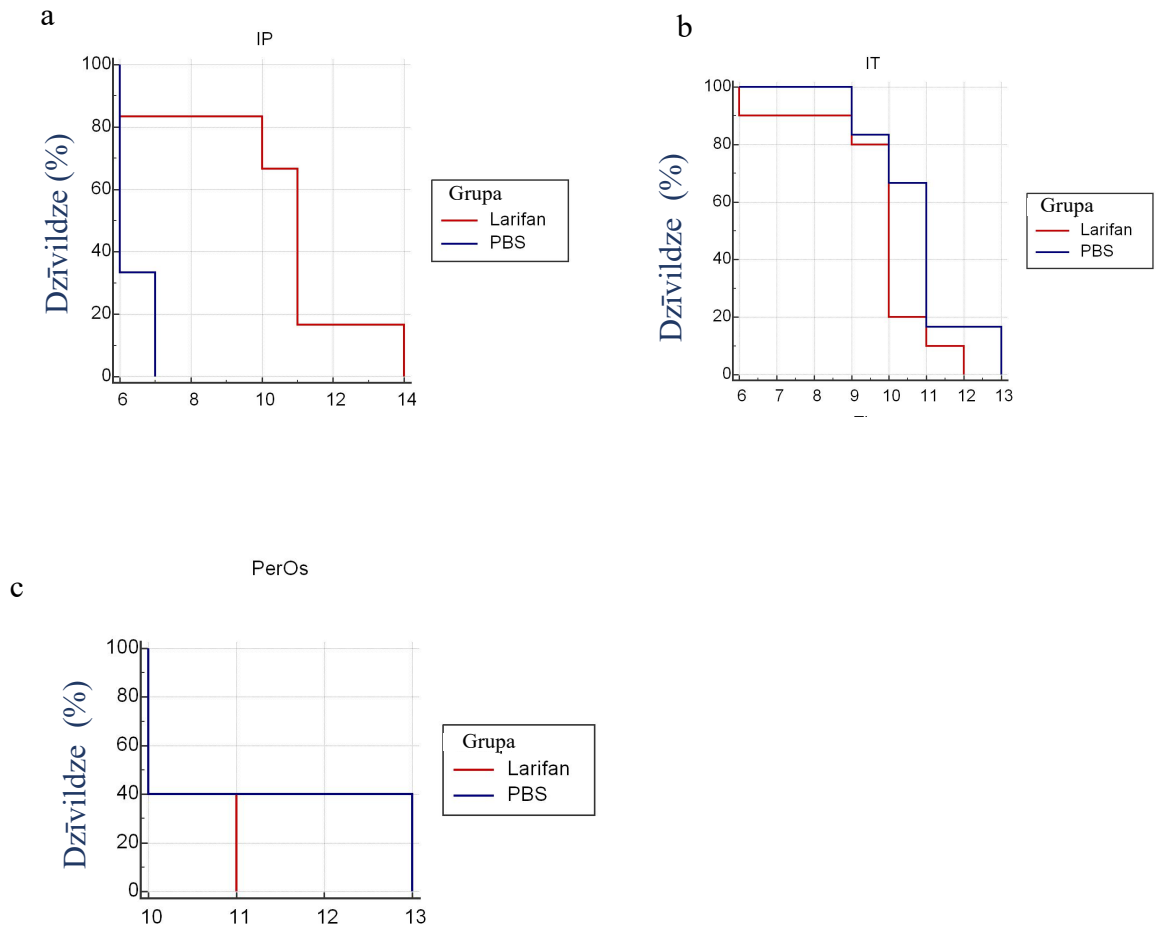
Eksperimenta gaitā tika novērota nekrožu attīstība gandrīz visās grupās neatkarīgi no terapijas veida (3.2. tabula). Literatūrā B16 melanomas modeļa kontekstā ir aprakstīti nekrotisku perēkļu veidošanās gadījumi, taču parasti tas notiek audzējam sasniedzot vismaz 1 cm³ tilpumā (Overwijk and Restifo 2001). Mūsu eksperimentā nekrotiskie procesi sākās ievērojami agrāk. Zīmīgi, ka 8 no 11 dzīvniekiem (72.7%), kuriem attīstījās nekroze, bija saņēmuši Larifan, un tikai 3 no 11 dzīvniekiem (27.3%) bija saņēmuši PBS. Vislielākais nekrožu skaits tika novērots Larifan grupā, kur Larifan tika ievadīts i.t.. Atšķirības starp Larifan un kontroles grupu bija novērojamas arī i.p. ievadīšanas grupā, savukārt perorālās ievadīšanas grupā atšķirības nebija novērojamas (3.2. tabula).

Analizējot audzēja dinamiku bija redzams, ka Larifan ievadīšana i.p. kavēja audzēja attīstību salīdzinot ar kontroles grupu (3.4. a attēls). Līdzīga ietekme netika novērota grupā, kurā Larifan tika ievadīts i.t.. Gluži pretēji tika novērots neliels audzēja tilpuma pieaugums (3.4. b attēls). Savukārt perorālās terapijas gadījumā atšķīrās audzēju tilpumi starp Larifan un kontroles grupām. Uzsākot terapiju Larifan grupā, audzēju tilpumi bija lielāki nekā kontroles grupā. Taču laika gaitā tie izlīdzinājās (3.4. c attēls).



3.4. Attēls. Audzēju dinamika laikā: a, intraperitoneālā grupa; b, intratumorālā grupa; c, perorālā grupa.

No dzīvildzes analīzes tika izslēgtas peles, kurām bija attīstījusies nekroze. Analīzē iekļauto dzīvnieku skaits redzams 3.2. tabulā, ailē “dzīvnieku skaits bez nekrozēm”. Atšķirības dzīvildzē starp Larifan un kontroles pelēm bija novērojamas vienīgi i.p. ievadīšanas gadījumā (3.5. attēls).



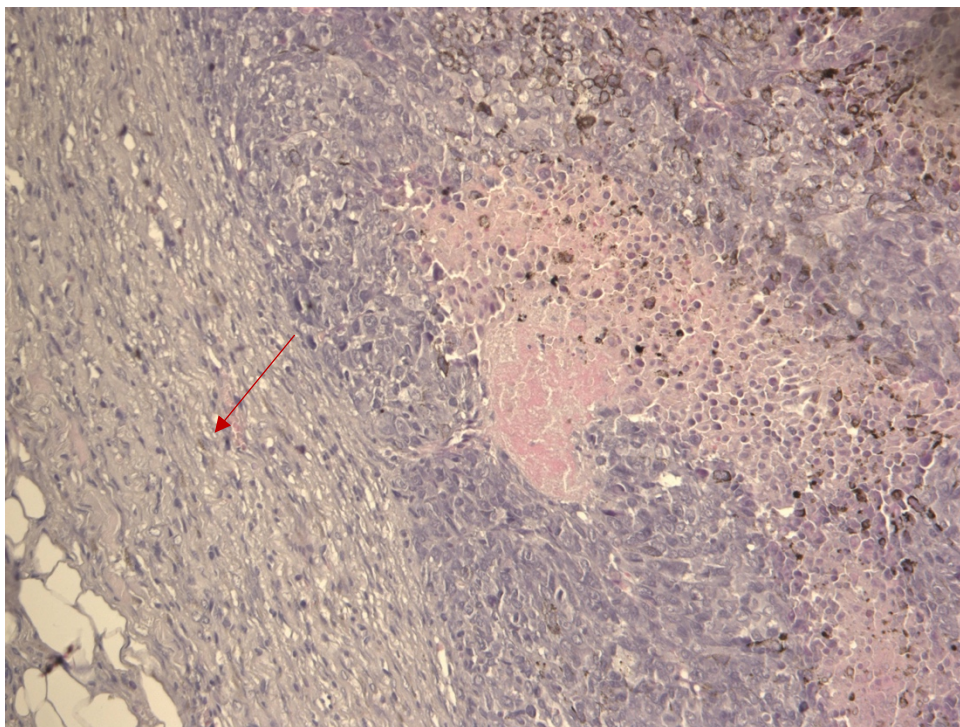
3.5. Attēls. Peļu dzīvildze: a, intraperitoneālā grupa (IP); b, intratumorālā grupa (IT); c, perorālā grupa (PerOs).

Līdzīgi kā iepriekš tika izanalizēti arī citokīni asinīs. Proti, asins paraugi tika ievākti pirms terapijas, terapijas laikā (6. dienā) un terapijas beigās. Pirms terapijas un terapijas laikā ievāktie paraugi pirms analīzes tika apvienoti vienā paraugā. Pēc terapijas ņemtie paraugi tika analizēti katrs atsevišķi. Būtiskas izmaiņas citokīnu līmeņos, t.sk. IFN- α līmenī, netika konstatētas.

Izanalizēts tika arī T un B šūnu procentuālais sastāvs liesā terapijas beigās. Līdzīgi kā iepriekš būtiskas CD3⁺ un CD20⁺ šūnu atšķirības liesā starp dzīvniekiem, kas bija saņēmuši Larifan terapiju vai PBS netika novērotas.

3.3. Primāro audzēja novērtējums

Visi primārie audzēji, pirmkārt, tika analizēti mikroskopiski. Interesanti, ka ap primārajām melanomām tika konstatēta saistaudu kapsula (3.6. attēls).



3.6. Attēls. Saistaudu kapsula (bulta) ap primāro audzēju. 200x palielinājums.

Ņemot vērā novērotos nekrotiskos procesus audzējos, visos audzējos mikroskopiski tika analizētas arī nekrozes. Visplašākās nekrozes bija novērojamas i.p. grupā. Turklāt mikroskopiskā līmenī tās bija novērojamas gan Larifan grupā, gan arī kontroles grupā, lai gan makroskopiski kontroles grupā tās nebija izpaudušās. Turklāt kontroles grupā tās pat bija plašākas (3.3. tabula). Iespējams to varēja ietekmēt audzēju lielumi. Kā var redzēt 3.3.attēlā, salīdzinot ar pārējām terapijas un kontroles grupām, audzēji i.p. kontroles grupai bija lielāki. Savukārt i.t. un perorālās terapijas grupās plašākas nekrozes bija novērojamas tieši Larifan gadījumā (3.3. tabula). Nedaudz lielāka vaskularizācija tika novērota pie Larifan terapijas, kaut gan atšķirības starp grupām nevienā gadījumā nebija statistiski ticamas (3.3. tabula).

3.3.Tabula. Mikroskopiskais audzēja novērtējums.

	Terapijas veids								
	i.p.			i.t.			Perorāla terapija		
	Larifan	PBS	p - vērtība	Larifan	PBS	p - vērtība	Larifan	PBS	p - vērtība
Kapsula	ir	ir		ir	ir		ir	ir	
Nekrozes (%)	33,04	38,31	0,65	20,18	16,29	0,52	29,29	22,29	0,54
Vaskularizācija, vidējais asinsvadu daudzums redzeslaukā (±SD)	2,82 (±2,05)	2,03 (±0,39)	0,48	2,08 (±1,12)	1,28 (±0,60)	0,22	2,49 (±1,32)	2,31 (±1,00)	0,83

i.p. – intraperitoneāla ievadīšana, i.t. – intratumorāla ievadīšana, SD – standartnovirze.

3.4. Mikrometastāžu novērtējums primārās melanomas modelī

Primārās melanomas modelī tika izvērtēta arī mikrometastāžu klātbūtne plaušās, liesā un aknās. Metastāzes aknās nenovēroja. Mikrometastāžu skaits liesā un plaušās ir apkopots 3.4. tabulā. Mikrometastāzes plaušās un liesā bija novērojamas praktiski visos paraugos neatkarīgi no terapijas un to skaits bija vai nu vienāds, vai nedaudz samazināts Larifan terapijas gadījumā (3.4. tabula).

3.4. tabula. Mikrometastāžu skaits plaušās un liesā primārās melanomas modelī*.

Orgāns	Terapijas veids					
	i.p.		i.t.		Perorāla terapija	
	Larifan	PBS	Larifan	PBS	Larifan	PBS
Liesa	3	3	3	3	2	3
Plaušas	1	2	1	2	1	2

i.p. – intraperitoneāla ievadīšana, i.t. – intratumorāla ievadīšana, SD – standartnovirze;

* - metastāzes vērtētas ievērojot skalu: 1 - metastāzes bija atrodamas vienā vietā un nelielā skaitā, 2 - metastāzes bija atrodamas vairākās vietās nelielā skaitā, 3 - metastāzes bija atrodamas vairākās vietās lielā skaitā un 4 - metastāžu skaits paraugā bija ļoti liels;

4. DISKUSIJA

Kā jau minēts, Larifan ir bakteriofāga izcelsmes dsRNS, kas tiek iegūta biotehnoloģiskā ceļā no ar bakteriofāgu inficētām *E. Coli* šūnām. Larifan ir pazīstama ar tās spēju inducēt IFN α un tiek veiksmīgi pielietota kā pretvīrusu līdzeklis klīnikā ar retām blakusparādībām (Loža and Feldmane, 1996). Kā zināms, dsRNS ir TLR3 agonists (Starkhammar *et al.*, 2012). Sintētiskās dsRNS, tādas kā poly(I:C) un tās analogi, jau ilgu laiku tiek pētītas gan kā potenciāli preparāti pretaudzēju terapijā, gan kā vakcīnu adjuvantu (Hafner *et al.*, Zaks *et al.*, 2006). Turklāt tām ir parādīta spēja inducēt apoptozi un kavēt metastāžu veidošanos (Cheng *et al.*, 2010; Hirabayashi *et al.*, 1999; Palchetti *et al.*, 2015). Ir arī pētījumi, kuros novēro sintētisko dsRNS, poly (I:C) un CpG-oligonukleotīda 1826, attiecīgi TLR3 un TLR9 antogonistu, spēju aktivēt adaptīvās T šūnas melanomas peļu modelī (Amos *et al.*, 2011). Uzsākot doto eksperimentu, tika sagaidīts, ka tāpat kā citu dsRNS gadījumā, pielietojot Larifan kā pret-audzēju terapiju, tiks novērota Larifan ietekme uz audzēju. Proti, primārās melanomas gadījumā audzējs reducēsies, bet metastātiskās melanomas gadījumā samazināsies melanomas plaušu metastāžu skaits.

Peles, kā eksperimentālie dzīvnieki šim pētījumam, tika izvēlētas kā filoģenētiski zemākā suga, kas pieļauj cilvēka imūn-fizioloģisku procesu/apstākļu atdarināšanu *in vivo*. Bez tam šis, uz B16 audzēju balstītais, kancerogēneses modelis C57BL/6 laboratorijas pelēs ir labi zināms, un ir izpētīti daudzi ar kancerogēnēzi un imūnās atbildes reakciju saistītie aspekti (Overwijk *et al.*, 2001; Kabilova *et al.*, 2016; Gatti *et al.*, 2013, Amos *et al.*, 2011).

Šajā pētījumā izveidojot divus melanomas peļu modeļus, subkutānās jeb primārās melanomas modeli un metastātiskās melanomas modeli, tika parādīta Larifan ietekme uz audzēju un tā metastāzēm. Metastātiskas melanomas modelī galvenais mērķis bija noskaidrot Larifan spēju kavēt metastāžu veidošanos plaušās.

Eksperiments parādīja, ka Larifan piemīt sistēmiska darbība (injicēja vēnā un efekts izpaudās plaušās), un ka tas kavē plaušu metastāžu attīstīšanos B16 melanomas modelī, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem, kas saņēma PBS injekcijas. Ir jāpiemin, ka dzīvniekiem, kuri bija saņēmuši Larifan injekcijas pieauga IFN- α koncentrācija plazmā. Tas sakrīt, pirmkārt, ar literatūrā aprakstītām Larifan īpašībām inducēt IFN α (Loža and Feldmane, 1996, Veinalde *et al.*, 2013, Pjanova *et al.*, 2019) un, otrkārt, norāda, ka Larifan iespējamā pretaudzēju darbība realizējas caur IFN sistēmu. Līdzīgi poly (I:C) pretaudzēju darbībā ir saistīta ar IFN sistēma (Longhi *et al.*, 2009). I tipa IFN α ir pazīstami arī ar spēju modificēt šūnas ciklu (Murata *et al.*, 2006). Tie uzrāda inhibējošu efektu G1–S fāžu pārejā un, kā arī bija parādīts pētījumā par hepatocelulāro karcinomu, IFN- α kavē S šūnas fāzi (Murata *et al.*, 2006). Tāpat ir parādīts, ka IFN- α inducē apoptozi hepatocelulāras karcinomas šūnu līnijās (Murata *et al.*, 2006). Pie tam ir minēts, ka IFN- α palielināja HLA I klases molekulu ekspresiju

uz HCC šūnu līnijām, un I tipa IFN imūnmodulējošā iedarbība notika, pastiprinot HLA I klases molekulu ekspresiju uz šūnu virsmas, aktivizējot CD8⁺ citotoksiskos T limfocītus, NK šūnas un dendrītiskās šūnas (Murata *et al.*, 2006). Arī IFN- γ ir svarīga loma audzēju attīstības kontrolē un pret-audzēju imūnās atbildes aktivizēšanā, nodrošinot tiešu pret-audzēju darbību, kavējot angiogēnēzi un vēža šūnu augšanu, kā arī sensibilizējot vēža šūnas pret apoptozi un nodrošinot T šūnu un makrofāgu aktivizēšanu. Līdzīgi ir arī parādīts, ka IFN- γ , tapāt kā I tipa IFN var mijiedarboties ar TLR agonistiem makrofāgu indukcijā (Müller *et al.*, 2018). Ir arī svarīgi, ka NK šūnas ātri tiek rekrutētas limfmezglos un liesas baltajā pulpā pēc stimulācijas ar nobriedušām dendrītiskajām šūnām un, piemēram, poly (I:C) (Longhi *et al.*, 2008).

Kopumā, iegūtie metastātiskā modeļa rezultāti apstiprina hipotēzi, ka Larifan ietekmē melanomas metastazēšanos plaušās, samazinot metastāžu skaitu pelēm.

Primāra melanomas modelī mērķis bija noskaidrot Larifan terapijas ietekmi uz primārā audzēja augšanu atkarībā no Larifan ievadīšanas veida, kā arī Larifan ietekmi uz audzēja izplatīšanos. Lai izvērtētu, kādā ievadīšanas veidā Larifan terapija strādā labāk, bija izveidotas 3 dzīvnieku terapijas apakšgrupas – intraperitoneālā, intratumorālā un perorālā grupa. Attiecīgi kontroles grupas arī bija 3, un tām ievadīja PBS tādā pašā veidā, kā terapijas grupās. Lai gan eksperimenta gaitā peļu audzēji tika mērīti katru otro dienu, analīzei derīgas izrādījās tikai 1. un 6. dienas (vispilnīgākie rezultāti), kas arī tika iekļautas analīzē. Atšķirības starp audzēja augšanu tika novērotas vienīgi intraperitoneālajā grupā, kur Larifan terapiju saņēmušajām pelēm bija novērota lēnāka audzēja augšana. Arī perorālās terapijas grupā bija novērotas nelielas atšķirības starp Larifan terapiju saņēmušajām pelēm un kontroles pelēm. Tāpat kā intraperitoneālajā grupā arī šajā gadījumā audzēja augšana Larifan terapijas grupas pelēm bija lēnāka, kaut gan sākotnējie audzēju izmēri bija lielāki. Zīmīgi, ka arī šeit Larifan darbība visticamāk izpaudās sistēmiski. Savukārt Larifan ievadīšana tieši audzēja (intratumorāli) gaidīto efektu nedeva un atšķirības pat nelielas starp Larifan un kontroles grupu nebija redzamas. Audzēja dinamika, vismaz intraperitoneālās ievadīšanas grupā, korelēja arī ar peļu dzīvildzes analīzi. Šajā grupā Larifan grupas pelēm dzīvildze bija labāka nekā kontroles dzīvniekiem. Iegūtie rezultāti par audzēju augšanu un peļu dzīvildze parāda, ka Larifan iedarbība visdrīzāk ir sistēmiska.

Interesants novērojums bija nekrožu attīstīšanās. Literatūrā B16 melanomas modeļa kontekstā ir aprakstīti nekrotisku perēkļu veidošanās gadījumi, taču parasti tas notiek audzējam sasniedzot vismaz 1 cm³ tilpumā (Overwijk and Restifo 2001). Mūsu eksperimentā nekrotiskie procesi sākās ievērojami agrāk vēl pie audzēju tilpuma 0,17 cm³. Tas pamudināja izvērtēt nekrotiskos procesus arī mikroskopiski. Intraperitoneālajā grupā plašākas nekrozes bija novērojamas kontroles grupas pelēm, kuras bija saņēmušas PBS injekcijas. Taču šīs grupas

pelēm bija arī vislielākie audzēji pēc tilpuma un šajā gadījumā to būtu iespējams arī skaidrot ar audzēja izmēru. Savukārt intratumorālās un perorālās ievadišanas grupās plašākās nekrozes bija tieši Larifan saņēmušajām pelēm. Ja perorālās grupas pelēm šīs atšķirības varētu būt gadījuma rakstura, tad intratumorālās ievadišanas grupā tās varētu būt arī likumsakarīgas. Nesenie atklājumi ir parādījuši, ka arī šūnu bojāejā nekrozes ceļā tiek realizēta caur noteiktiem šūnas signālceļiem, kur centrālo lomu spēlē RIP1–RIP3–MLKL komplekss, kas pārnes signālus no šūnas “nāves” un citiem receptoriem, t.sk. *Toll Like* receptoriem (TLR) un TLR3 (dsRNS receptors) uz efektormolekulām, kas tālāk izraisa šūnu bojāeju (Dhuriya and Sharma 2018). Līdz ar to pastāv uzskats, ka programmēto nekrozi jeb nekroptozī var mērķtiecīgi pielietot audzēju terapijā. Tā ir joma, kas šobrīd tiek intensīvi pētīta.

Literatūrā ir norādes ka pastāv saistība starp melanomas progresēšanu un angiogēnēzi. Ir novērota pakāpeniska vaskularizācijas palielināšanās audzējam progresējot un sasniedzot melanomas vertikālās augšanas fāzi (Mabeta *et al.*, 2020, Marcoval *et al.*, 1997). Arī šajā pētījumā tika izvērtēta audzēja vaskularizācija un novērota angiogēnēzes palielināšanās, taču būtiskas atšķirības starp dažādām grupām netika novērotas. Tāpat primārās melanomas modelī turpinājās arī melanomas progresija neatkarīgi no grupas, ko parādīja mikrometastāžu analīze iekšējos orgānos (plaušas, liesa). Mikrometastāžu skaita samazinājums Larifan ietekmē nebija nozīmīgs.

Attiecībā uz kapsulu, ko novēroja ap audzējiem primārā modeļa pelēm, viss nav tik viennozīmīgi. Šajā pētījumā visiem apskatītiem peļu melanomas paraugiem bija novērota kapsula. Tā atdalīja audzēja audus no peļu organisma audiem. Ir pētījums, kurā melanomas peļu modeļos ap audzēju arī bija novērota tā saucamā pseido-kapsula (Villaverde *et al.*, 2014). Pie tam viņi novēroja, saistību starp pielietotajām terapijām un kapsulas biezumu. Piemēram, kontroles grupas pelēm kapsula bija novērota tikai 1 no 8 pelēm, pie tam tā bija nepilnīga. Pētījuma autori uzskatīja, kā pseido-kapsula ir saistīta ar ievērojamo imūno reakciju, kas liecina par saikni starp šo struktūru un vietējo imūno atbildi (Villaverde *et al.*, 2014). Bet iespējams iemesls kapsulas veidošanās procesam kontroles pelē bija agrīna pret-audzēja imūnā atbilde konkrētajā pelē. Turklāt pētījumos ar sarkomām ir parādīts, ka novērotā pseido-kapsula bija vairāk nepārtraukta, biezākā un labāk attīstīta audzējos, kas reaģēja uz terapiju (Villaverde *et al.*, 2014, O'Donnell *et al.*, 2014, Gitelis *et al.*, 1989). Lai noskaidrotu, vai pastāv atšķirības starp terapijas grupām un kontroles grupām šajā pētījumā, paraugiem papildus ir jānovērtē kapsulas biezums. Šī punkta izpilde varētu ievest lielāku skaidrību gan kapsulas esamībā mūsu pētījuma pelēm, gan iegūtiem rezultātiem. No otras puses, ksenogēnajā šūnu transplantācijā ir metode, pie kuras, subkutāni ievadot peļu organismā poliakrilamīda gēlu, pēc 6-8 nedēļām veidojas vaskularizētā saistaudu kapsula, kurā iekšā ievada transplantējamās šūnas. Šī kapsula

pasargā transplantētās audzēja šūnas no ātras eliminācijas ar peļu imūnkompetentajām šūnām (Москалева *u dp.*, 2006). Šajā pētījumā tāda metode nebija pielietota, taču tāda kapsulas funkcija varētu izskaidrot, kāpēc primārā melanomas modeļa iznākums atšķirās no izvirzītās hipotēzes, ka audzēju augšana samazināsies un audzēji reducēsies.

Nesenie pētījumi ir parādījuši arī pret-audzēja efektu pielietojot TLR agonistu kombināciju kopā ar anti-CTLA-4 terapiju (Caisová *et al.*, 2018). Tā kā rezultāti parādīja, ka Larifan terapija kavē plaušu metastāžu veidošanos B16 peļu melanomas modelī, bet pielietojot Larifan kā monoterapiju, ievērojamas ietekmes uz primāro audzēju nebija, tālākajos pētījumos būtu svāriģi pārbaudīt Larifan darbību kombinācijā ar citiem imūnterapijas līdzekļiem.

5. SECINĀJUMI

Larifan terapija kavē plaušu metastāžu veidošanos B16 peļu melanomas modelī; terapiju saņēmušajiem dzīvniekiem plaušu metastāžu skaits bija mazāks nekā kontroles dzīvniekiem.

Larifan terapijas ietekmē pieaug IFN- α koncentrācija dzīvnieku asinīs, norādot ka Larifan pretaudzēju darbība realizējas caur IFN sistēmu.

Primārās melanomas modelī ap audzēju veidojās saistaudu kapsula, kas varēja ietekmēt terapijas iznākumu šajā modelī.

Salīdzinot dažādus Larifan ievadīšanas veidus primārās melanomas modelī, labākie rezultāti iegūti Larifan ievadot intraperitoneāli.

6. PATEICĪBAS

Dacei Pjanovai par iespēju izstrādāt maģistra darbu, par darba vadīšanu, par palīdzību un ieteikumiem gan laboratorijas darbā, gan maģistra darba rakstīšanā. Dacei Skrastiņai par palīdzību darbā ar pelēm. Zanei Simsonai par darbu ar pelēm. Regīnai Kleinai par padomiem attiecībā uz audu morfoloģiju un histopatoloģiju. Jurim Jansonam par palīdzību ar plūsmas citometru.

7. LITERATŪRAS SARAKSTS

- 1) Kabilova, T. O., Sen'kova, A. V., Nikolin, V. P., Popova, N. A., Zenkova, M. A., Vlassov, V. V., & Chernolovskaya, E. L. (2016). Antitumor and Antimetastatic Effect of Small Immunostimulatory RNA against B16 Melanoma in Mice. *PloS One*, *11*(3), e0150751–e0150751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150751>
- 2) Karaman, S., & Alitalo, K. (2017). Midkine and Melanoma Metastasis: A Malevolent Mix. *Developmental Cell*, *42*(3), 205–207. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.015>
- 3) Sommariva, A., Forsea, A.-M., Agius, D., Ascierto, P. A., Bastiaannet, E., Borgognoni, L., Demetriou, A., Garbe, C., Gavric, Z., Hocevar, M., Innos, K., Larønningen, S., Louwman, M., Robsahm, T. E., Rutkowski, P., van Akkooi, A., Zorzi, M., Pasquali, S., van de Velde, C., & Rossi, C. R. (2018). Quality assurance in melanoma care: The EU-MELACARE study. *European Journal of Surgical Oncology : The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, *44*(11), 1773–1778. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.06.020>
- 4) Liu, Q., Das, M., Liu, Y., & Huang, L. (2018). Targeted drug delivery to melanoma. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *127*, 208–221. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.016>
- 5) Haanen, J. B. A. G. (2013). Immunotherapy of melanoma. *EJC Supplements : EJC : Official Journal of EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer ... [et Al.]*, *11*(2), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.013>
- 6) Zhao, J., Zhang, Z., Xue, Y., Wang, G., Cheng, Y., Pan, Y., Zhao, S., & Hou, Y. (2018). Anti-tumor macrophages activated by ferumoxylol combined or surface-functionalized with the TLR3 agonist poly (I : C) promote melanoma regression. *Theranostics*, *8*(22), 6307–6321. <https://doi.org/10.7150/thno.29746>
- 7) Ammi, R., De Waele, J., Willemen, Y., Van Brussel, I., Schrijvers, D. M., Lion, E., & Smits, E. L. J. (2015). Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: Knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacology and Therapeutics*, *146*, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.010>
- 8) Loža V. & Feldmane G. (1996) Biomodulatory functions of double-stranded ribonucleic acids. *Acta Mecica Balt.* *3*, 12–17.
- 9) Vilgelm, A. E., Johnson, D. B., & Richmond, A. (2016). Combinatorial approach to cancer immunotherapy: strength in numbers. *Journal of Leukocyte Biology*, *100*(2), 275–290. <https://doi.org/10.1189/jlb.5RI0116-013RR>

- 10) Bell, J. K., Askins, J., Hall, P. R., Davies, D. R., & Segal, D. M. (2006). The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(23), 8792–8797.
- 11) Veinalde, R., Ozola, A., Azarjana, K., Molven, A., Akslen, L. A., Donina, S., Proboka, G., Cema, I., Baginskis, A., & Pjanova, D. (2013). Analysis of Latvian familial melanoma patients shows novel variants in the noncoding regions of CDKN2A and that the CDK4 mutation R24H is a founder mutation. *Melanoma Research*, *23*(3).
https://journals.lww.com/melanomaresearch/Fulltext/2013/06000/Analysis_of_Latvian_familial_melanoma_patients.9.aspx
- 12) Pjanova, D., Mandrika, L., Petrovska, R., Vaivode, K., & Donina, S. (2019). Comparison of the effects of bacteriophage-derived dsRNA and poly(I:C) on ex vivo cultivated peripheral blood mononuclear cells. *Immunology Letters*, *212*(June), 114–119.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.06.010>
- 13) Ya, Z., Hailemichael, Y., Overwijk, W., & Restifo, N. P. (2015). Mouse model for pre-clinical study of human cancer immunotherapy. *Current Protocols in Immunology*, *108*, 20.1.1-20.1.43. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2001s108>
- 14) Overwijk, W. W., & Restifo, N. P. (2001). B16 as a mouse model for human melanoma. *Current Protocols in Immunology*, Chapter 20, Unit 20.1.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im2001s39>
- 15) Hafner, A. M., Corthésy, B., & Merkle, H. P. (2013). Particulate formulations for the delivery of poly(I:C) as vaccine adjuvant. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(10), 1386–1399. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.013>
- 16) Zaks, K., Jordan, M., Guth, A., Sellins, K., Kedl, R., Izzo, A., Bosio, C., & Dow, S. (2006). Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *176*(12), 7335–7345. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7335>
- 17) Cheng, Y., & Xu, F. (2010). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*, *10*(12), 1219–1223. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.12.13450>
- 18) Hirabayashi, K., Yano, J., Inoue, T., Yamaguchi, T., Tanigawara, K., Smyth, G. E., Ishiyama, K., Ohgi, T., Kimura, K., & Irimura, T. (1999). Inhibition of cancer cell growth by polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome complex: a new biological activity. *Cancer Research*, *59*(17), 4325–4333.
- 19) Palchetti, S., Starace, D., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E., & Riccioli, A. (2015). Transfected poly(I:C) activates different dsRNA receptors, leading to apoptosis or immunoadjuvant response in androgen-independent prostate cancer cells. *The Journal of*

Biological Chemistry, 290(9), 5470–5483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.601625>

20) Amos, S. M., Pegram, H. J., Westwood, J. A., John, L. B., Devaud, C., Clarke, C. J., Restifo, N. P., Smyth, M. J., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2011). Adoptive immunotherapy combined with intratumoral TLR agonist delivery eradicates established melanoma in mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 60(5), 671–683.

<https://doi.org/10.1007/s00262-011-0984-8>

21) Gatti, G., Nuñez, N. G., Nocera, D. A., Dejager, L., Libert, C., Giraudo, C., & Maccioni, M. (2013). Direct effect of dsRNA mimetics on cancer cells induces endogenous IFN- β production capable of improving dendritic cell function. *European Journal of Immunology*, 43(7), 1849–1861. <https://doi.org/10.1002/eji.201242902>

22) Müller, E., Speth, M., Christopoulos, P. F., Lunde, A., Avdagic, A., Øynebråten, I., & Corthay, A. (2018). Both Type I and Type II Interferons Can Activate Antitumor M1 Macrophages When Combined With TLR Stimulation. *Frontiers in Immunology*, 9, 2520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02520>

23) Dhuriya, Y. K., & Sharma, D. (2018). Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 199.

<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1235-0>

24) Caisová, V., Uher, O., Nedbalová, P., Jochmanová, I., Kvardová, K., Masáková, K., Krejčová, G., Paďouková, L., Chmelař, J., Kopecký, J., & Ženka, J. (2018). Effective cancer immunotherapy based on combination of TLR agonists with stimulation of phagocytosis. *International Immunopharmacology*, 59, 86–96.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.038>

25) Ko, J. S. (2017). The Immunology of Melanoma. *Clinics in Laboratory Medicine*, 37(3), 449–471. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.06.001>

26) Kozar, I., Margue, C., Rothengatter, S., Haan, C., & Kreis, S. (2019). Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1871(2), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.02.002>

27) Haanen, J. B. A. G. (2013). Immunotherapy of melanoma. *EJC Supplements : EJC : Official Journal of EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer ... [et Al.]*, 11(2), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.013>

28) Adams, S. (2009). Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy*, 1(6), 949–964. <https://doi.org/10.2217/imt.09.70>

29) Mabetta, P. (2020). Paradigms of vascularization in melanoma: Clinical significance and potential for therapeutic targeting. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 127, 110135.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110135>

30) Starkhammar, M., Kumlien Georén, S., Swedin, L., Dahlén, S.-E., Adner, M., & Cardell, L. O. (2012). Intranasal administration of poly(I:C) and LPS in BALB/c mice induces airway hyperresponsiveness and inflammation via different pathways. *PLoS One*, 7(2), e32110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032110>

31) Marcoval, J., Moreno, A., Graells, J., Vidal, A., Escribà, J. M., Garcia-Ramírez, M., & Fabra, A. (1997). Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. *Journal of Cutaneous Pathology*, 24(4), 212–218. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1997.tb01583.x>

32) Franklin, C., Livingstone, E., Roesch, A., Schilling, B., & Schadendorf, D. (2017). Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *European Journal of Surgical Oncology : The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 43(3), 604–611.

<https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.07.145>

33) Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

34) Saleh, J. (2018). Murine models of melanoma. *Pathology, Research and Practice*, 214(9), 1235–1238. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.07.008>

35) Taefehshokr, N., Baradaran, B., Baghbanzadeh, A., & Taefehshokr, S. (2020). Promising approaches in cancer immunotherapy. *Immunobiology*, 225(2), 151875. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.11.010>

36) Villaverde, M. S., Combe, K., Duchene, A. G., Wei, M. X., Glikin, G. C., & Finocchiaro, L. M. E. (2014). Suicide plus immune gene therapy prevents post-surgical local relapse and increases overall survival in an aggressive mouse melanoma setting. *International Immunopharmacology*, 22(1), 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.06.021>

37) Gitelis, S., Thomas, R., Templeton, A., & Schajowicz, F. (1989). Characterization of the pseudocapsule of soft-tissue sarcomas. An experimental study in rats. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 246, 285–292.

38) O'Donnell, P. W., Manivel, J. C., Cheng, E. Y., & Clohisy, D. R. (2014). Chemotherapy influences the pseudocapsule composition in soft tissue sarcomas. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 472(3), 849–855. <https://doi.org/10.1007/s11999-013-3022-7>

- 39) Москалева, Е. ., Родина, А. ., Гукасова, Н. В., Свиридова, И. К., Родина, И. А., Сергеева, Н. С., Сологуб, В. К., Коромыслова, И. А., Лопатин, В. В., Мужняк, Е. Л., Котелевиц, А. Г., & Северин, С. Е. (2006). Индукция меланомаспецифического клеточного иммунного ответа у мышей после ксеногенной вакцинации клетками меланомы человека, введенными в предварительно имплантированный под кожу полиакриламидный гель. *ИММУНОЛОГИЯ*, 27(6), 329–336.
- 40) Berger, A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 321(7258), 424. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.424>
- 41) Longhi, M. P., Trumpfheller, C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., Kluger, C., Salazar, A. M., Colonna, M., & Steinman, R. M. (2009). Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *Journal of Experimental Medicine*, 206(7), 1589–1602. <https://doi.org/10.1084/jem.20090247>
- 42) Accart, N., Sergi, F., & Rooke, R. (2014). Revisiting fixation and embedding techniques for optimal detection of dendritic cell subsets in tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 62(9), 661–671. <https://doi.org/10.1369/0022155414539963>
- 43) Murata, M., Nabeshima, S., Kikuchi, K., Yamaji, K., Furusyo, N., & Hayashi, J. (2006). A comparison of the antitumor effects of interferon-alpha and beta on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cytokine*, 33(3), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.08.011>
- 44) Kyi, C., Roudko, V., Sabado, R., Saenger, Y., Loging, W., Mandeli, J., Thin, T. H., Lehrer, D., Donovan, M., Posner, M., Misiukiewicz, K., Greenbaum, B., Salazar, A., Friedlander, P., & Bhardwaj, N. (2018). Therapeutic Immune Modulation against Solid Cancers with Intratumoral Poly-ICLC: A Pilot Trial. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(20), 4937–4948. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1866>

Maģistra darbs „Bakteriofāga izcelsmes dsRNS (Larifan) ietekme uz melanomas augšanu peļu audzeju modeļos” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

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

Autors: Irina Verhovcova *paraksts* 02.06.2020.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr.biol. Dace Pjanova *paraksts* 02.06.2020.

Recenzents: *paraksts* Dr.biol. Anna Zajakina

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 02.06.2020.

Lietvede: *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: