

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

ABC SAIMES GĒNU EKSPRESIJA UN VĒŽA CILMES  
ŠŪNU FENOTIPISKĀS IZPAUSMES PRET  
DOKSORUBICĪNU REZISTENTĀ MDA-MB-231  
APAKŠPOPULĀCIJĀ

Bakalaura darbs

Autors: Marija Samoviča

Studenta apliecības numurs: ms15049

Darba vadītājs: Dipl. pharm. Valdis Pirsko

Darba konsultante: Dr. biol. Inese Čakstiņa

Rīga 2018

## KOPSAVILKUMS

Rezistence pret citotoksiskiem ķīmijterapijas savienojumiem ir nozīmīga problēma vēža ārstēšanā, kam raksturīga audzēja atjaunošanās un slimības progresēšana. Rezistenci pret ķīmijterapijas savienojumiem var veidot dažādi šūnu mehānismi, no kuriem visplašāk aprakstīta ATF saistošās kasetes (ABC) transportproteīnu pārekspresija. Rezistenci visbiežāk veicina pret ķīmijterapijas savienojumiem rezistentu apakšpopulāciju selekcija. Vēža cilmes šūnām (VCŠ) piemīt spēja izvairīties no ķīmijterapijas ietekmes un atjaunot audzēja šūnu populāciju.

Darba mērķis bija noteikt ABC saimes gēnu ekspresiju un raksturot VCŠ raksturīgās pazīmes pret doksorubicīnu rezistentā trīskārši negatīva krūts vēža šūnu līnijas MDA-MB-231 apakšpopulācijā.

Pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu MDA-MB-231 šūnām gan uzreiz pēc apstrādes, gan nākamajā pasāzā tika konstatēta augstāka ABC transportproteīnu transkriptomiskā ekspresija lielākajai daļai no pārbaudītajiem ABC gēniem. Tika noteikta atsevišķu VCŠ marķieru gēnu pārekspresija un novērotas citas cilmsūnības izpausmes – spēja atjaunot populāciju un paaugstināta koloniju veidošanās spēja. Atjaunotajai šūnu populācijai, salīdzinot ar kontroles kultūru, bija paaugstināta rezistence pret doksorubicīnu.

Darbs izstrādāts RSU Onkoloģijas institūta Molekulārās ģenētikas laboratorijā no 2017. gada oktobra līdz 2018. gada jūnijam.

Atslēgvārdi: ķīmijterapijas rezistence, ABC saimes gēni, vēža cilmes šūnas (VCŠ), doksorubicīns, MDA-MB-231.

## SUMMARY

Resistance to cytotoxic chemotherapy compounds is a significant problem in cancer treatment resulting in tumor regeneration and relapse. Chemoresistance can be mediated by various cell mechanisms, of which ATP binding cassette (ABC) transporter overexpression is the most studied. Resistance often is mediated by selection of chemotherapy resistant subpopulations. Cancer stem cells (CSC) have the ability to avoid chemotherapy effects and to renew tumor cell population.

The aim of this study was to determine ABC family gene expression and CSC characteristics in a doxorubicin resistant subpopulation of triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231.

After pulsed treatment with doxorubicin in MDA-MB-231 cells higher ABC transporter gene transcriptomic expression of most ABC family genes tested both after exposure and the following passage was determined. Overexpression of several CSC marker genes was found, and also other CSC characteristics were identified – ability to renew cell population and higher colony formation ability. The restored population had higher resistance to doxorubicin, compared to control culture.

The work was carried out in RSU Institute of Oncology, Laboratory of Molecular Genetics from October 2017 till June 2018.

The title of work: Expression of ABC family genes and cancer stem cell phenotype in doxorubicin-resistant subpopulation of MDA-MB-231.

Key words: chemotherapy resistance, ABC family genes, cancer stem cells (CSC), doxorubicin, MDA-MB-231.

## SAĪSINĀJUMI

|           |   |
|-----------|---|
| (k)DNS    | (komplementārās) dezoksiribonukleīnskābes             |
| (m)RNS    | (matricas) ribonukleīnskābes                          |
| (q)PCR    | (kvantitatīvā reālā laika) polimerāzes ķēdes reakcija |
| ABC       | ATF saistošās kasetes transportproteīns/saimes gēns   |
| ATF       | adenozīntrifosfāts                                    |
| B-amf     | B-amfotericīns  |
| BCRP      | krūts vēža rezistences proteīns                       |
| CIS       | cisplatīns  |
| Ct        | sliekšņa cikls ( <i>cycle threshold</i> )             |
| DMSO      | dimetilsulfoksīds                                     |
| dNTP      | dezoksiribonukleotīdi                                 |
| DOX       | doksorubicīns   |
| DPBS      | Dulbeka sāļu šķīdums ar fosfāta bufersistēmu          |
| EDTA      | etilēndiaminotetraacetāts                             |
| ER        | estrogēna receptors                                   |
| FBS       | liellopa fetālais serums                              |
| FU        | 5-fluorouracils                                       |
| HER2      | cilvēka epidermālā augšanas faktora receptors 2       |
| MRP-1     | multirezistences proteīns-1                           |
| MXR       | mitoksantrona rezistences gēns                        |
| OD        | optiskais blīvums                                     |
| PEN-STREP | penicilīns-streptomicīns                              |
| P-gp      | caurlaidības glikoproteīns                            |
| PR        | progesterona receptors                                |
| RQ        | reižu skaits  |
| SRB       | B-sulforodamīns                                       |
| TBE       | Tris borāta EDTA buferis                              |
| TCA       | trihloretiķskābe                                      |
| Tris      | tris(hidroksimetil)aminometāns                        |
| VB        | vinblastīns   |
| VCŠ       | vēža cilmes šūnas ( <i>cancer stem cells (CSC)</i> )  |

# SATURA RĀDĪTĀJS

|  |    |
|--|----|
| Kopsavilkums   | 2  |
| Summary  | 3  |
| Saīsinājumi  | 4  |
| Satura rādītājs  | 5  |
| Ievads   | 7  |
| 1. Literatūras apskats   | 8  |
| 1.1. Vēža šūnu rezistence pret ķīmijterapiju                               | 8  |
| 1.2. ABC transportproteīni vēža šūnās                                      | 9  |
| 1.2.1. ABC transportproteīnu vispārējs raksturojums                        | 9  |
| 1.2.2. ABC transportproteīnu saistība ar rezistenci pret ķīmijterapiju     | 10 |
| 1.3. Vēža cilmes šūnas un ķīmijterapijas rezistence                        | 12 |
| 1.3.1. Vēža cilmes šūnu teorija  | 12 |
| 1.3.2. Vēža cilmes šūnu nozīme ķīmijterapijas rezistences veidošanā        | 13 |
| 1.4. Doksorubicīna ietekme uz krūts vēža šūnām un rezistence               | 15 |
| 2. Materiāli un metodes  | 18 |
| 2.1. Materiāli   | 18 |
| 2.1.1. Šūnu līnijas  | 18 |
| 2.1.2. Reāģenti  | 18 |
| 2.1.3. Laboratorijas materiāli   | 21 |
| 2.1.4. Laboratorijas iekārtas  | 22 |
| 2.1.5. Darba šķīdumi   | 23 |
| 2.1.6. Šūnu kultivēšanas un saldēšanas barotnes                            | 24 |
| 2.2. Metodes   | 24 |
| 2.2.1. Materiālu un darba vietas sterilizācija                             | 24 |
| 2.2.2. Šūnu kultivēšanas metodes   | 24 |
| 2.2.2.1. Šūnu atsaldēšana  | 24 |
| 2.2.2.2. Šūnu tripsinizēšana   | 25 |
| 2.2.2.3. Šūnu skaitīšana ar hemocitometru                                  | 25 |
| 2.2.2.4. Šūnu saldēšana  | 26 |
| 2.2.2.5. Šūnu lizātu sagatavošana  | 27 |
| 2.2.2.6. Suspensijas šūnu skaitīšana šūnu kultūras barotnes nomaiņas laikā | 27 |
| 2.2.2.7. Šūnu punktveida apstrāde ar doksorubicīnu                         | 28 |
| 2.2.3. B-sulforodamīna (SRB) tests   | 28 |
| 2.2.4. Citotoksicitātes tests  | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.5. Augšanas līkņu veidošana   | 30 |
| 2.2.6. Klonogenitātes tests   | 31 |
| 2.2.7. Metodes gēnu transkriptomiskās ekspresijas līmeņa noteikšanai  | 32 |
| 2.2.7.1. RNS izdalīšana   | 32 |
| 2.2.7.2. RNS apstrāde ar DNāzi I  | 32 |
| 2.2.7.3. RNS attīrīšana pēc apstrādes ar DNāzi I  | 33 |
| 2.2.7.4. Komplementārās DNS (kDNS) sintēze  | 33 |
| 2.2.7.5. Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR)   | 34 |
| 2.2.7.6. Agarozes gela elektroforēze  | 35 |
| 2.2.7.7. Kvantitatīvā reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija (qPCR)   | 35 |
| 2.2.8. Eksperimenta dizains   | 36 |
| 3. Rezultāti  | 38 |
| 3.1. Pret doksorubicīnu rezistentu MDA-MB-231 apakšpopulāciju selekcija pēc īslaicīgas doksorubicīna ekspozīcijas                   | 38 |
| 3.2. Šūnu morfoloģijas un proliferācijas ātruma izmaiņas pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu                                  | 38 |
| 3.3. MDA-MB-231 jutības izmaiņas pret citotoksiskajiem savienojumiem pēc doksorubicīna ekspozīcijas                                 | 43 |
| 3.4. ABC saimes gēnu transkriptomiskās ekspresijas līmeņa izmaiņas MDA-MB-231 šūnu līnijā pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu | 46 |
| 3.5. Cilmsūnības izmaiņas MDA-MB-231 šūnu līnijā pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu  | 47 |
| 4. Diskusija  | 49 |
| 4.1. Pret doksorubicīnu rezistentu MDA-MB-231 apakšpopulāciju selekcija ar punktveida ekspozīciju                                   | 49 |
| 4.2. Šūnu morfoloģijas un proliferācijas ātruma izmaiņas pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu                                  | 50 |
| 4.3. MDA-MB-231 jutības izmaiņas pret ķīmijterapijas savienojumiem pēc doksorubicīna ekspozīcijas                                   | 51 |
| 4.4. ABC saimes gēnu transkriptomiskās ekspresijas līmeņa izmaiņas pēc doksorubicīna ekspozīcijas                                   | 53 |
| 4.5. Cilmsūnības izmaiņas MDA-MB-231 šūnu līnijā pēc apstrādes ar doksorubicīnu   | 55 |
| Secinājumi  | 57 |
| Pateicības  | 58 |
| Literatūras saraksts  | 59 |
| Pielikumi   | 67 |

## IEVADS

Ķīmijterapija ir vēža ārstēšanā plaši pielietota metode, taču tās efektivitāti daudzos gadījumos samazina audzēja rezistence, kas veicina audzēja atjaunošanos un metastāžu veidošanos. Ķīmijterapijas rezistence var būt dabiska jeb primāra un iegūta, un audzēja heterogenitāte nodrošina rezistentu apakšpopulāciju selekciju ķīmijterapijas ārstēšanas gaitā (Holohan *et al.*, 2013).

Trīskārši negatīvs krūts vēzis ir bazāla tipa audzējs, kam raksturīga negatīva ārstēšanas prognoze. Trīskārši negatīvu audzēju ārstēšanai ir izstrādāti tikai daži mērķterapijas savienojumi, un tā ārstēšanā izmanto citotoksiskus ķīmijterapijas savienojumus, taču pret šādiem savienojumiem vēža ārstēšanā ir raksturīga rezistences veidošanās (Deng *et al.*, 2017).

Aprakstīti dažādi ķīmijrezistences mehānismi – savienojuma izvadīšana ārpus šūnas, metaboliska inaktivācija, izmaiņas savienojuma iedarbības mērķa struktūrā, kā arī savienojuma radīto bojājumu labošana un izvairīšanās no bojāejas (Gottesman *et al.*, 2001). ATF saistošās kasetes (ABC) transportproteīni spēj no šūnas izvadīt dažādus, strukturāli atšķirīgus ķīmijterapijas savienojumus, un pastiprināta ABC transportproteīnu ekspresija ir viens no plaši aprakstītiem rezistences mehānismiem (Dean, 2009).

Vēža cilmes šūnas (VCŠ) ir audzēja apakšpopulācija, kam piemīt spēja pašatjaunoties, izveidot audzēju, kā arī dabiska rezistence pret ķīmijterapiju. ABC transportproteīnu ekspresija tiek uzskatīta par vienu no VCŠ pazīmēm, kas ļauj tām pārdzīvot ķīmijterapijas ārstēšanu un atjaunot audzēju, veidojot rezistenci un multirezistenci (Begicevic & Falasca, 2017).

Mērķis: noteikt ABC transportproteīnu gēnu ekspresiju un raksturot vēža cilmes šūnām raksturīgās pazīmes pret doksorubicīnu rezistentā trīskārši negatīva krūts vēža šūnu līnijā MDA-MB-231 apakšpopulācijā.

Uzdevumi:

- 1) Ar doksorubicīna punktveida ekspozīciju selekcionēt pret doksorubicīnu rezistentu MDA-MB-231 apakšpopulāciju,
- 2) Noteikt jutības izmaiņas pret ķīmijterapijas savienojumiem (doksorubicīnu, vinblastīnu, cisplatīnu un fluorouracilu) MDA-MB-231 šūnu līnijā pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu,
- 3) Noteikt ABC saimes gēnu transkriptomiskās ekspresijas līmeņa izmaiņas MDA-MB-231 šūnu līnijā pēc kultūras īslaicīgas ekspozīcijas doksorubicīnam,
- 4) Raksturot augšanas raksturlielumu un šūnu morfoloģijas izmaiņas MDA-MB-231 šūnu līnijā pēc doksorubicīna punktveida ekspozīcijas,
- 5) Raksturot cilmsūnības izmaiņas MDA-MB-231 šūnām pēc apstrādes ar doksorubicīnu.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Vēža šūnu rezistence pret ķīmijterapiju

Ķīmijterapija ir nozīmīga vēža ārstēšanas sastāvdaļa, ko pielieto gan atsevišķi, gan kopā ar citām metodēm dažādu tipu un stadiju vēža ārstēšanā (Gottesman *et al.*, 2001; Holohan *et al.*, 2013). Ķīmijterapijas ārstēšanas efektivitāti bieži samazina audzēja rezistence (Holohan *et al.*, 2013), un ķīmijterapijas rezistence tiek uzskatīta par galveno problēmu vēža ārstēšanā (Rivera & Gomez, 2010).

Rezistenci pret ķīmijterapijas savienojumiem veido un ietekmē dažādi faktori. Ķīmijterapijas rezistenci konceptuāli iedala divos mehānismos – farmakokinētiskā jeb sistēmiskā un farmakodinamiskā jeb šūnu rezistence. Farmakokinētiskā rezistence apzīmē medikamenta absorbcijas, izplatīšanās, metabolisma un ekskrecijas procesus organismā, kā dēļ funkcionāla medikamenta transports līdz audzēja šūnām var būt traucēts (Alfarouk *et al.*, 2015). Savukārt farmakodinamisko rezistenci pret ķīmijterapiju nodrošina šūnu ģenētisko un epigenētisko īpašību izmaiņas ar ķīmijterapijas savienojumu jutību saistītos šūnas procesos (Gottesman *et al.*, 2001). Farmakodinamisko jeb šūnu rezistenci iedala divās kategorijās – dabiska jeb primāra un iegūta. Dabiskai rezistencei raksturīga zema audzēja jutība pret ķīmijterapijas medikamentu, jo audzēja šūnām jau pirms ķīmijterapijas pastāv rezistenci nodrošinoši mehānismi. Turpretī iegūta rezistence ārstēšanas gaitā var veidoties tādu audzēju šūnām, kam ārstēšana sākotnēji bijusi efektīva (Holohan *et al.*, 2013).

Iegūtai vēža rezistencei pret ķīmijterapiju ir izvirzīti vairāki iespējamie veidošanās modeļi. Viens no veidiem ir audzēja atjaunošanās, pateicoties vienai vai vairākām vēža šūnām, kas ķīmijterapijas savienojuma klātbūtnē dažādu mehānismu ceļā kļūst mazāk jutīgas pret citotoksiskā savienojuma iedarbību (Dean *et al.*, 2005). Cits skaidrojums ir balstīts uz audzēja šūnu heterogenitāti, kur ķīmijterapijas izraisītas selekcijas veidā audzēju atjauno un attiecīgi rezistenci veido neliela dabiski rezistentu šūnu apakšpopulācija (Holohan *et al.*, 2013). Šim mehānismam atbilst arī vēža cilmes šūnas (VCS), kam dabiski ir raksturīga spēja izvairīties no ķīmijterapijas savienojumu ietekmes. Aprakstīta arī VCS vai tām radniecīgu šūnu spēja mutāciju un citu ģenētisku izmaiņu rezultātā pēcnācējiem nodot rezistences īpašības (Dean *et al.*, 2005; Moitra *et al.*, 2011). Pēc šūnu selekcijas ar vienu ķīmijterapijas medikamentu, vēža šūnām bieži novērojama arī rezistences veidošanās pret citiem strukturāli atšķirīgiem ķīmijterapijas savienojumiem ar dažādiem darbības mehānismiem. Šo īpašību sauc par multirezistenci, un klīnikā multirezistentas vēža šūnas nodrošina agresīvāka audzēja atjaunošanos un tiek saistītas ar metastāzēm (Saxena *et al.*, 2011).

Ķīmijrezistences veidošanā šūnās aprakstīti dažādi mehānismi: neefektīvs medikamenta transports iekšā šūnā vai pastiprināta tā izvadīšana, medikamenta metaboliska inaktivācija (vai savienojuma iedarbībai nepieciešamā aktivācija nenotiek), izmaiņas savienojuma darbības mehānisma mērķī (gēnu amplifikācija un pārekspresija, mutācijas, alternatīvu signālceļu un mehānismu izmantošana šūnā), DNS reparācijas mehānismu aktivācija, rezistenci veicinošas adaptīvas atbildes, piemēram, epителиāli mezenhimālā pāreja, kā arī izvairīšanās no apoptozes un citiem bojāejas mehānismiem (Gottesman *et al.*, 2001; Holohan *et al.*, 2013). Ķīmijterapijas rezistences mehānismu izpētei un identificēšanai ir potenciāls pielietojums efektīvu biomarķieru un medikamentu izstrādē (Tegze *et al.*, 2012).

## 1.2. ABC transportproteīni vēža šūnās

### 1.2.1. ABC transportproteīnu vispārējs raksturojums

ATF saistošās kasetes (ABC) saimes gēni pārstāv lielāko transmembrānas proteīnus kodējošo gēnu grupu (Dean *et al.*, 2001). Izmantojot ATF saistīšanās unhidrolīzes enerģiju, ABC transportproteīni cauri šūnas membrānām galvenokārt vienā virzienā pārvieto dažādus, strukturāli atšķirīgus endogēnus un eksogēnus savienojumus (Dean, 2009; Fletcher *et al.*, 2010). ABC transportproteīni raksturīgi gan prokariotiem, gan eikariotiem, kas liecina par to funkcionālo nozīmīgumu (Szakacs *et al.*, 2004), un cilvēka genomā ir identificēti 48-49 funkcionāli ABC saimes gēni (Vasiliou *et al.*, 2009; Robey *et al.*, 2018).

Cilvēka ABC transportproteīni tiek klasificēti septiņās apakšgrupās no ABCA līdz ABCG, balstoties uz aminoskābju sekvenču līdzību un organizāciju ATF saistošajā domēnā (Dean, 2009; Dean *et al.*, 2001). Eikariotiem pilnīgi funkcionālie ABC transportproteīni sastāv no divām funkcionālām vienībām – diviem ATF saistošajiem domēniem un diviem transmembrānas domēniem (Dean *et al.*, 2001). Taču pastāv arī pustransportproteīni, kuru uzbūves pamatā ir viena funkcionālā vienība un kas funkcionālu molekulu veido homodimēru vai heterodimēru formā (Dean, 2009). ATF saistošie domēni atrodas citoplazmā un atbild par enerģijas iegūvi substrāta pārvietošanai cauri membrānai, savukārt transmembrānas domēni nodrošina substrāta saistīšanas specifiskumu (Dean *et al.*, 2001), taču precīzs substrāta translokācijas mehānisms nav aprakstīts (Robey *et al.*, 2018). Eikariotu ABC transportproteīni ir lokalizēti šūnas plazmatiskajā membrānā un organelu – Goldži kompleksa, endosomu, endoplazmatiskā tīkla, peroksisomu un mitohondriju – membrānās (Kaminski *et al.*, 2006).

ABC transportproteīnu grupai raksturīgs plašs transportēto substrātu klāsts – mazas organiskas un neorganiskas molekulas, kā arī lieli organiskie savienojumi (Wilkens, 2015) – , un tie transportē dažādas ksenobiotikas, metabolītus, lipīdus un citas molekulas (Fletcher *et*

*al.*, 2010). Šo savienojumu pārvietošana šūnas iekšienē kalpo par daļu no metabolisma procesiem, bet transports ārpus šūnas nodrošina savienojuma nogādāšanu uz citiem orgāniem vai izvadīšanu ārpus organisma (Dean, 2001). Daudziem ABC transportproteīniem ir svarīga loma fizioloģisko barjeru audos (piemēram, placentas, smadzeņu, kā arī sēklinieku barjerā), kā arī orgānos un audos ar absorbcijas (kuņģis, plaušas), ekskrecijas un metabolisma (aknas un nieres) funkcijām (Quosa *et al.*, 2015). Tā kā vairāki ABC transportproteīni spēj no šūnas izvadīt arī dažādus medikamentus, to pastiprināta ekspresija ir viens no ķīmijterapijas rezistences un multirezistences veidošanās mehānismiem (Jaramillo *et al.*, 2018; Leonard, 2003).

### 1.2.2. ABC transportproteīnu saistība ar rezistenci pret ķīmijterapiju

Ķīmijterapijas medikamentu izvadīšana ārpus šūnas, tā samazinot medikamenta iekššūnas koncentrāciju un attiecīgi iedarbības efektivitāti, ir viens no vēža šūnu rezistences veidošanās mehānismiem. (Kibria *et al.*, 2014; Moitra *et al.*, 2011). Vairāki šūnas membrānas transportproteīni ir tikuši saistīti ar rezistenci pret ķīmijterapiju (Holohan *et al.*, 2013). Kopš pirmā ABC transportproteīna atklāšanas 1976. gadā (Juliano & Ling, 1976), ir plaši tikusi pētīta ABC transportproteīnu saistība ar neveiksmīgu ķīmijterapijas iznākumu dažādu audzēju tipu ārstēšanā. (Ishikawa, 2012) Šobrīd ar rezistences un multirezistences veidošanos pret vienu vai vairākiem ķīmijterapijas medikamentiem dažādos vēža tipos tiek saistīti vismaz 15 no ABC grupas transportproteīniem, taču visplašāk pētīti un aprakstīti ir trīs no tiem – *ABCB1* (multirezistences proteīns-1 (MRP-1) jeb caurlaidības glikoproteīns (P-gp)), *ABCC1* un *ABCG2* (krūts vēža rezistences proteīns (BCRP) jeb mitoksantrona rezistences gēns (MXR)). (Ishikawa, 2012; Jaramillo *et al.*, 2018).

*ABCB1* ir pirmais identificētais un visplašāk pētītais ABC transportproteīns (Wolking *et al.*, 2015). Augsta *ABCB1* ekspresija ir novērota dažādos vēža tipos, piemēram, krūts, nieru, zarnu, olnīcu un citos, un tā pārekspresija ir saistīta ar zemu atbildi uz ķīmijterapiju un nelabvēlīgu prognozi (Jaramillo *et al.*, 2018). 1997. gadā publicētā meta-analīzē (31 pētījums) konstatēts, ka P-gp tiek ekspresēts 41,2% krūts vēža gadījumu un ka P-gp ekspresija pēc ķīmijterapijas pieaug, kas neveiksmīga ķīmijterapijas iznākuma iespējamību paaugstina trīs reizes (Trock *et al.*, 1997). Literatūrā ir plaši aprakstīta *ABCB1* nozīme rezistencē pret daudziem strukturāli atšķirīgiem ķīmijterapijas medikamentiem, piemēram, vinblastīnu un vinkristīnu, metotreksātu, doksorubicīnu un daunorubicīnu, epirubicīnu, paklitakselu un docetakselu, etopozīdu, imatinibu un citiem (Jaramillo *et al.*, 2018; Waghary & Zhang, 2017).

*ABCG2* transportproteīna pirmie identificētie substrāti bija galvenokārt ķīmijterapijas medikamenti, jo *ABCG2* sākotnēji tika atklāts pret doksorubicīnu rezistentā krūts vēža šūnu

līnijā. (Ishikawa, 2012; Lee *et al.*, 1997; Robey *et al.*, 2009). Vienlaicīgi *ABCG2* tika identificēts arī pret mitoksantronu rezistentā resnās zarnas karcinomas šūnu līnijā (Rabindran *et al.*, 1998), un mitoksantrona transports ir viena no *ABCG2* ekspresējošu šūnu pazīmēm (Robey *et al.*, 2009). Literatūrā ir aprakstīta *ABCG2* spēja transportēt un attiecīgi veidot rezistenci un multirezistenci arī pret daudziem citiem ķīmijterapijas medikamentiem (to vidū - doksorubicīnu) (Dean, 2009; Robey *et al.*, 2009; Vasiliou *et al.*, 2009). *ABCG2* ekspresija ir konstatēta dažādu tipu audzējos (Begicevic & Falasca, 2017). *ABCG2* ir augsti ekspresēts normālos audos ar barjeras un sekrēcijas funkcijām, un, lai gan precīza *ABCG2* funkcija nav izpētīta (Zhou *et al.*, 2001), tiek spriests, ka *ABCG2*, līdzīgi kā *ABCB1*, ir saistīts ar toksisku savienojumu izvadīšanu. (Jaramillo *et al.*, 2018)

*ABCC1* funkcija organismā, līdzīgi *ABCB1* un *ABCG2*, ir ksenotiotiku transports, un *ABCC1* tiek ekspresēts epiteliālās šūnās lielākajā daļā organisma audu (Silverton *et al.*, 2011). Dažādos šūnu līniju pētījumos jau pirms 20-30 gadiem pirmo reizi pierādīta *ABCC1* spēja veidot rezistenci pret antraciklīniem, kapmirtes (*Vinca sp.*) alkaloīdiem, epidofilotoksīniem, kamptotecīniem un metotreksātu, bet ne taksāniem (Kruh & Belinsky, 2003), ko apstiprinājuši un papildinājuši arī vēlāki pētījumi (Jaramillo *et al.*, 2018). Piemēram, ir tikusi pierādīta *ABCC1* ekspresijas saistība ar īsāku dzīves ilgumu krūts vēža pacientēm kuru ārstēšanā izmantota adjuvantā ķīmijterapija ar ciklofosfamīdu, metotreksātu un fluorouracilu, un tas liecina par *ABCC1* lomu ķīmijterapijas rezistences veidošanā krūts vēzī (Filipits *et al.*, 2005). Augsta *ABCC1* ekspresija novērota daudzos citos vēža tipos, kā plaušu, prostatas, olnīcu vēzis, melanoma, neuroblastoma un citi (Jaramillo *et al.*, 2018).

Dažiem no ABC transportproteīniem ir salīdzinoši šaurs substrātu klāsts, bet citiem – plašs, un tieši ABC transportproteīni ar plašu substrātu klāstu visbiežāk tiek saistīti ar rezistenci un multirezistenci. Lai gan *ABCB1*, *ABCG2* un *ABCC1* transportproteīnu darbības mehānisms un plašais substrātu klāsts ir aprakstīts, šo gēnu kodēto proteīnu ietekmes apjoms uz rezistences un multirezistences veidošanos nav zināms (Robey *et al.*, 2018). Olnīcu vēža gadījumos vismaz 19 ABC transportproteīniem raksturota spēja transportēt ķīmijterapijas savienojumus (Ween *et al.*, 2015), savukārt pētījumā ar 60 vēža šūnu līnijām (NCI60 paneli) ar rezistenci saistība tikusi identificēta vairāk nekā pusei ABC transportproteīnu (Szakacs *et al.*, 2004). Pierādīts arī, ka vienā audzējā var būt ekspresēti vairāki ABC gēni un ka vienlaicīgi ekspresētu ABC transportproteīnu skaits korelē ar sliktas prognozes rādītājiem vēža ārstēšanā (Robey *et al.*, 2018).

### 1.3. Vēža cilmes šūnas un ķīmijterapijas rezistence

#### 1.3.1. Vēža cilmes šūnu teorija

Vēža cilmes šūnu hipotēze nosaka, ka pašatjaunošanās, spēja diferencēties un izveidot audzēju piemīt tikai nelielai audzēja šūnu apakšpopulācijai (Sun *et al.*, 2012). VCŠ teorija pirmo reizi aprakstīta 1994. gadā, un veidota no diviem apgalvojumiem: audzēji rodas no normālu audu cilmes šūnām un sastāv no tādiem pašiem šūnu veidiem kā normāli audi – cilmes šūnas, šūnas ar spēju dalīties un diferencētas šūnas (Sell, 2010). Laika gaitā VCŠ teorija un VCŠ apzīmējums ir mainījies (Valent *et al.*, 2012). VCŠ teorija ir viens no pretrunīgākajiem vēža bioloģijas konceptiem, taču gadu gaitā pētījumos ir apkopoti fakti, kas liecina par VCŠ pastāvēšanu (Sun *et al.*, 2012).

Vēža šūnu bioloģijā klonālās evolūcijas modelis paredz evolucionāru mehānismu norisi audzējā, kur no vienas vai dažām šūnām izveidotais audzējs sastāv no ģenētiski un fenotipiski atšķirīgām šūnu populācijām (Nowell, 1976). Audzēja heterogenitāte nodrošina šūnu daudzveidību rezistences, pašatjaunošanās spēju un augšanas pielāgojumu kontekstā (Liang *et al.*, 2010). Pastāv divi audzēja attīstības modeļi. Stohastiskais modelis paredz, ka audzējā šūnas ir homogēnas un to īpašības regulē dažādi iekšēji un ārēji faktori, kas ietekmē vēža šūnu heterogenitāti. Savukārt hierarhijas modelis balstās uz vēža šūnu dažādību audzējā, no kurām tikai atsevišķai apakšpopulācijai piemīt audzēja veidošanas spēja (Sun *et al.*, 2012). Normālām cilmes šūnām piemīt pašatjaunošanās un proliferācijas potenciāls, tās nemainīgi uztur nediferencētu šūnu populāciju, kā arī tām raksturīgs potenciāls diferencēties pēc attiecīgu stimulu saņemšanas (Rajaraman *et al.*, 2006), un analogiskas īpašības tiek piedēvētas VCŠ (Achuthan *et al.*, 2011). Audzēja hierarhiskā uzbūve zūd, ja visas vai lielākā daļa šūnu atbilst VCŠ fenotipam un ja VCŠ dalīšanās cikla regulējošie mehānismi ir kļuvuši nefunkcionāli (Valent *et al.*, 2012).

Precīza VCŠ izcelsme nav zināma un, iespējams, atšķiras dažādos audzējos (Hanahan & Weinberg, 2011). Literatūrā izvirzīti vismaz divi VCŠ un VCŠ līdzīga fenotipa šūnu izcelsmes mehānismi. Tiek uzskatīts, ka VCŠ var rasties no normālām konkrētā orgānā esošām somatiskajām cilmes vai priekšteču šūnām mutāciju un citu ģenētisku izmaiņu, piemēram, hromosomu aberāciju, rezultātā (Bjerkvig *et al.*, 2005; El-Badawy *et al.*, 2017; Hanahan & Weinberg, 2011). Atšķirīgs iespējamais mehānisms ir onkogēnu transformāciju norise somatiskās, dalīties spējīgās vai diferencētās šūnās specifiskos apstākļos, kas var veicināt dediferenciāciju un VCŠ fenotipa iegūšanu (Bjerkvig *et al.*, 2005; El-Badawy *et al.*, 2017; Hanahan & Weinberg, 2011). Aprakstīts, ka VCŠ veidošanās ir iespējama arī šūnu saplūšanas rezultātā, kur cilmes un/vai normālas šūnas, kurās notikušas mutācijas, saplūst, vai arī mutācijas

notiek jau divu šūnu saplūšanas rezultātā izveidotā šūnā (Bjerkvig *et al.*, 2005). Lai gan vairākus gadus desmitus aprakstīts mehānisms, pēdējā laikā VCŠ izcelsme tiek saistīta ar vēl vienu mehānismu – poliploīdu, daudzkodolainu milzu šūnu veidošanās stresa apstākļos (hipoksijas, ķīmijterapijas, staru terapijas ietekmē) endoreduplikācijas ceļā, kas pumpurošanās, depoliploidizācijas un citu amitotisku dalīšanās mehānismu rezultātā atjauno populāciju, veidojot diploīdas šūnas, kam raksturīgas VCŠ īpašības (Mirzayans *et al.*, 2018).

VCŠ termins tiek saistīts ar VCŠ raksturīga fenotipa šūnu funkcionālu identificēšanu (Valent *et al.*, 2012). Šūnu apakšpopulācijas ar VCŠ raksturīgām īpašībām ir identificētas dažādos vēža tipos, piemēram, krūts, aizkuņģa, prostatas, smadzeņu un citos (Hanahan & Weinberg, 2011; Sun *et al.*, 2012). VCŠ apakšpopulācijai audzējā raksturīga marķieru gēnu ekspresija, kas ļauj VCŠ atšķirt no citām audzēja šūnām (Duru *et al.*, 2014). VCŠ audzējā var atpazīt pēc cilmes šūnu marķieru ekspresijas (*ALDH1A1*, *CD24*, *CD44*, *CD133* un citi), kā arī tādu gēnu ekspresijas, kas saistīti ar embrionāliem signālceļiem (*Sox2*, *Oct4*, *Nanog*) (P. Liu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). VCŠ raksturīga arī ar epiteliāli mezenhimālo pāreju un metastāzēm saistītu gēnu ekspresija, piemēram, integrīnu *ITGB1*, *ITGB3* un *ITGA6* (Brooks *et al.*, 2016). Tomēr šādi marķieri nav VCŠ specifiski un informācija par šo marķieru ekspresijas izmaiņu saistību ar VCŠ ir pretrunīga, kā arī nav aprakstīta universāla šo marķieru kombinācija tieši VCŠ atlasei, tādēļ jaunu, VCŠ specifisku marķieru identificēšanai ir potenciāls vēža ārstēšanā (Deng *et al.*, 2017; Rajaraman *et al.*, 2006).

### 1.3.2. Vēža cilmes šūnu nozīme ķīmijterapijas rezistences veidošanā

Eksperimentālos un klīniskos pētījumos pierādīta VCŠ spēja pārdzīvot ķīmijterapijas un staru terapijas ietekmi (Begicevic & Falasca, 2017; Vinogradov *et al.*, 2013). Terapijas ietekmē lielākā daļa audzēja šūnu iet bojā, taču VCŠ terapija neietekmē to dabiskās rezistences dēļ. Pateicoties VCŠ pozitīvajai selekcijai ārstēšanas gaitā, atjaunotais audzējs var būt agresīvāks nekā sākotnējais audzējs, rezistents un multirezistents, kā arī veidot metastāzes ārstēšanas inducēto ģenētisko un epigenētisko izmaiņu dēļ VCŠ un to pēcteču šūnās (Valent *et al.*, 2012; Vinogradov *et al.*, 2013).

VCŠ rezistenci pret ķīmijterapiju nodrošina to stāvoklis dalīšanās ciklā, kā dēļ savienojumi, kas iedarbojas uz mitozes fāzē, tās neietekmē. VCŠ rezistenci veicina tām dabiski raksturīgie rezistences mehānismi, piemēram, ABC transportproteīnu un antiapoptotisku proteīnu ekspresija, detoksificējošu sistēmu aktivācija (Begicevic & Falasca, 2017; Holohan *et al.*, 2013; Vinogradov *et al.*, 2013).

VCŠ atjaunošanos un spēju izdzīvot nodrošina gan tādi signālceļi, kas nodrošina atjaunošanos un diferenciaciju cilmes šūnās, gan onkogēnie signālceļi, un ir aprakstīta šo

signālceļu regulatorā nozīme rezistences un multirezistences fenotipa veidošanā. VCŠ konstatēta arī ar hipoksiju saistītu signālceļu aktivācija, un hipoksija tiek minēta kā viens no nozīmīgiem audzēja mikrovides apstākļiem VCŠ fenotipa nodrošināšanā (Begicevic & Falasca, 2017).

VCŠ raksturīga relatīvi zemas brīvo radikāļu koncentrācijas uzturēšana iekššūnas vidē, un šāda dabiskā regulācija var sniegt priekšrocības tādu ķīmijterapijas savienojumu klātbūtnē, kuru gadījumā viens no pretvēža savienojumu darbības mehānismiem ir oksidatīvā stresa ierosināšana šūnās (Begicevic & Falasca, 2017). Literatūrā aprakstīta senescentu šūnu veidošanās ķīmijterapijas savienojumu ietekmē ar raksturīgu embrionālo cilmes šūnu marķieru ekspresiju, rezistenci un antioksidējošu signālceļu darbību, un šādas šūnas spēj atjaunot populāciju ar VCŠ raksturīgām īpašībām (Achuthan *et al.*, 2011). VCŠ signālceļiem ir nozīme ne vien cilmes šūnības un proliferācijas nodrošināšanā, bet arī vēža invazivitātes veicināšanā (Ayob & Ramasamy, 2018). Ir aprakstīta VCŠ saistība ar epiteliāli mezenhimālo pāreju, kad ķīmijterapijas ietekmē vēža šūnām veidojas mezenhimāls fenotips un paaugstinās spēja veidot metastāzes (Ayob & Ramasamy, 2018; Saxena *et al.*, 2011).

Vēža cilmes šūnām kā vispārēja īpašība tiek piedēvēta ABC transportproteīnu ekspresija (Begicevic & Falasca, 2017). Piemēram, *ABCB1*, *ABCB5* un *ABCG2* pārekspresija ir konstatēta dažādu audzēju tipu vēža cilmes šūnās, un vairāki no ABC saimes gēniem tiek izmantoti kā VCŠ marķieri, kurus ekspresējošās šūnu apakšpopulācijās ir paaugstināta arī citu VCŠ marķieru gēnu ekspresija, piemēram, *CD44* (Holohan *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2017). ABC transportproteīnu ksenobiotiku izvadīšanas funkcija nodrošina vēža cilmes šūnu aizsardzību pret ķīmijterapijas iedarbību. (Patel *et al.*, 2017), taču pēdējos gados tiek pētīta ABC transportproteīnu loma arī citos VCŠ nozīmīgos procesos, kā šūnas atjaunošana, augšana un diferenciācija (Begicevic & Falasca, 2017; Jaramillo *et al.*, 2018). Piemēram, ādas epidermas melanocītu šūnās aprakstīta *ABCB5* un *CD133* saistība, kur *ABCB5* kā membrānas potenciāla regulators veicina šūnu saplūšanu un poliploīdu milzu šūnu veidošanos, kas pēcāk veido diploīdas šūnas ar VCŠ raksturīgām īpašībām (Frank *et al.*, 2003). Tomēr tiek spriests, ka ABC transportproteīnu ekspresija nav vitāli nepieciešama vēža cilmes šūnu ķīmijterapijas rezistentā fenotipa nodrošināšanai (Holohan *et al.*, 2013).

#### 1.4. Doksorubicīna ietekme uz krūts vēža šūnām un rezistence

Doksorubicīns jeb adriamicīns ir antraciklīnu grupas citotoksisks medikaments, kas pirmo reizi tika izdalīts no *Streptomyces peucetius var. caesius* (Arcamone *et al.*, 1969) un vairākus gadu desmitus plaši tiek pielietots gan atsevišķi, gan kombinācijā ar citiem medikamentiem dažādu tipu vēža ārstēšanā (Hernan & Coronado, 2007; Xiang *et al.*, 2017). Doksorubicīnam vēža ārstēšanā var būt nopietni blakus efekti, kā kardiotoxicitāte (Krischke *et al.*, 2016), un daudziem pacientiem ārstēšana ir neveiksmīga vēža šūnu rezistences veidošanās dēļ (Smith, 2006).

Doksorubicīna darbības mehānismi ir saistīšanās ar DNS, topoizomerāzes II- $\alpha$  inhibēšana un skābekļa radikāļu veidošana, kas rada oksidatīvo stresu un izraisa DNS, lipīdu un membrānu bojājumus (Gewirtz, 1999). Tomēr kompleksās iedarbības dēļ doksorubicīna darbības mehānisms nav pilnīgi izpētīts (Sliwinska *et al.*, 2009). Tā kā visi antraciklīnu medikamenti šūnā nonāk pasīvās difūzijas ceļā, šūnā akumulētā medikamenta koncentrācija ir 10-500 reizes lielāka nekā ārpusšūnas vidē (Hernan & Coronado, 2007). Doksorubicīna radītie bojājumi šūnās ierosina augšanas apstāšanos G1 un G2 fāzēs un apoptozi (Gewirtz, 1999) vai senescenci (Sliwinska *et al.*, 2009). Augstā doksorubicīna koncentrācijā DNS bojājumu dēļ šūnas iet bojā apoptozes ceļā, savukārt zemākā koncentrācijā šūnās tiek inducēta senescence, un šūnu bojāeja notiek mitotiskās katastrofas dēļ. Apoptoze notiek relatīvi ātri (stundas līdz dažas dienas) pēc doksorubicīna ekspozīcijas, taču mitotiskās katastrofas norise ir ilgāks process (vairākas dienas), jo šūnām jānonāk šūnas cikla mitozes fāzē (Mckenna *et al.*, 2017).

Galvenie literatūrā aprakstītie šūnu rezistences pret doksorubicīnu veidošanās mehānismi ir paaugstināta transportproteīnu ekspresija, ar mērķa struktūru saistītas izmaiņas, kā arī izmainīti šūnas bojāejas signālceļi (Cox & Weinman, 2016).

Medikamenta izvadīšana ārpus šūnas ir viens no doksorubicīna rezistences mehānismiem dažādu tipu vēža šūnās (Cox & Weinman, 2016). Doksorubicīns ir ar multirezistenci saistītā ABCB1 gēna produkta p-glikoproteīna substrāts. (Hernan & Coronado, 2007; Tecza *et al.*, 2014), un ar doksorubicīna rezistenci krūts vēža šūnās tikuši saistīti arī daudzi citi ABC saimes gēni. Piemēram, ar doksorubicīna selekciju iegūtā MCF7/AdVp3000 šūnu līnijā konstatēts, ka rezistenci nodrošina ne vien *ABCG2* (Doyle *et al.*, 1998), bet arī *ABCA4*, *ABCC3* un vairāki citi (Liu *et al.*, 2005). Dažādos pētījumos rezistence šajā šūnu līnijā ir tikusi saistīta ar vairāku ABC transportproteīnu pārekspresiju, kas kopā pārstāv lielāko daļu ABC gēnu grupu - A, B, C, E, F un G (Zhang, 2007). Ar doksorubicīna rezistenci krūts vēža ārstēšanā gadu gaitā tikusi saistīta lielākā daļa ABC gēnu, kā arī šo gēnu, piemēram, *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2*, polimorfismu

saistība ar rezistences veidošanu un neveiksmīgu ķīmijterapijas iznākumu (Tecza *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2012, 2015).

Ar rezistenci pret doksorubicīnu tikusi saistīta arī pastiprināta ABC transportproteīnu ekspresija mitohondrijos un perinukleārās vezikulās. Mitohondriju membrānās ir konstatēta vairāku ABC transportproteīnu ekspresija, ko saista ar mitohondriju DNS aizsargfunkciju un ar apoptozes nomākšanu šūnā (Solazzo *et al.*, 2009). Savukārt doksorubicīnam eksponētās MCF-7 šūnās ir novērota vezikulu veidošanās ap kodolu, kurās doksorubicīns tiek uzkrāts un metaboliski inaktivēts, un transportproteīni vezikulu membrānās nodrošina šo ar glutationu konjugēto doksorubicīna molekulu eksportu (Abuhammad & Zihlif, 2013).

Lai gan ABC transportproteīnu nozīme rezistencē ir plaši aprakstīta, pētījumā ar divām krūts vēža šūnu līnijām (MDA-MB-231 un MCF-7), kur ar doksorubicīna selekciju tika modelēta iegūtas rezistences veidošanās, tika parādīts, ka vienas šūnu līnijas ietvaros rezistences mehānismi var atšķirties un ka, neraugoties uz atsevišķu ABC gēnu ekspresijas pieaugumu, ABC transportproteīnu pārekspresija ne vienmēr ir galvenais rezistences veidošanās mehānisms (Tegze *et al.*, 2012).

Topoizomerāze II- $\alpha$  ir enzīms, kas atšķetina DNS, un tā darbības laikā īslaicīgi rodas ar proteīniem saistīti divpavedienu DNS pārrāvumi. Doksorubicīns stabilizē šo funkcionālo starpposmu, tādēļ stabili DNS pārrāvumi veidojas vairākās vietās, kā rezultātā šūnā tiek inducēti apoptozes mehānismi. Šādi DNS bojājumi ir galvenais doksorubicīna pretvēža mehānisms. Viens no doksorubicīna rezistences mehānismiem ir samazināta topoizomerāzes II- $\alpha$  ekspresija un paaugstināta  $\beta$  izoformas sintēze šūnās, jo šī izoforma ir mazāk jutīga pret doksorubicīna iedarbību. Piemēram, krūts vēža gadījumos pierādīta pazemināta jutība pret doksorubicīnu pacientiem ar topoizomerāzes II- $\alpha$  gēna delēciju, savukārt tā pārekspresija tika saistīta ar nelabvēlīgu prognozi vairākos vēža tipos (Cox & Weinman, 2016).

Izvairīšanās no apoptozes un citiem šūnas bojāejas mehānismiem ir viena no vēža šūnu pazīmēm. Piemēram, *TP53* ir DNS bojājumu sensors, kas aktivē vairākus proapoptiskus faktorus, inducējot apoptozi DNS pārrāvumu un citu hromosomālo aberāciju gadījumā (Hanahan & Weinberg, 2011). Šī gēna produkts p53 ļoti bieži doksorubicīna rezistentās šūnās ir izmainīts, un mutācijas vai delēcijas *TP53* gēnā, kā arī p53 aktivācijas signālceļos ir raksturīga vēža šūnu pazīme dažādos audzējos, kā dēļ audzējam var būt dabiska jeb primāra rezistence pret doksorubicīnu. NF- $\kappa$ B ir transkripcijas faktors, kam raksturīgas vairākas funkcionāli pretējas funkcijas, kā audzēja nomākšana vai veicināšana. NF- $\kappa$ B signālceļus aktivē DNS bojājumi, un doksorubicīna izraisīto DNS pārrāvumu dēļ vēža šūnās NF- $\kappa$ B tiek aktivēts, ierosinot antiapoptotiskus signālceļus un attiecīgi veidojot rezistenci. Ar doksorubicīna rezistenci saistīti arī citi mehānismi, kuros notiek izmaiņas vai to regulācija apoptozes

novēršanai, piemēram, transkripcijas faktors FOXO3, signālceļi PI3K/Akt un MEK/ERK un citi (Cox & Weinman, 2016). Doksorubicīna veidotie skābekļa radikāļi ir viens no šūnu senescences ierosināšanas mehānismiem, un, līdzīgi kā apoptozes mehānismiem, vēža šūnās tiek izmainīti arī senescences signālceļi, kā rezultātā šūnas spēj dalīties un atjaunot populāciju. Doksorubicīna rezistences veidošanā vēža šūnām aprakstīta arī autofāģijas un nekrozes signālceļu modificēšana vēža šūnu izdzīvošanai (Mosieniak *et al.*, 2015).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Šūnu līnijas

Darbā izmantota bazāla tipa zemas klaidīna ekspresijas apakšgrupas krūts vēža šūnu līnija MDA-MB-231 (ATCC kods – HTB-26; 30.-47. pasāža). MDA-MB-231 ir trīskārši negatīva krūts vēža šūnu līnija, jo šūnas neekspresē estrogēna receptoru (ER), progesterona receptoru (PR) un cilvēka epidermālā augšanas faktora receptoru 2 (HER2) (Chavez *et al.*, 2012). MDA-MB-231 šūnas ir epiteliāla tipa un adherentas ([www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26](http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26)).

#### 2.1.2. Reaģenti

1. tabula.

Šūnu kultivēšanas barotnes un piedevas.

Table 1.

Cell cultivation media and supplements.

| Nosaukums   | Ražotājs                 | Ražotājvalsts | Kataloga numurs |
|---|--------------------------|---------------|-----------------|
| B amfotericīna šķīdums (B-amf) (250 µg/ml)  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | A2942           |
| Liellopa fetālais serums ( <i>Fetal Bovine Serum</i> ) (FBS)  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | F9665           |
| Penicilīns-Streptomicīns (PEN-STREP) (10000 U/ml penicilīns, 10 mg/ml streptomicīns)  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | P0781           |
| Dimetilsulfoksīds (DMSO)  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | 276855          |
| Dulbeko modificētā Īgla barotne ar piedevu F-12 attiecībā 1:1 ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium Ham's F-12 (1:1)</i> ) (DMEM: F-12) | Thermo Fisher Scientific | ASV           | 31331           |

2. tabula.

Ķīmijterapijas savienojumi

Table 2.

Chemotherapy compounds.

| Nosaukums                     | Koncentrācija |       | Ražotājs                  | Ražotājvalsts | Reģistrācijas vai kataloga numurs |
|-------------------------------|---------------|-------|---------------------------|---------------|-----------------------------------|
|                               | mg/ml         | mM    |                           |               |                                   |
| 5-fluorouracils (FU)          | 50            | 130,1 | Ebewe Pharma              | Austrija      | 99-0208                           |
| Cisplatīns (CIS)              | 1             | 3,3   | Accord Healthcare Limited | Lielbritānija | 10-0441                           |
| Doksorubicīns (DOX)           | 2             | 3,7   | Ebewe Pharma              | Austrija      | 95-0067                           |
| Vinblastīna (VB) sulfāta sāls | -             | -     | Sigma-Aldrich             | Vācija        | V1377                             |

3. tabula.

Reaģenti.

Table 3.

Reagents.

| Nosaukums   | Ražotājs                 | Ražotājvalsts | Kataloga numurs |
|---|--------------------------|---------------|-----------------|
| 0,5 M EDTA <i>Ultra pure</i> šķīdums  | Thermo Fisher Scientific | ASV           | 15575020        |
| 10x Dulbeko sāļu šķīdums ar fosfāta bufersistēmu ( <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> ) (DPBS) | Sigma-Aldrich            | Vācija        | 59331C          |
| 10x <i>TrypLE Select</i> disociācijas šķīdums   | Thermo Fisher Scientific | ASV           | A1217702        |
| 1-bromo-3-hloropropāns  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | B9673           |
| 96 % etanols  | Biodegviela SIA          | Latvija       | -               |
| Agarozes pulveris   | Bioatlas                 | Igaunija      | BA01805         |
| B sulforodamīna (SRB) nātrija sāls  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | S1402           |
| DNS uznešanas buferšķīdums elektroforēzes analīzei gelā 6X  | Thermo Fisher Scientific | ASV           | R0611           |
| dNTP 2,5 mM   | TaKaRa                   | Japāna        | #4030           |
| Etiķskābe   | Sigma-Aldrich            | Vācija        | 27225           |
| Izopropanols  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | I9516           |
| Kristālvioletais  | Serva                    | Vācija        | 27335           |
| Molekulmasu marķieris elektroforēzes gēlam pUC19  | Thermo Fisher Scientific | ASV           | SD0061          |
| Nātrija citrāta tribāzes dihidrāts  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | C8532           |
| TRI reaģents  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | T9424           |
| Trihloretiķskābe (TCA) 6,1 N  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | T0699           |
| Tripānzilā 0,4 % šķīdums  | Sigma-Aldrich            | Vācija        | 93595           |
| Tris bāzes pulveris ( <i>Tris ultrapure</i> )   | AppliChem                | Vācija        | A1086           |
| TRIZOL reaģents   | Thermo Fisher Scientific | ASV           | 15596026        |
| Trīs borāta EDTA buferis (TBE)  | Bioatlas                 | Igaunija      | BA01805BA01805  |

4. tabula.

Reaģentu komplekti.

Table 4.

Reagent kits.

| Nosaukums  | Ražotājs                 | Ražotājvalsts | Kataloga numurs |
|--|--------------------------|---------------|-----------------|
| 5x <i>HOT FIREPol EvaGreen qPCR Plus (ROX)</i> maisījums | Solis BioDyne            | Igaunija      | 08-24-00001     |
| kDNS reversās transkripcijas sintēzes komplekts          | Thermo Fisher Scientific | ASV           | 4368814         |
| PCR reaģentu komplekts                                   | Solis BioDyne            | Igaunija      | 01-01-00500     |

|  |                |        |             |
|--|----------------|--------|-------------|
| Rekombinanta Dnāze I un 10x Dnāzes inkubācijas buferis | Sigma-Aldrich  | Vācija | 04716728001 |
| RNS attīrīšanas komplekts <i>NucleoSpin XS</i>         | Macherey Nagel | Vācija | 740903.250  |

5. tabula.

Sintētiskie oligonukleotīdi.

Table 5.

Synthetic oligonucleotides.

| Nosaukums | Sekvence 5'-3'         | Gēnu bankas<br>atsauces nr.                                       | Gēna<br>produkta<br>nosaukums |
|-----------|------------------------|---|-------------------------------|
| ACTB F    | TCCCTGGAGAAGAGCTACG    | NM.001101.3   | ACTB1                         |
| ACTB R    | GTAGTTTCGTGGATGCCACA   |   |                               |
| 18SrRNA F | CGGCTACCACATCCAAGGAA   | NR_003286.2   | 18S RNA                       |
| 18SrRNA R | GCTGGAATTACCGCGGCT     |   |                               |
| RNA28S5 F | CAGGGGAATCCGACTGTTTA   | NR_003287.2   | RNA28 S5                      |
| RNA28S5 R | ATGACGAGGCATTTGGCTAC   |   |                               |
| ALDH1A1 F | GGGGGCGACTATTATACAAG   | NM_000689   | ALDH1 A1                      |
| ALDH1A1 R | ATTGGTATTGTACGGCCCTG   |   |                               |
| CD24 F    | TGCTGCTGGCACTGCTCCTA   | NM_013230.3   | CD24                          |
| CD24 R    | CCACGAAGAGACTGGCTGTTGA |   |                               |
| CD44 F    | GAAGGGCACGTGGTGATTCC   | NM_000610.3   | CD44                          |
| CD44 R    | CAAAGGCATTGGGCAGGTCT   |   |                               |
| ITGA6 F   | CCACGTCAGAAAGCAAGGA    | NM_001079818.1<br>NM_000210.2<br>XM_006712510.1<br>NM_001079818.1 | ITGA6                         |
| ITGA6 R   | CCCAAAGATGTCTCGGGATT   |   |                               |
| ITGB1 F   | GGCCTCTGGGCTTTACGGAGGA | NM_033668.2<br>NM_133376.2<br>NM_002211.3<br>XM_005252448.1       | ITGB1                         |
| ITGB1 R   | CCTGCACGCGCCACACTCAA   |   |                               |
| ABCB1 F   | GCTTTTAGTGTTGGACAGGCA  | NM_001348945.1<br>NM_001348944.1<br>NM_000927.4<br>NM_001348946.1 | MDR1                          |
| ABCB1 R   | TCTTTTCGAGATGGGTAAGTAA |   |                               |
| ABCB2 F   | TGCGGGAATCTCTGGCAAA    | NM_000593.5<br>NM_001292022.1                                     | TAP1                          |
| ABCB2 R   | GCCTCCTTCTGGTTGAGTGTC  |   |                               |
| ABCB3 F   | AGAATCTGTACCAGCCCACA   | NM_001290043.1<br>NM_000544.3<br>NM_018833.2                      | TAP2                          |
| ABCB3 R   | CAGCCGCCATCACCTTATC    |   |                               |
| ABCB4 F   | AGGTTGGCTTTAATTGCACAGA | NM_000443.3<br>NM_018849.2<br>NM_018850.2                         | MDR3                          |
| ABCB4 R   | CTTCCAGCAGCTTCCAGTT    |   |                               |
| ABCB5 F   | TGCGGCATTATCGAGACCAT   | NM_001163941.1<br>NM_178559.5<br>NM_001163942.1<br>NM_001163993.2 | ABCB5                         |
| ABCB5 R   | TCAGTCACATCATCTCGTCCA  |   |                               |
| ABCB6 F   | ACCAAGTTTCGTCTGCTATG   | NM_005689.3   | ABCB6                         |

|          |                          |   |       |
|----------|--------------------------|---|-------|
| ABCB6 R  | CTTCGTA ACTCTCGGCGTTG    | NM_001349828.1  |       |
| ABCB7 F  | GTAAGGTAGCCGAACGTGGT     | NM_004299.5<br>NM_001271696.2<br>NM_001271697.2   | ABCB7 |
| ABCB7 R  | TATCATGGTTCTGCACACGG     | NM_001271698.2<br>NM_001271699.2  |       |
| ABCB8 F  | GCCAACCTCTCTGTCCTGTT     | NM_001282291.1<br>NM_007188.4   | ABCB8 |
| ABCB8 R  | TCTGAAATGTAACGGAGCCAC    | NM_001282292.1<br>NM_001282293.1  |       |
| ABCB9 F  | CTCGGTGCTGGATCTCTGG      | NM_019625.3<br>NM_019624.3<br>NM_203444.3   | ABCB9 |
| ABCB9 R  | GCCGAGTGAAATGTACGTCC     | NM_001243014.1<br>NM_001243013.1  |       |
| ABCB10 F | GCGGTTGGATTTCTCACGAT     | NM_012089.2   | ABCBA |
| ABCB10 R | CAGCACACACAGAAACACG      |   |       |
| ABCC1 F  | GGCCATCGGACTCTTCATCT     | NM_004996.3   | MRP1  |
| ABCC1 R  | GGGCTCCATAGACGCTCAG      |   |       |
| ABCC2 F  | TGGTTCCTGTCCCTATTCTGG    | NM_000392.4   | MRP2  |
| ABCC2 R  | GGCAGGAGTAGGCTAGATTAGA   |   |       |
| ABCC3 F  | CCCTGCCCTGTTTTCTTTG      | NM_003786.3<br>NM_001144070.1   | MRP3  |
| ABCC3 R  | AGGATCTTGGAGCGGAATGG     |   |       |
| ABCC4 F  | GACTGTGATAGGAGATCGGGG    | NM_005845.4<br>NM_001105515.2<br>NM_001301829.1<br>NM_001301830.1   | MRP4  |
| ABCC4 R  | TCGAACAAGTGTCTGCTAACT    |   |       |
| ABCC5 F  | GTGGACAATGCTGGGCTTTT     |   |       |
| ABCC5 R  | AAGACTCGTGCTTGGACAGA     | NM_001023587.2<br>NM_001320032.1  | MRP5  |
| ABCC10 F | GTCATCAAGTTCTGCGGGTG     | NM_001198934.1<br>NM_033450.2<br>NM_001350518.1   | MRP7  |
| ABCC10 R | AGATAACGATGGAGATGACAACC  |   |       |
| ABCG2 F  | TGACGGTGAGAGAAA ACTTACAG | NM_004827.2<br>NM_001257386.2<br>NM_001348985.1<br>NM_001348986.1<br>NM_001348987.1<br>NM_001348988.1<br>NM_001348989.1 | ABCG2 |
| ABCG2 R  | ACCTAACTCTTGAATGACCCTGT  |   |       |

Sintētisko oligonukleotīdu sekvenču veidošanā izmantotas programmas NCBI Primer Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) un Primer 3 ([www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi](http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)), literatūras publikācijas.

### 2.1.3. Laboratorijas materiāli

6. tabula.

Laboratorijas materiāli.

Table 6.

Laboratory materials.

| Nosaukums   | Ražotājs                 | Ražotājvalsts |
|---|--------------------------|---------------|
| 0,2 µm poru filtri (Minisart-Plus)  | Sigma-Aldrich            | Vācija        |
| 1,5 ml mikrocentrifugēšanas stobriņi  | Eppendorf                | ASV           |
| 1,5 ml mikrocentrifugēšanas stobriņi brīvi no nukleāzēm                     | Sarstedt                 | Vācija        |
| 1,6 ml kriokonservēšanas stobriņi   | Sarstedt                 | Vācija        |
| 384 lauciņu optiskās PCR plēves   | Sarstedt                 | Vācija        |
| 96 lauciņu šūnu kultivēšanas plates Standard                                | Sarstedt                 | Vācija        |
| Automātisko pipešu uzgaļi ar filtru (10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl) | Sarstedt                 | Vācija        |
| Automātisko pipešu uzgaļi bez filtra (20 µl; 200 µl; 1000 µl)               | Sarstedt                 | Vācija        |
| Cell + šūnu kultivēšanas flakoni (T25; T75)                                 | Sarstedt                 | Vācija        |
| Centrifugēšanas stobriņi (15 ml; 50 ml)                                     | Sarstedt                 | Vācija        |
| Ķēdīšu stripi (8) ar vāciņiem   | Sarstedt                 | Vācija        |
| PCR optiskās plēves   | Sarstedt                 | Vācija        |
| Kriokonservēšanas trauks Mr. Frosty   | Sigma-Aldrich            | Vācija        |
| Šļirces (3 ml; 30 ml; 50 ml)  | B. Braun                 | Vācija        |
| Šūnu kultivēšanas plates Cell+ (24 lauciņu; 96 lauciņu)                     | Sarstedt                 | Vācija        |
| Vienreizlietojamās plastmasas pipetēšanas vannītes (25 ml)                  | Thermo Fisher Scientific | ASV           |
| Vienreizlietojamās seroloģiskās pipetes (2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml)          | Sarstedt                 | Vācija        |

### 2.1.4. Laboratorijas iekārtas

7. tabula.

Laboratorijas iekārtas.

Table 7.

Laboratory equipment.

| Nosaukums  | Ražotājs      | Ražotājvalsts |
|--|---------------|---------------|
| Analītiskie svāri (ABS-N/ABJ-NM)   | Kern          | Vācija        |
| Attēlu ieguves sistēma UVP PhotoDoc-It   | Analytik Jena | ASV           |
| Autoklāvs NUVE (OT40 L)  | Nuve          | Vācija        |
| Automātiskās pipetes <i>Eppendorf Research</i> (0,5 – 10 µl; 2 – 20 µl; 10 – 100 µl; 20 - 200 µl; 8 kanālu 20 – 200 µl; 200 – 1000 µl) | Eppendorf     | ASV           |
| Centrifūga (LMC-4200C)   | Biosan        | Latvija       |
| Centrifūga 5810R   | Eppendorf     | ASV           |
| CO <sub>2</sub> inkubators ( <i>New Brunswick Galaxy 170s</i> )  | Eppendorf     | ASV           |

|  |                          |               |
|--|--------------------------|---------------|
| Daudzfunkcionāls mikroplašu lasītājs <i>Infinite</i> (M200 PRO)    | Tecan                    | Šveice        |
| Fāzu kontrasta mikroskops ( <i>Leica DM IL LED</i> )               | Leica Microsystems       | Vācija        |
| Gēla elektroforēzes sistēma (FMMS10)                               | Cleaver Scientific Ltd   | Lielbritānija |
| Laminārās gaisa plūsmas darba vieta (AV-100)                       | Telstar                  | Spānija       |
| Ledusskapis ar saldētavu   | Liebherr                 | Vācija        |
| Maisītājs Vorteks (V-1 plus)                                       | Biosan                   | Latvija       |
| Mikrocentrifūga (Velocity 15 $\mu$ )                               | Dynamica                 | Lielbritānija |
| Mikroviļņu krāsns  | Daewoo                   | Lielbritānija |
| Neibauera hemocitometrs ( <i>Bright line</i> )                     | Hausser Scientific       | ASV           |
| Polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) iekārta Veriti 96 lauciņu platēm | Applied Biosystems       | ASV           |
| Seroloģisko pipešu pipetēšanas palīgs S1                           | Thermo Fisher Scientific | ASV           |
| Sildīšanas-dzesēšanas termostats (CH 3-150)                        | Biosan                   | Latvija       |
| Spektrofotometrs NanoDrop ND-1000                                  | Thermo Fisher Scientific | ASV           |
| Strāvas avots elektroforēzes iekārtai (CS-300V)                    | Cleaver Scientific Ltd   | Lielbritānija |
| Termostats (Bio TDB-100)   | Biosan                   | Latvija       |
| Ultrazemas temperatūras saldētava U570                             | Eppendorf                | ASV           |
| UV transluminators Standard Clear View                             | Cleaver Scientific Ltd   | Lielbritānija |
| Ūdens attīrīšanas iekārta (Direct-Q 3,5,8)                         | LABRepCo                 | ASV           |
| Ūdens sildvanna (WB-4MS)   | Biosan                   | Latvija       |
| Velkmes skapis (1200n)   | Cruma                    | Spānija       |
| UV transluminators   | Cleaver Scientific Ltd   | Lielbritānija |
| Reālā laika PCR iekārta ViiA7                                      | Thermo Fisher Scientific | ASV           |

### 2.1.5. Darba šķīdumi

- 1x TrypLE: 9 ml 1 mM EDTA/DPBS, 1 ml 10x TrypLE.
- TrypLE proteolītiskās reakcijas inhibēšanas šķīdums 20 % FBS/DPBS: 40 ml 1x DPBS, 10 ml FBS.
- 50 % trihloretikskābe (TCA): 25 ml 6,1 N TCA, 25 ml dH<sub>2</sub>O. Šķīdumu gatavo velkmes skapī.
- 1 % etiķskābe: 99 ml dH<sub>2</sub>O, 1 ml etiķskābe. Šķīdumu gatavo velkmes skapī.
- SRB 4 mg/ml šķīdums: 200 mg SRB pulvera šķīdina 50 ml 1 % etiķskābē. Šķīdumu gatavo velkmes skapī, pēc pagatavošanas filtrē.
- 10 mM Tris bāze: 60,57 mg Tris pulvera šķīdina 50 ml dH<sub>2</sub>O.
- 70 % etanols: 365 ml 96 % etanols, 135 ml dH<sub>2</sub>O.
- 1 mM EDTA/DPBS: pagatavo 0,05 M EDTA/DPBS (9 ml 1x DPBS, 1 ml 0,5 EDTA), no kura gatavo 1 mM EDTA/DPBS – 49 ml 1x DPBS, 1 ml 0,05 M EDTA/DPBS.
- 1x DPBS: 450 ml dH<sub>2</sub>O, 50 ml 10x DPBS.

- 0,01 % kristālvioletais: pagatavo 0,05 % kristālvioletā šķīdumu (25 mg kristālvioletā šķīdina 50 ml dH<sub>2</sub>O), no kura gatavo 0,01 % šķīdumu – 40 ml dH<sub>2</sub>O, 10 ml 0,05 % kristālvioletais.

- 5,5 mM vinblastīns (VB): 5 mg VB sulfāta šķīdina 1 ml DMSO un filtrē.
- 0,5x TBE buferis: 100 ml 5x TBE bufera pulveris, 900 ml dH<sub>2</sub>O, pH ir 8,3.
- 1,8 % agarozes gels: 1,8 g agarozes pulvera šķīdina 100 ml 0,5x TBE bufera.

### **2.1.6. Šūnu kultivēšanas un saldēšanas barotnes**

- A10: 44,4 ml DMEM:F-12, 5 ml FBS, 500 µl PEN-STREP, 100 µl B-amf.
- A10-: 45 ml DMEM:F-12, 5 ml FBS.
- 0,26 µM DOX/A10-: pagatavo 52 µM DOX A10- barotnē (985,9 µl A10-, 14,1 µl 3,7 mM DOX), no kura pagatavo 0,26 µM DOX/A10- (14,925 ml A10-, 75 µl 52 µM DOX/A10-).
- A20: 2,4 ml DMEM:F-12, 600 µl FBS.
- 10 % DMSO/A20: 1350 µl A20 barotne, 150 µl DMSO.

## **2.2. Metodes**

### **2.2.1. Materiālu un darba vietas sterilizācija**

Darbu ar dzīvām šūnām veic laminārās plūsmas darba vietā. Lamināra sterilizācija un sagatavošana darbam: ieslēdz gaisa plūsmu un UV gaismu uz 15 min, pēc tam ar 70% etanolā samitrinātu papīra salveti notīra darba virsmu, pipetēšanas palīgu, pipetes un citus darbam nepieciešamos piederumus. Pēc darba beigšanas visus piederumus notīra ar etanolā samitrinātu salveti un ieslēdz laminārā UV gaismu uz 15 min.

Pipešu uzgaļus bez filtra un mikrocentrifugēšanas stobriņus, kā arī destilēta ūdens un tukšās pudeles šķīdumu pagatavošanai darbam sagatavo, sterilizējot autoklāvā.

Šūnu kultivēšanas flakonus, plates, šķīdumu stobriņus un pudeles, kā arī citus piederumus ikreiz pirms ievietošanas laminārā un darba sākšanas notīra ar etanolā samitrinātu salveti.

### **2.2.2. Šūnu kultivēšanas metodes**

#### **2.2.2.1. Šūnu atsaldēšana**

1. Saldēšanas stobriņu ar šūnu suspensiju uz 1 min ievieto ūdens sildvannā un pārlicinās, ka šūnu suspensija ir atkususi.

2. Suspensiju pārnes 15 ml stobriņā un tai lēni, pa pilienam, nepārtraukti maisot pievieno 2 ml ūdens sildvannā iepriekš uzsildītas barotnes (A10 vai A10-).

4. Stobriņu centrifugē 8 min pie 1000 apgr/min.
5. Atsūc supernatantu, un šūnas resuspendē 5 ml barotnes. Stobriņu atkārtoti centrifugē kā 4. punktā.
6. Atsūc supernatantu un šūnas resuspendē 2 ml barotnes.
7. Šūnas skaita ar hemocitometru, (2.2.2.3. nodaļa).
8. Šūnu izsēšana:
  - Aprēķina pārsēšanai nepieciešamo šūnu suspensijas tilpumu, kurā ir 500000 dzīvu šūnu;
  - Vienā vai vairākos marķētos T75 flakonos iepilda 7 ml barotnes un flakonu uzglabā inkubatorā līdz šūnu izsēšanas brīdim;
  - Flakonā iepilda aprēķināto šūnu suspensijas tilpumu;
  - Flakonu ievieto un inkubē pie +37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.
9. Pēc 2 dienām flakonos iepilda 7,5 ml svaigas barotnes. Tālākā šūnu kultivēšanas gaitā reizi 2 līdz 4 dienās veic barotnes nomaiņu, atsūcot pusi jeb 7,5 ml no flakonā esošās barotnes un pievienojot jaunu barotni tādā pašā tilpumā.

#### **2.2.2.2. Šūnu tripsinizēšana**

Šūnu tripsinizēšanu veic, kad šūnas kultivēšanas flakonā sasniegušas 70-90 % konfluenci.

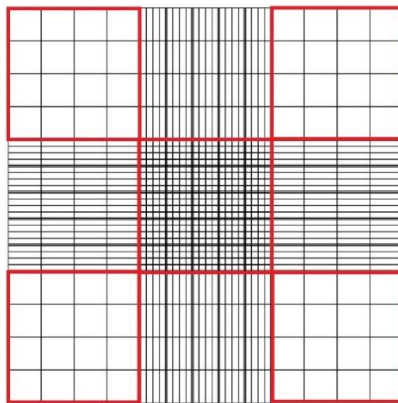
1. No kultivēšanas flakona atsūc visu barotni, un flakona virsmu skalo ar ūdens sildvannā iepriekš uzsildītu 1x DPBS (T25 – 2 ml, T75 – 4 ml).
2. Flakona virsmu atkārtoti skalo ar 1 mM EDTA/DPBS tādā pašā tilpumā kā 1. solī.
3. Kultivēšanas flakonā iepilda iepriekš ūdens sildvannā uzsildītu TrypLE (T25 – 1 ml, T75 – 2 ml), un ievieto inkubatorā uz 5 min.
4. Pēc inkubācijas mikroskopējot pārlicinās, ka šūnas ir atdalījušās no virsmas.
5. Flakonā iepilda iepriekš uzsildītu 20 % FBS/DPBS tādā pašā tilpumā kā 1. solī.
6. Suspensiju iepilda marķētā 15 ml stobriņā. Lai savāktu visas šūnas, flakonu vismaz divas reizes skalo ar 1x DPBS tādā pašā tilpumā kā 1. solī un šķīdumu iepilda tajā pašā stobriņā.
7. Stobriņu centrifugē 10 min pie 1000 apgr/min, +22 °C.
8. Atsūc supernatantu, un šūnas resuspendē kultivēšanas barotnē. Barotnes tilpumu pielāgo sagaidāmajam šūnu skaitam tā, lai vienā ml būtu aptuveni viens miljons šūnu.
9. Nosaka šūnu skaitu suspensijā, veicot šūnu skaitīšanu ar hemocitometru.

#### **2.2.2.3. Šūnu skaitīšana ar hemocitometru**

1. Šūnas tripsinizē, kā norādīts 2.2.2.2. nodaļā.

2. Divos 96 lauciņu Standard plates lauciņos iepilda 7 µl tripānzilā un 7 µl pagatavotās šūnu suspensijas.

3. Katrā hemocitometra kamerā iepilda 10 µl no 2. solī pagatavotā maisījuma, un, mikroskopējot 10x palielinājumā (attēla palielinājums – 100x), veic dzīvo un mirušo šūnu skaitīšanu piecos skaitīšanas režģa laukos (5x 0,1 µl) (1. attēls). Mikroskopā redzamās zili iekrāsotās šūnas nav dzīvotspējīgas, savukārt neiekrašotās – ir.



1. attēls. Hemocitometra šūnu skaitīšanas kameras režģa shematiskais attēls. Ar sarkanu kontūru – kvadrāti, kuros skaita šūnas (ar izmaiņām no [www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber](http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber)).

Figure 1. Schematic illustration of the chamber counting grid in haemocytometer. With red countour – squares in which cells are counted (with modifications from [www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber](http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber)).

4. Aprēķina dzīvo un mirušo šūnu skaitu suspensijā pēc formulas:

$$Y = \frac{(X_1 + X_2) * V}{0,5},$$

kur Y – kopējais dzīvo vai mirušo šūnu skaits suspensijā, X<sub>1</sub> un X<sub>2</sub> – dzīvo vai mirušo šūnu skaits vienā skaitīšanas atkārtojumā, V – kopējais šūnu suspensijas tilpums (µl).

5. Aprēķina turpmākām darbībām, piemēram, pārsēšanai daudzlauciņu platēs vai flakonos, nepieciešamo šūnu suspensijas tilpumu un veic šūnu pārsēšanu, izsēšanu eksperimentiem, saldēšanu vai lizēšanu.

#### 2.2.2.4. Šūnu saldēšana

1. Šūnas tripsinizē un skaita atbilstoši aprakstītajai darba gaitai 2.2.2.2. un 2.2.2.3. nodaļā.

2. Ieteicams saldēt vismaz 3 šūnu stoku (1,5 miljoni šūnu katrā). Piemēram, 3 stoku saldēšanai aprēķina suspensijas tilpumu, kurā ir 4,5 miljoni šūnu. Turpmākajos soļos minētie darba šķīduma tilpumi ir aprēķināti 3 stoku saldēšanai.

3. Aprēķināto šūnu suspensijas tilpumu iepilda 15 ml stobriņā un pievieno 1x DPBS līdz 10 ml atzīmei.

4. Stobriņu centrifugē 5 min pie 1200 apgr/min.

5. Atsūc supernatantu un resuspendē šūnas 1,5 ml A20 barotnē.
6. Ledusskapī (+4 °C) uz 30 min līdz 1 h ievieto pagatavoto šūnu suspensiju, kā arī A20 un 10 % DMSO/A20 barotnes un saldēšanas trauku. Atdzesē arī sagatavotos kriostobriņus, tos ievietojot saldētavā (-20 °C).
7. Sagatavo darba vietu: uz lamināra darba virsmas novieto aukstuma blokus, ko apklāj ar salvetēm, uz tiem – statīvus, kriostobriņus, barotnes un šūnu suspensiju.
8. Resuspendē šūnu suspensiju, to lēni apvieno ar 1,5 ml 10 % DMSO/A20.
9. Kriostobriņos iepilda 1 ml pagatavotās suspensijas, tos ievieto saldēšanas traukā.
10. Saldēšanas trauku ar šūnām ievieto saldētavā (-80 °C). Pēc diennakts saldēšanas no kriokonservēšanas trauka izņem saldētos šūnu stokus un uzglabā ultrazemas temperatūras saldētavā (-80 °C), bet trauku uzglabā istabas temperatūrā.

#### **2.2.2.5. Šūnu lizātu sagatavošana**

1. Šūnu lizēšanu veic, izmantojot TRI reaģentu atbilstoši ražotāja norādījumiem.
2. Pēc šūnu tripsinizēšanas un skaitīšanas (2.2.2.2. un 2.2.2.3. nodaļa) vienā vai vairākos 1,5 ml mikrocentrifugēšanas stobriņos iepilda šūnu suspensijas tilpumu ar 1 miljonu šūnām.
3. Mikrocentrifugā stobriņus centrifugē 3 min pie 14000 apgr/min.
4. Veic šūnu skalošanu: atsūc supernatantu, šūnas resuspendē 500 µl 1x DPBS un atkārtoti centrifugē pie iestatījumiem kā 3. punktā.
5. Šūnu lizēšana: no stobriņiem atsūc supernatantu, iepilda 300 µl TRI reaģenta un stobriņus vorteksē, kamēr vairs nav novērojami agregāti.
6. Šūnu lizātus uzglabā saldētavā -20 °C vai -80 °C ilgtermiņa uzglabāšanai.

#### **2.2.2.6. Suspensijas šūnu skaitīšana šūnu kultūras barotnes nomaiņas laikā**

1. No flakona lēni atsūc visu suspensiju un iepilda 15 ml stobriņā.
2. Flakonā iepilda 25 % no nepieciešamā gala tilpuma (T75 – 3,5 ml) un ievieto inkubatorā.
3. Suspensijas stobriņu centrifugē 9 min pie 900 apgr/min.
4. Lēni atsūc supernatantu un iepilda jaunā 15 ml stobriņā.
5. Šūnas resuspendē 1000 µl A10 barotnes.
6. Veic šūnu skaitīšanu ar hemocitometru (2.2.2.3. nodaļas 2.-4. solis).
7. Kultivēšanas flakonā iepilda supernatantu tilpumā, kas veido 50 % no nepieciešamā gala tilpuma (T75 – 7,5 ml).
8. Šūnu suspensijas stobriņā lēni iepilda atlikušo (iepildīšanai flakonā nepieciešamo) barotnes tilpumu, šūnu suspensiju samaisa un iepilda kultivēšanas flakonā.

9. Flakonu ievieto inkubatorā un šūnas kultivē atbilstoši eksperimenta nosacījumiem.

### 2.2.2.7. Šūnu punktveida apstrāde ar doksorubicīnu

Šūnu kultūras īslaicīgu apstrādi ar doksorubicīnu (DOX) A10- barotnē veic, kad kultūra sasniegusi 50-60 % konfluenci.

1. No kultivēšanas flakona (T75) lēni atsūc visu barotni un flakona virsmu 1x skalo ar 4 ml DPBS.

2. Flakonā iepilda 7,5 ml 0,26  $\mu$ M DOX/A10- barotnē.

3. Kultivēšanas flakonu ievieto inkubatorā un šūnas kultivē 48 h.

4. Atsūc visu barotni un skalo virsmu kā 1. solī.

5. Flakonā iepilda 7,5 ml A10 barotnes, un šūnas kultivē 24 h.

6. Šūnas tripsinizē un sagatavo analīzēm.

### 2.2.3. B sulforodamīna (SRB) tests

B sulforodamīna (SRB) testa protokols izveidots, vadoties pēc Skehan *et al.* ar modifikācijām (Skehan *et al.*, 1990).

1. Šūnas tripsinizē un skaita ar hemocitometru (skatīt 2.2.2.2. un 2.2.2.3. nodaļu).

2. Izsēj nepieciešamo šūnu skaitu vienas vai vairāku 96 lauciņu Cell+ plašu bedrītēs un kultivē inkubatorā atbilstoši plānotā eksperimenta nosacījumiem.

3. Šūnu fiksēšana:

- Ar daudzkanālu pipeti atsūc tādu barotnes tilpumu, lai lauciņos paliktu 100  $\mu$ l barotnes.

- Lauciņos barotnei pievieno 25  $\mu$ l 50 % trihlloretiķskābes (TCA), un plates inkubē ledusskapī (+4 °C) 1 h.

- No lauciņiem atsūc visu šķīdumu.

- Ar dH<sub>2</sub>O plates četras reizes skalo zem tekošas ūdens strūkļas, izvairoties no ūdens tecēšanas lauciņos tieši no augšas.

- Plates žāvē uz papīra salvetēm, un turpmākos soļus veic jebkurā laikā pēc pilnīgas plates nožūšanas.

4. Šūnu krāsošana: lauciņos ar nofiksētām šūnām iepilda 70  $\mu$ l SRB šķīduma un plates inkubē istabas temperatūrā 30 min.

5. Atsūc visu šķīdumu un šūnas skalo:

- Lauciņos iepilda 100  $\mu$ l 1 % etiķskābes un inkubē istabas temperatūrā 5 min.

- Atsūc visu šķīdumu.

- Skalošanu veic līdz sešām reizēm, viena eksperimenta ietvaros saglabājot nemainīgu skalošanas reižu skaitu.

- Plati žāvē istabas temperatūrā, un turpmākos soļus veic pēc pilnīgas plates nožūšanas.

6. Mērījumu nolasīšana:

- Lauciņos iepilda 100 µl 10 mM Tris bāzes šķīduma.
- Plati ievieto plašu lasītājā un veic kratīšanu pie iestatījumiem 10 min orbitālā kratīšana ar 1 mm amplitūdu.

- Šķīdumus no lauciņiem pārnes jaunā 96 lauciņu Standard platē.
- Plati ievieto plašu lasītājā un veic absorbcijas mērījumus pie 565 nm viļņu garuma.

#### 2.2.4. Citotoksicitātes tests

Citotoksicitātes testu izmanto šūnu jutības noteikšanai pret citotoksiskiem savienojumiem doksorubicīnu (DOX), vinblastīnu (VB), fluorouracilu (FU) un cisplatīnu (CIS).

1. Šūnas tripsinizē un skaita, kā aprakstīts 2.2.2.2. un 2.2.2.3. nodaļā.

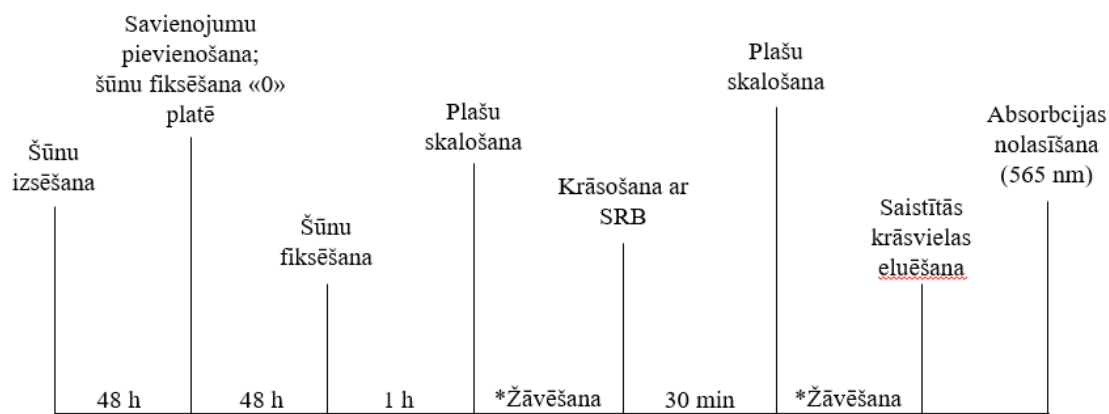
2. Izmantojot daudzkanālu pipeti un pipetēšanas vannīti, sešu marķētu 96 lauciņu Cell+ plašu 60 lauciņos katrā izsēj 5000 šūnas 100 µl A10- barotnes. Šūnu suspensiju nepilda A un H rindu, kā arī 1. un 12. kolonnas lauciņos. Tukšajos lauciņos iepilda 100 µl A10- barotnes (negatīvā kontrole (NK)) un plates ievieto inkubatorā. Katra savienojuma jutības pārbaudei, kā arī pozitīvajai kontrolei (PK) un nulles dienai (0 D) izmanto atsevišķu plati.

3. Pēc 48 h kultūrai attiecībā 1:1 pievieno 100 µl katra savienojuma A10- barotnē 10 dažādās koncentrācijās (skatīt 1. pielikumu), bet PK plates lauciņos un visu plašu NK lauciņos iepilda 100 µl A10- barotnes. Savienojumu šķīdumus pagatavo secīgu atšķaidījumu sērijā, stundu pirms pievienošanas atkausējot medikamenta alikvotu, bet atšķaidījumus pagatavojot īsi pirms pievienošanas šūnām.

4. 48 h pēc šūnu izsēšanas veic fiksēšanu un skalošanu 0 D platei, kā aprakstīts 2.2.3. nodaļas 3. punktā. Fiksē gan lauciņus ar šūnām, gan NK lauciņus.

5. 48 h pēc pārbaudāmo savienojumu pievienošanas (96 h pēc izsēšanas) visās atlikušajās platēs fiksē lauciņus ar šūnām un NK lauciņus un plates skalo (2.2.3. nodaļas 3. punkts).

6. Pēc pilnīgas plašu nožūšanas veic B-sulforodamīna (SRB) testu (skatīt 2.2.3. nodaļas 4.-6. punktu).



2. attēls. Citotoksicitātes testa norise laikā 1. – 6. tekstā aprakstītais metodes solis. Ar zvaigznīti atzīmēti soļi, pēc kuru veikšanas eksperimentā izmantotās plātes var uzglabāt neierobežotu laiku.

Figure 2. Time scale of cytotoxicity assay: steps 1 – 6 from the text. The steps, after which the plates may be stored indefinitely, are marked with stars.

7. Iegūtos datus apstrādā un analizē programmās R un RStudio, izmantojot pakotni GRmetrics. Iespējamo tehnisko neprecizitāšu dēļ katra pētāmā lieluma tehnisko atkārtojumu kopai veic datu izkliedes pārbaudi, un turpmākā datu analizē neiekļauj izlecošos mērījumus pēc IQR kritērija (mērījumus, kas mazāki par pirmās kvartiles ( $Q_1$ ) un 1,5 starpkvartiļu (IQR) starpību vai lielāki par  $Q_3$  un 1,5 IQR summu). Šūnu jutības noteikšanai pret katru ķīmijterapijas savienojumu izmanto R pakotni *GRMetrics*. Šūnu jutību izsaka kā IC50 un GR50 – koncentrācija, pie kuras augšanas ātrums tiek inhibēts par 50 %. Atšķirībā no IC50, GR50 vērtība ir normalizēta, un to neietekmē šūnu dalīšanās reižu skaits citotoksicitātes testa norises laikā (Hafner *et al.*, 2016).

### 2.2.5. Augšanas līkņu veidošana

1. Šūnas tripsinizē un skaita, kā aprakstīts iepriekš (2.2.2.2. un 2.2.2.3. nodaļa).
2. Šūnu izsēšana:
  - Pagatavo šūnu suspensiju ar plānotajam eksperimentam nepieciešamo šūnu skaitu - 500 līdz 11000 šūnas/100  $\mu$ l A10- barotnē.
  - Sagatavo un marķē vienu vai vairākas 96 lauciņu Cell+ plates atkarībā no eksperimenta plānojuma un ilguma.
  - Izmantojot daudzkanālu pipeti un pipetēšanas vannīti, lauciņos izsēj 100  $\mu$ l šūnu suspensijas.
  - Plātes ievieto un inkubē pie +37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.
3. 2.- 3. dienā pēc izsēšanas un turpmāk katru otro dienu maina barotni – no katra lauciņa lēni atsūc 35  $\mu$ l barotnes un tādā pašā tilpumā pievieno jaunu A10- barotni.

4. Šūnu fiksēšanu veic ik pēc 24-48 h pēc izsēšanas, un, kad visos lauciņos šūnas ir nofiksētas, veic SRB testu (skatīt 2.2.3.nodaļas 3.-6.punktu).

5. No iegūtajiem datiem aprēķina populācijas dubultošanās laiku (PDT) pēc formulas:

$$PDT = \frac{T * \ln 2}{\ln\left(\frac{OD_{beigu}}{OD_{sākuma}}\right)}$$

kur T – šūnu kultivēšanas laiks eksponenciālās augšanas fāzē (h) (nosaka pēc iegūtajiem rezultātiem), OD beigu un sākuma – optiskā blīvuma (OD) tehnisko replikātu vidējā vērtība izvēlētā šūnu augšanas posma sākumā un beigās.

6. Aprēķina PDT intervālu (maksimālo un minimālo vērtību), izmantojot abu PDT aprēķinā iekļauto augšanas posma sākuma un beigu punktu OD mērījumu standartnovirzi. Aprēķinā neiekļauj izlecošos mērījumus pēc IQR kritērija.

### 2.2.6. Klonogenitātes tests

1. Šūnas tripsinizē un skaita ar hemocitometru, kā aprakstīts 2.2.2.2. un 2.2.2.3. nodaļā.

2. Šūnu izsēšana koloniju veidošanās testam:

- Secīgu atšķaidījumu sērijā trīs atkārtojumos pagatavo šūnu suspensiju (20 šūnas/ 1 ml A10-);
- Sagatavo un marķē 24 lauciņu Cell+ plati;
- Ar 1000 µl pipeti izsēj pa 1000 µl šūnu suspensijas katrā plates lauciņā.

3. Plati inkubē +37 °C 5 % CO<sub>2</sub> 11 diennaktis.

4. Šūnu fiksēšana:

- No lauciņiem atsūc 500 µl barotnes.
- Lauciņos iepilda 125 µl ledusskapī (+4 °C) atdzesētas 50 % TCA.
- Plati 1 h inkubē ledusskapī (+4 °C).

5. Plates skalošana:

- No lauciņiem atsūc visu šķīdumu.
- 4 reizes skalo zem tekoša attīrīta ūdens strūkļas, izvairoties no ūdens tecēšanas lauciņos no augšas.
- Plati žāvē istabas temperatūrā uz papīra salvetēm, un turpmākos soļus veic pēc plašu nožūšanas.

6. Šūnu krāsošana ar 0,01 % kristālvioleto:

- Lauciņos iepilda 250 µl 0,01 % kristālvioletā.
- Plati inkubē istabas temperatūrā 30 min.
- Veic plates skalošanu un žāvēšanu kā aprakstīts 5. solī.

7. Veic koloniju skaitīšanu.

8. Iegūtos datus apstrādā un analizē programmās R un RStudio. Šūnu koloniju veidošanās spēju pēc formulas:

$$Y = \frac{K}{20} * 100,$$

Y – koloniju veidošanas spēja (%), K – koloniju skaits lauciņā, 20 – izsēto šūnu skaits.

Koloniju veidošanas spējas noteikšanai aprēķina atkārtojumu vidējo vērtību un standartnovirzi. Lieluma atšķirību būtiskumu dažādām kultūrām nosaka ar Stjudenta T testu.

## **2.2.7. Metodes gēnu transkriptomiskās ekspresijas līmeņa noteikšanai**

### **2.2.7.1. RNS izdalīšana**

RNS izdalīšanu veic ar TRIzol reaģentu, un darba gaitu veic pēc ražotāja norādēm (Thermo Fisher Scientific).

1. RNS izdala no lizātiem, kuru iegūšana aprakstīta 2.2.2.5. nodaļā.
2. Šūnu lizātu atkausē un inkubē istabas temperatūrā 5 min.
3. Lizātam pievieno 30 µl 1-bromo-3-hloropropānu, ar vorteksa maisītāju šķīdumu maisa 15 sekundes un inkubē istabas temperatūrā 3 min.
4. Stobriņu centrifugē 15 min pie iestatījumiem 12000 g, +4 °C.
5. Augšējo fāzi pārnes jaunā no nukleāzēm brīvā 1,5 ml mikrocentrifugēšanas stobriņā.
6. Pievieno 150 µl izopropanola, stobriņu invertē un inkubē istabas temperatūrā 10 min.
7. Centrifugē pie iestatījumiem 10 min, 12000 g, +4 °C.
8. Atsūc supernatantu, RNS nogulsnēm pievieno 300 µl 75 % etanola un maisa dažas sekundes, izmantojot vorteksa maisītāju.
9. Paraugu centrifugē 8 min pie iestatījumiem 8880 g, istabas temperatūrā.
10. Atsūc supernatantu, un žāvē nogulsnes istabas temperatūrā 10 min.
11. Nogulsnēm pievieno 37,5 µl no nukleāzēm brīvu ūdeni un inkubē pie +55 °C 10 min.
12. Ar spektrofotometru NanoDrop mēra RNS koncentrāciju 1,5 µl parauga, kā referenci izmantojot no nukleāzēm brīvu ūdeni.
13. RNS kvalitāti pārbauda agarozes gela elektroforēzē (2.2.7.6. nodaļa).
14. RNS paraugu uzglabā ultrazemas temperatūras saldētavā (-80 °C).

### **2.2.7.2. RNS apstrāde ar DNāzi I**

Apstrādi ar DNāzi veic, lai atbrīvotos no iespējama genomiskās DNS piesārņojuma paraugā, un darbu veic atbilstoši ražotāja norādījumiem (Sigma Aldrich).

1. Pagatavo reakcijas maisījumu (vienai reakcijai):

|                                     |                  |
|-------------------------------------|------------------|
| RNS šķīdums                         | 35 µl            |
| 10x DNāzes inkubācijas buferšķīdums | 5 µl             |
| DNāze I (10 U/µl)                   | 0,2 µl/ 1 µg RNS |
| No nukleāzēm brīvs H <sub>2</sub> O | Līdz kopējam V   |
| <hr/>                               |                  |
| Kopējais V                          | 50 µl            |

2. Reakcijas maisījumu inkubē istabas temperatūrā 30 min.

3. Maisījumam pievieno 5 µl 50 mM EDTA, inkubē pie +65 °C 10 min.

4. Veic tālāku RNS attīrīšanu (2.2.7.3. nodaļa).

### 2.2.7.3. RNS attīrīšana pēc apstrādes ar DNāzi I

Attīrīšanu no DNāzes apstrādes reakcijas reaģentiem veic ar NucleoSpin RNS XS attīrīšanas komplektu atbilstoši ražotāja norādījumiem (Macherey Nagel).

1. Stobriņā pievieno 45 µl H<sub>2</sub>O un 100 µl RCU buferšķīdumu, 10 sekundes maisa šķīdumu ar vorteksa maisītāju.

2. Šķīdumu (200 µl) pārnes kolonnā, centrifugē divas reizes – pie iestatījumiem 2000 g 30 sekundes, pēc tam 11000 g 30 sekundes.

3. Kolonnu pārnes uz supernatanta savākšanas stobriņu.

4. Uznes 400 µl RA3 bufera un centrifugē pie iestatījumiem 11000 g, 30 sekundes.

5. Supernatantu no stobriņa izlej, kolonnu ievieto atpakaļ stobriņā.

6. Kolonnā ienes 200 µl RA3 bufera un centrifugē pie 11000 g 2 minūtes.

7. Kolonnu ievieto no nukleāzēm brīvā 1,5 ml mikrocentrifugēšanas stobriņā, uz kolonnas uznes 17 µl no nukleāzēm brīvu ūdeni un centrifugē pie 11000 g 30 sekundes.

8. Eluētās RNS koncentrāciju mēra ar NanoDrop spektrofotometru, par referenci izmantojot ūdeni bez nukleāzēm.

9. RNS paraugu uzglabā ultrazemas temperatūras saldētavā (-80 °C).

### 2.2.7.4. Komplementārās DNS (kDNS) sintēze

kDNS sintēzei izmanto augstas kapacitātes kDNS reversās transkripcijas reaģentu komplektu, un darbu veic kā norādīts ražotāja protokolā (Thermo Fisher Scientific).

1. Pagatavo reakcijas maisījumu (tilpums vienai reakcijai):

|  |        |
|--|--------|
| 10x randomo heksamēru praimeru šķīdums     | 2 μl   |
| 10x reakcijas buferšķīdums                 | 2 μl   |
| 25x dNTP maisījums (100 mM)                | 0,8 μl |
| RiboLock ribonukleāžu inhibitors (40 U/μl) | 1 μl   |
| MultiScribe reversā transkriptāze          | 1 μl   |
| No nukleāzēm brīvs H <sub>2</sub> O        | 3,2 μl |
| <hr/>                                      |        |
| Kopējais V                                 | 10 μl  |

2. Reakcijas maisījumu iepilda 1,5 ml no nukleāzēm brīvā mikrocentrifugēšanas stobriņā, un tilpuma attiecībā 1:1 apvieno ar 2 mg kRNS paraugu (kam nepieciešamības gadījumā pievienots no nukleāzēm attīrīts H<sub>2</sub>O). kDNS sintēzei tika izmantoti 2 μg RNS 10 μl H<sub>2</sub>O.

3. kDNS sintēzi veic PCR iekārtā sekojošos apstākļos: 10 min +25 °C, 120 min +37 °C, 5 min +85 °C, ∞ min +4 °C.

4. Sintezētās kDNS pārbaudi veic, izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju (PCR) (2.2.7.5. nodaļa) un agarozes gela elektroforēzi (2.2.7.6. nodaļa). PCR reakciju veic ar ACTB sintezēto oligonukleotīdu pāri mRNS, lai pārlicinātos par cDNS sintēzi un pārbaudītu iespējamu genomiskās DNS piesārņojumu. Produktu vizualizē agarozes gela elektroforēzē, lai noteiktu PCR reakcijas produktu skaitu un aptuvenu garumu.

5. Sintezēto kDNS ievieto ledusskapī (+4 °C) īstermiņa uzglabāšanai (ne ilgāk par diennakti) vai saldētavā (-20 °C).

### 2.2.7.5. Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR)

PCR reakcijai izmanto PCR komplektu (Solis BioDyne) atbilstoši ražotāja norādījumiem.

1. Pagatavo reakcijas maisījumu (reaģentu tilpumi vienai reakcijai):

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| 10x reakcijas buferšķīdums BD        | 1,5 μl |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)            | 1,2 μl |
| dNTP maisījums (2,5 mM)              | 1,2 μl |
| H <sub>2</sub> O                     | 9,4 μl |
| Sintētisko oligonukleotīdu maisījums | 0,5 μl |
| FIREPol DNS polimerāze (5U/μl)       | 0,2 μl |
| <hr/>                                |        |
| Kopējais V                           | 15 μl  |

2. Reakcijai pievieno 1 μl kDNS, kas atšķaidīts līdz gala koncentrācijai 5 ng/μl.

3. PCR amplifikācijas iekārtā veic PCR reakciju pie iestatījumiem:

|        |        |       |
|--------|--------|-------|
| +95 °C | 10 min |       |
| +95 °C | 15 sek | } 30x |
| +58 °C | 30 sek |       |
| +72 °C | 30 sek |       |
| +72 °C | 8 min  |       |
| +4 °C  | ∞      |       |

4. PCR produktu vizualizē agarozes gela elektroforēzē (2.2.7.6. nodaļa)

### 2.2.7.6. Agarozes gela elektroforēze

1. Pagatavo 1,8 % agarozes/0,5x TBE bufera šķīdumu un silda mikroviļņu krāsnī līdz pulveris ir pilnībā izšķīdis.

2. Agarozes gela šķīdumu istabas temperatūrā atdzesē līdz aptuveni +55 °C un pievieno 1 µl 1 mg/ml etīdija bromīda.

3. Šķīdumu ielej elektroforēzes tanka vanniņā, kas norobežota ar speiseriem, aptuveni 5 mm biezumā un atdzesē istabas temperatūrā, līdz agaroze ir sapolimerizējusies.

4. Elektroforēzes tankā izņem speiserus, ielej 0,5x TBE buferi tā, lai ar buferi būtu noklāta visa gela virsma, un izņem ķemmītes.

5. PCR maisījumam pievieno 6x uznešanas krāsvielu attiecībā 5:1, sajauc un uz gela uznes 7 µl. Atsevišķās bedrītēs iepilda pa 4,5 µl DNS garuma marķiera.

6. Gela elektroforēzes sistēmu pieslēdz strāvas avotam (8 V/cm) uz aptuveni 20-25 min.

7. Elektroforēzes gelu aplūko UV gaismas transiluminatorā un fotografē.

### 2.2.7.7. Kvantitatīvā reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija (qPCR)

qPCR veic ar FIREPol EvaGreen qPCR reaģentu komplektu (Solis BioDyne) atbilstoši ražotāja norādēm.

1. Pagatavo reakcijas maisījumu (tilpumi vienai reakcijai):

|   |        |
|---|--------|
| kDNS (5 ng/µl)                                    | 1 µl   |
| Sintētisko oligonukleotīdu maisījums (10 pmol/µl) | 0,5 µl |
| 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR maisījums            | 1,4 µl |
| H <sub>2</sub> O                                  | 5,1 µl |
| <hr/>   |        |
| Kopējais V  | 7 µl   |

2. Amplifikācijas reakciju veic, izmantojot ViiA7 qPCR iekārtu pie iestatījumiem:

|        |        |       |
|--------|--------|-------|
| +95 °C | 10 min | } 40x |
| +95 °C | 15 sek |       |
| +58 °C | 30 sek |       |
| +72 °C | 30 sek |       |

3. Veic iegūto datu apstrādi un analīzi. Katram pārbaudītā gēna tehniskajam replikātam veic kvalitātes kontroli, pēc kuras – datu analīzi.

- Kvalitātes kontrole: pārbauda produktu kušanas un amplifikācijas līknes. Ja kušanas līknēs radzami vairāki pīķi, qPCR produktu pārbauda ar agarozes gela elektroforēzi un, ja novērojami dažāda garuma produkti, šos kultūras un/vai gēna datus analīzē neiekļauj. Ja amplifikācijas līkne vienā no triplikātiem nerasniedz amplifikācijas sliekšni, konkrēto mērījumu izslēdz no analīzes.
- Kvalitātes kritēriji: datu analīzē neiekļauj izlecošos mērījumus (Ct vērtības), kas atrodas vairāk nekā trīs standartnoviržu attālumā no triplikāta vidējās vērtības.
- Ekspresijas robežvērtības: gēnu par ekspresētu paraugā pieņem tad, ja vidējā atkārtojumu Ct vērtība ir mazāka par 35.
- Normalizēšana: gēnu transkriptomisko ekspresiju katrā kultūrā normalizē pret endogēnās kontroles gēniem (*ACTB*, *18S rRNA*, *RNA28 S5*), iegūstot dCt vērtību.
- Gēnu ekspresijas salīdzinājums: ekspresijas izmaiņas izsaka relatīvi pret kontroles kultūru (bez doksorubicīna apstrādes kultivēšanas gaitā), izmantojot ddCt vērtību un aprēķinot relatīvo izmaiņu reižu skaitu (RQ) (Livak & Schmittgen, 2001). Ekspresijas izmaiņu statistisko būtiskumu nosaka ar Stjūdentu T-testu, salīdzinot gēnu dCt vērtības.

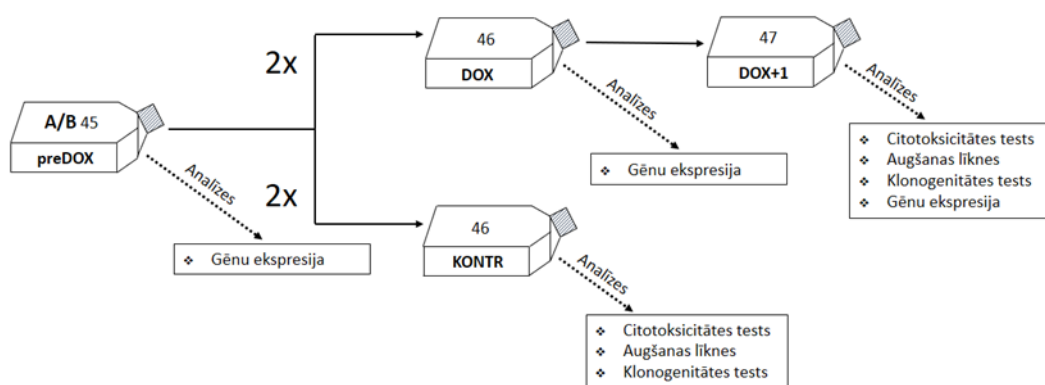
### 2.2.8. Eksperimenta dizains

Lai noskaidrotu, kā īslaicīga doksorubicīna iedarbība ietekmē MDA-MB-231 jutību pret pētītajiem citotoksiskajiem savienojumiem un vai tā palielina cilmsūnības izpausmes šūnu populācijā, MDA-MB-231 kultūra pēc 50-60 % konfluences sasniegšanas 48 h tika pakļauta 0,26 μM doksorubicīna iedarbībai, un pārsēšana tika veikta vēl 24 h pēc doksorubicīnu saturošās barotnes nomaiņas. Pēc pusmiljona šūnu izsēšanas T75 flakonā pārsētā kultūra (DOX+1 pasāža) tika kultivēta līdz 80 % konfluences. Eksperiments tika veikts divos bioloģiskajos atkārtojumos (A un B), un katrs no bioloģiskajiem atkārtojumiem – divos replikātos. Kultūras A un B ir uzskatāmas par bioloģiskajiem atkārtojumiem, jo tās tika atdalītas

12 subkultivēšanas reizes pirms eksperimenta sākuma. Pētījums sastāvēja no diviem posmiem – metožu optimizēšana un doksorubicīna ietekmes novērtēšana (jutības izmaiņas pret ķīmijterapijas savienojumiem, ABC saimes gēnu ekspresijas, augšanas raksturlielumu un cilmsūnības izmaiņas).

Eksperimentā rezistentu šūnu iegūšanai šūnas tika plānots apstrādāt ar doksorubicīnu klīniski nozīmīgā koncentrācijā, tomēr konstatētās doksorubicīna koncentrācijas plazmā variē no 1,4 līdz 34,3  $\mu\text{mol/l}$  un potenciāli vēža šūnu uzņemtā doksorubicīna koncentrācija ir mērāma nanomolārās vērtībās (Smith, 2006). Tā kā literatūrā informācija par doksorubicīna noārdīšanās parametriem un koncentrācijas izmaiņām plazmā ir neviennozīmīga, punktveida apstrādei eksperimentā tika izvēlēts 0,26  $\mu\text{M}$  doksorubicīns, balstoties uz aprēķināto IC50 vērtību normālām MDA-MB-231 šūnām vienā no izmēģinājuma citotoksicitātes testiem.

Sasniedzot 45. pasāžu, šūnu kultūras A un B tika sadalītas četrās kultūrās, lai abas kultūras divos atkārtojumos raksturotu bez doksorubicīna ekspozīcijas (kontroles kultūras), bet divas kultūras pakļautu doksorubicīna ietekmei (3. attēls).



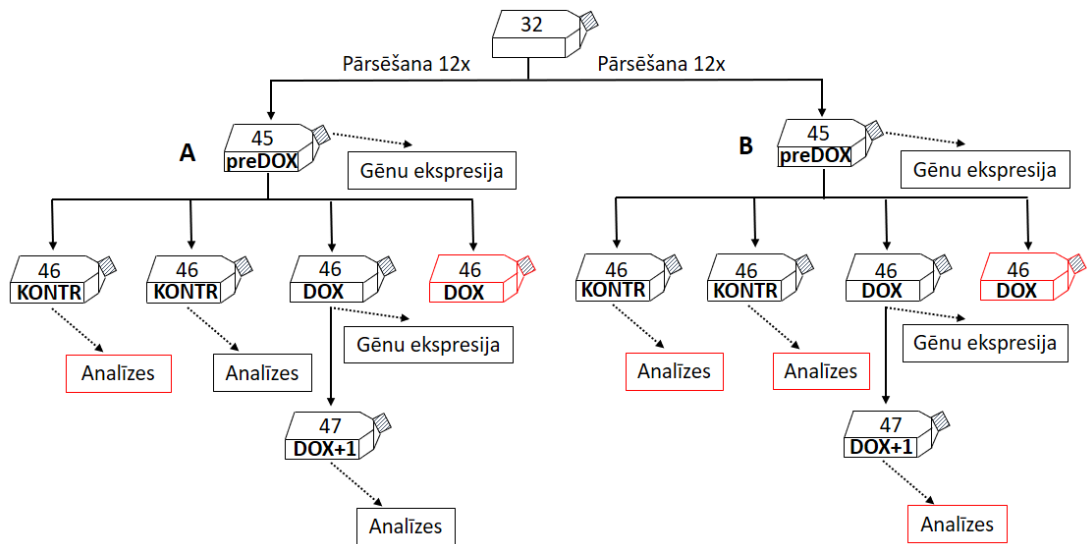
3. attēls. Eksperimenta otrais posms: šūnu kultūru A un B sadalīšana analīzēm ar un bez doksorubicīna ekspozīcijas. Ar cipariem norādītas kultūru pasāžas, to apzīmējumi: preDOX – replikāta sākotnējā kultūra, DOX – pasāža, kuras laikā kultūru apstrādā ar doksorubicīnu, DOX+1 - pasāža pēc doksorubicīna apstrādes, KONTR – kontroles kultūra.

Figure 3. Second stage of experiment: division of cell cultures A and B for analysis with and without doxorubicin exposition. The passages of cell cultures are shown with numbers, passages are further marked with: preDOX – the original culture of each replicate, DOX – the passage during which the cell culture is treated with doxorubicin, DOX+1 - indicates the passage after doxorubicin treatment, KONTR – control culture.

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. Pret doksorubicīnu rezistentu MDA-MB-231 apakšpopulāciju selekcija pēc īslaicīgas doksorubicīna ekspozīcijas

Ekspérimenta bioloģisko replikātu A un B kultūras tika sadalītas četrās kultūrās, taču kontaminācijas dēļ nebija iespējams iegūt visas turpmākai eksperimenta gaitai nepieciešamās kultūras un veikt visas plānotās analīzes (4. attēls). Tā kā divas no doksorubicīna iedarbībai pakļautajām kultūrām nebija iespējams izmantot, turpmāka kultivēšana tika veikta ar vienu tehnisko atkārtojumu no katra bioloģiskā atkārtojuma. Abām 46. pasāžas kontroles un DOX+1 pasāžas replikāta B kultūrām nebija iespējams iegūt analīžu rezultātus, tādēļ visu plānoto analīžu rezultāti kontroles un doksorubicīna ietekmei pakļautā kultūrā tika iegūti un analizēti replikātam A.

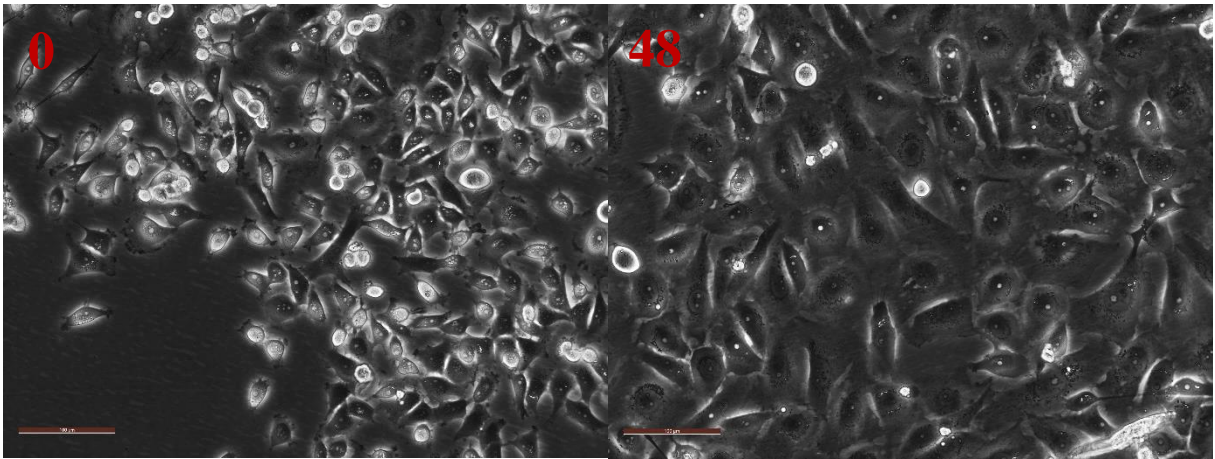


4. attēls. Ekspérimenta šūnu kultūru un analīžu pārskats. Ar sarkanu atzīmētas kultūras un analīzes, kuras kontaminācijas dēļ iegūt nebija iespējams.

Figure 4. Summary of experimental cell cultures and analyses. In red – the cultures and analyses that were not obtained due to contamination.

#### 3.2. Šūnu morfoloģijas un proliferācijas ātruma izmaiņas pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu

Apstrādes laikā ar doksorubicīnu un pēc tās DOX pasāžas kultūrā tika novērots lielizmēra šūnu īpatsvara pieaugums, kas ar doksorubicīnu neapstrādātā MDA-MB-231 šūnu populācijā sastopamas nelielā skaitā (5. attēls).



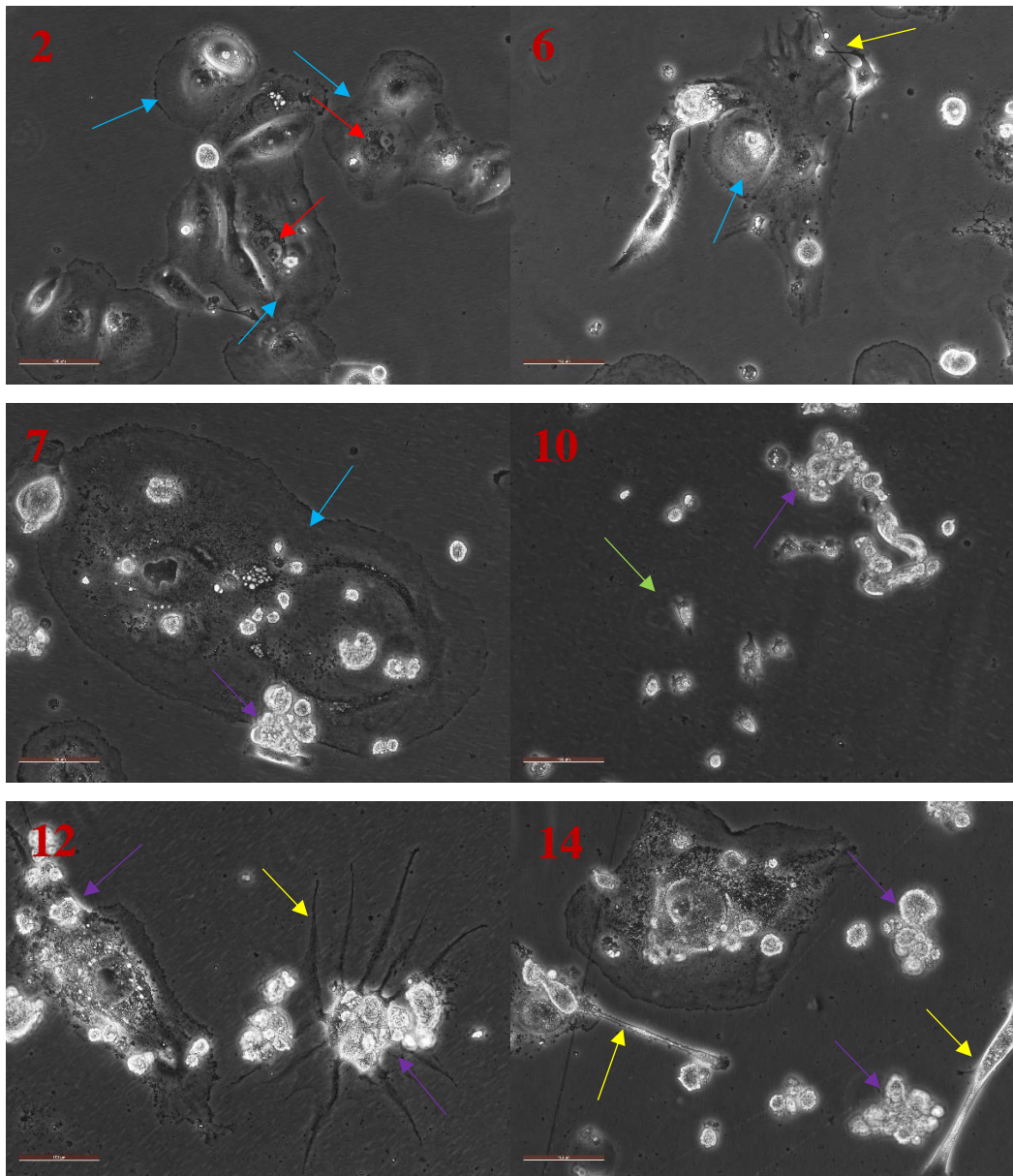
5. attēls. MDA-MB-231 šūnu morfoloģija pirms un pēc apstrādes ar 0,26  $\mu$ M doksorubicīnu (4.-6. kultivēšanas diena). Ar cipariem norādītas stundas pēc doksorubicīna ekspozīcijas. Attēla palielinājums ir 200x, mēroga nogriežņa vērtība - 100  $\mu$ m.

Figure 5. MDA-MB-231 cell morphology before and after treatment with 0,26  $\mu$ M doxorubicin (cultivation days 4 till 6). Numbers indicate the hours after doxorubicin treatment. Picture magnification is 200x, length of scalebar - 100  $\mu$ m.

Palielināts šūnu izmērs tika novērots arī kultūru tripsinizēšanā, skaitot šūnas ar hemocitometru. Kultūrai pēc doksorubicīna ekspozīcijas tika iegūts mazāks šūnu skaits, un to dzīvotspēja bija zemāka (~3 miljoni šūnu no T75 kultivēšanas flakona; dzīvotspēja adherentām šūnām – 86,6 %), salīdzinot ar doksorubicīnam neeksponētām MDA-MB-231 šūnu kultūrām līdzīgā konfluencē, kur parasti iegūst vairāk par 10 miljoniem adherentu šūnu ar dzīvotspēju aptuveni 90-95 %.

Pēc doksorubicīnam eksponētās kultūras pārsēšanas DOX+1 pasāžā tika novēroti secīgi augšanas posmi (skatīt 4. pielikumu): šūnu izmēra palielināšanās un pakāpeniska bojāeja (pirmais posms), koloniju veidošanās un populācijas atjaunošanās (otrais posms).

Pēc subkultivēšanas iegūtā doksorubicīna ekspozīciju pārdzīvojušī MDA-MB-231 apakšpopulācija sastāvēja galvenokārt no lielizmēra šūnām, kam pirmajās kultivēšanas dienās pieauga izmērs un kas pakāpeniski sāka iet bojā (6. attēls). Divu nedēļu laikā šūnu konfluence kultūrā no sākotnējās (30-40 %) samazinājās līdz 5-10 %, un izteikti palielinājās šūnu un to palieku daudzums barotnē un uz flakona virsmas. Pēc pirmās un otrās nedēļas laikā adherentā kultūras daļa galvenokārt sastāvēja no vakuolizētām un granulārām šūnām, kā arī milzu šūnām ar izmainītu morfoloģiju. Kultūrā 10. dienā tika konstatētas pirmās kolonijas, ko veidoja šūnas ar atšķirīgu morfoloģiju no iepriekš X+1 kultūrā novērotajām. Kolonija tika definēta kā maza izmēra adherentu šūnu grupa, kurā ir vismaz 10 šūnas un kas atrodas atstatus no citām šūnu grupām.

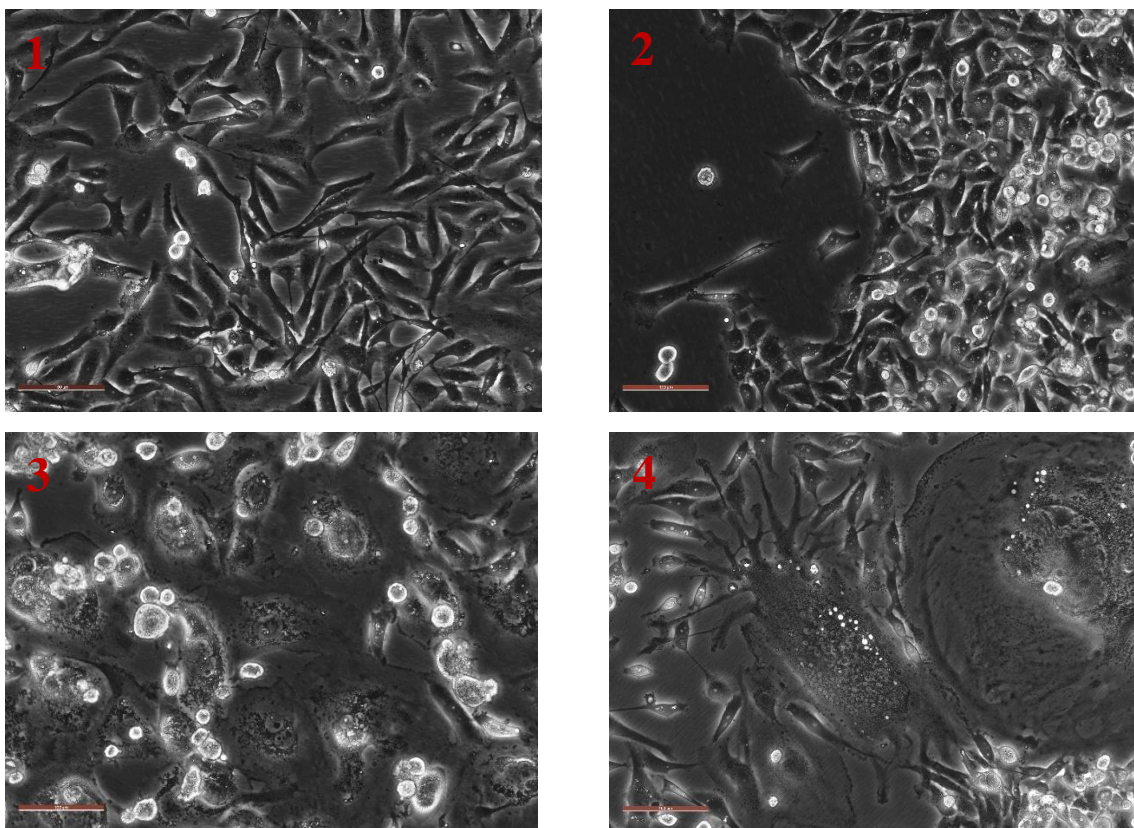


6. attēls. Šūnu morfoloģijas izmaiņas kultūras A DOX+1 pasāžā. Ar cipariem norādīta kultivēšanas diena. Ar bultām atzīmēti pusadherenti un adherenti šūnu un/vai to palieku agregāti (violets), šūnas ar vairākiem kodoliem (sarkans), pagarināti izaugumi (dzeltens), šūnas ar nepilnīgas dalīšanās vai saplūšanas pazīmēm (zils), jauna šūnu kolonija (zaļš). Attēla palielinājums ir 200x, mēroga nogriežņa vērtība - 100  $\mu$ m.

Figure 6. Changes of cell morphology after doxorubicin exposure in culture A passage DOX+1. Numbers indicate days of cultivation. Coloured arrows show diverse morphological characteristics: semiadherent and floating aggregates of cells and/or cell debris (purple), cells with more than one nucleus (red), cell projections (yellow), cells with characteristics of incomplete mitosis or fusion (blue), new cell colony (green). Picture magnification is 200x, length of scalebar - 100  $\mu$ m.

Pēc otrās nedēļas koloniju skaits un izmērs palielinājās, un 16. dienā DOX+1 kultūrā bija saskatāmas 55 kolonijas (koloniju veidošanas spēja – 0,011 %). Tā kā populācijas atjaunošanos nodrošināja koloniju augšana, šajā augšanas posmā konfluenci kā augšanas parametru nevarēja precīzi novērtēt. Populācijas atjaunošanās gaitā kultūrā izveidojās no ar doksorubicīnu

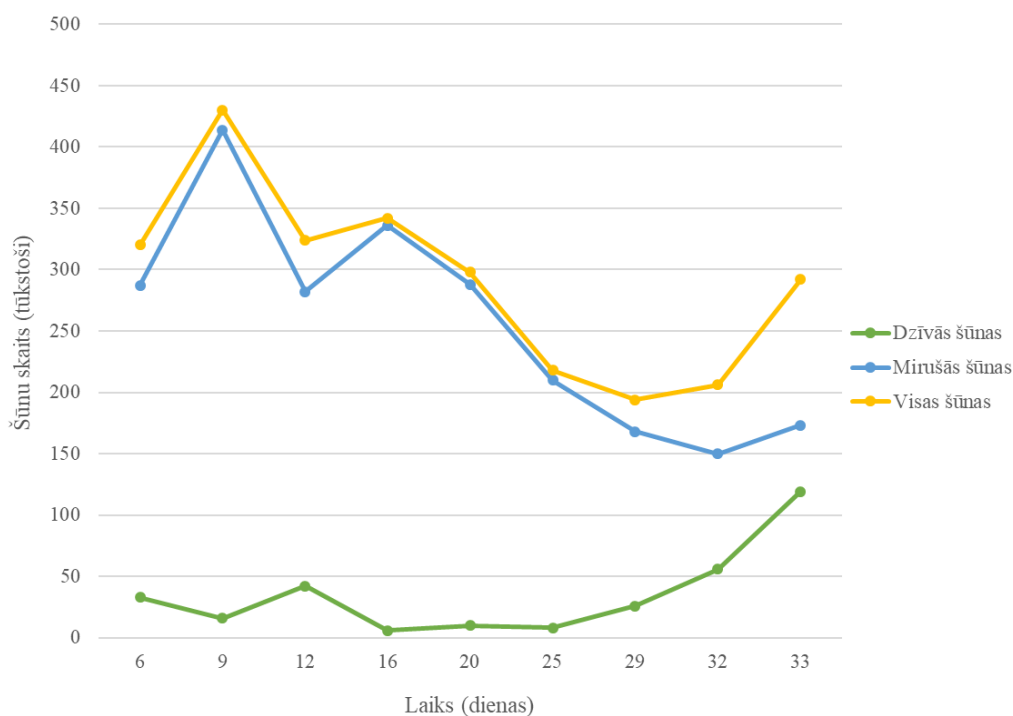
neapstrādātas MDA-MB-231 šūnu līnijas morfoloģiski atšķirīgas šūnas un to kolonijas (7. attēls, skatīt 4. un 5. pielikumu).



7. attēls. Šūnu morfoloģija eksperimenta kultūras A DOX+1 pasāžas otrā augšanas posma noslēgumā. Visvairāk kultūrā bija novērojamas vārpstveida (mezenhimāla tipa) šūnu kolonijas (1), epiteliāla tipa (2) šūnu kolonijas un jaunas lielizmēra šūnu (3). Kultivēšanas beigās joprojām bija sastopamas gan apaļas un neregulāras formas (4), gan neuronālas milzu šūnas. Attēla palielinājums ir 200x, mēroga nogriežņa vērtība - 100  $\mu\text{m}$ .

7. attēls. Cells with different morphological characteristics in experimental culture A DOX+1 passage during the end of second growth phase. Cells were mostly spindle-like (mesenchymal type; picture 1), also epithelial cells (2) and giant cell colonies (3) were observed. In the end of cultivation, round, irregular (3) and neuronal-type giant cells could still be observed. Picture magnification – 200x, length of scalebar – 100  $\mu\text{m}$ .

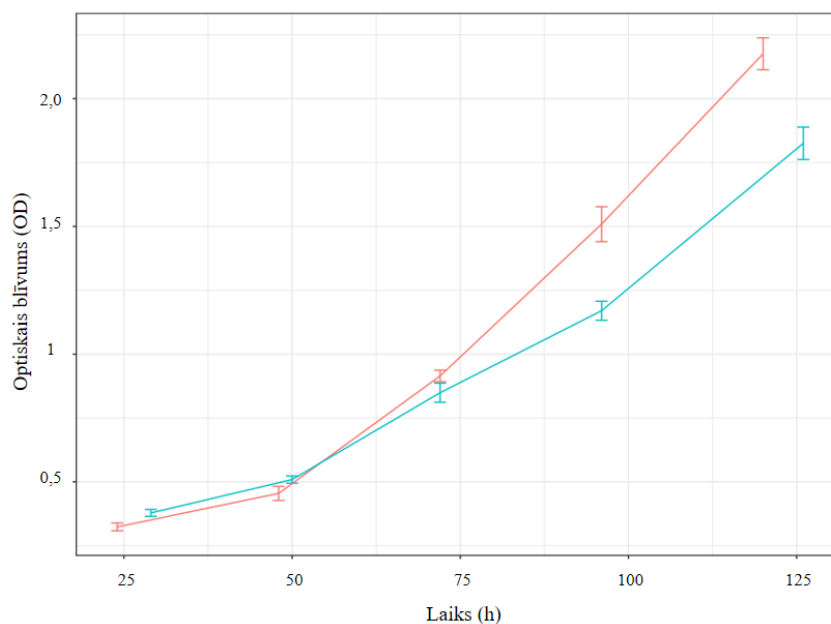
Tā kā izmēģinājumā kultūrai DOX+1 pasāzā tika novērota neadherentu šūnu akumulēšanās suspensijā, eksperimenta kultūrai DOX+1 pasāzā katrā barotnes nomaiņas reizē tika veikta suspensijas šūnu skaitīšana (8. attēls). Pirmajā augšanas posmā dzīvo šūnu skaits pakāpeniski samazinājās un lielāka daļā suspensijas šūnu bija mirušas, vislielāko mirušo šūnu skaitu konstatējot pirmās nedēļas beigās. Savukārt otrajā augšanas posmā dzīvo šūnu skaits kļuva lielāks līdz sastādīja 40,75 % no visām šūnām.



8. attēls. Suspensijā esošo dzīvo un mirušo šūnu skaita izmaiņas kultūrā A DOX+1 pasāžā.

Figure 8. Live and dead cell number changes in suspension of culture A DOX+1 passage.

Augšanas parametru izmaiņu novērtēšanai DOX+1 pasāžā tika veidotas augšanas līknes, lai noteiktu populācijas dubultošanās laika (PDT) atšķirību, salīdzinājumā ar kontroles kultūru. Metožu optimizācijas sākumā tika veidotas augšanas līknes, kur 14 dienu garumā tika modelēts pilns šūnu kultūras augšanas cikls. Optimizējot protokolu PDT aprēķināšanai tika konstatēts, ka augšanas līknes var veidot līdzīgi kā citotoksicitātes testam. Augšanas līknes ar blīvumu 1000-7000 šūnām lauciņā tika veidotas izmēģinājuma kultūrai DOX pasāžā, un šūnu skaita pieaugums nebija novērojams (skatīt 6. pielikumu), tādēļ PDT izmaiņu noteikšanai eksperimentā tika izmantota DOX+1 pasāža. Analīzei tika izsētas 1000-10000 šūnas lauciņā, un PDT aprēķinam abām kultūrām tika izmantoti otrās un ceturtais fiksēšanas dienas dati ar blīvumu 5000 šūnas lauciņā (9. attēls). Kontroles kultūras PDT ir  $27,73 \pm 0,36$  h ir statistiski būtiski īsāks ( $p < 0,001$ ) nekā DOX+1 ( $37,46 \pm 0,17$  h).

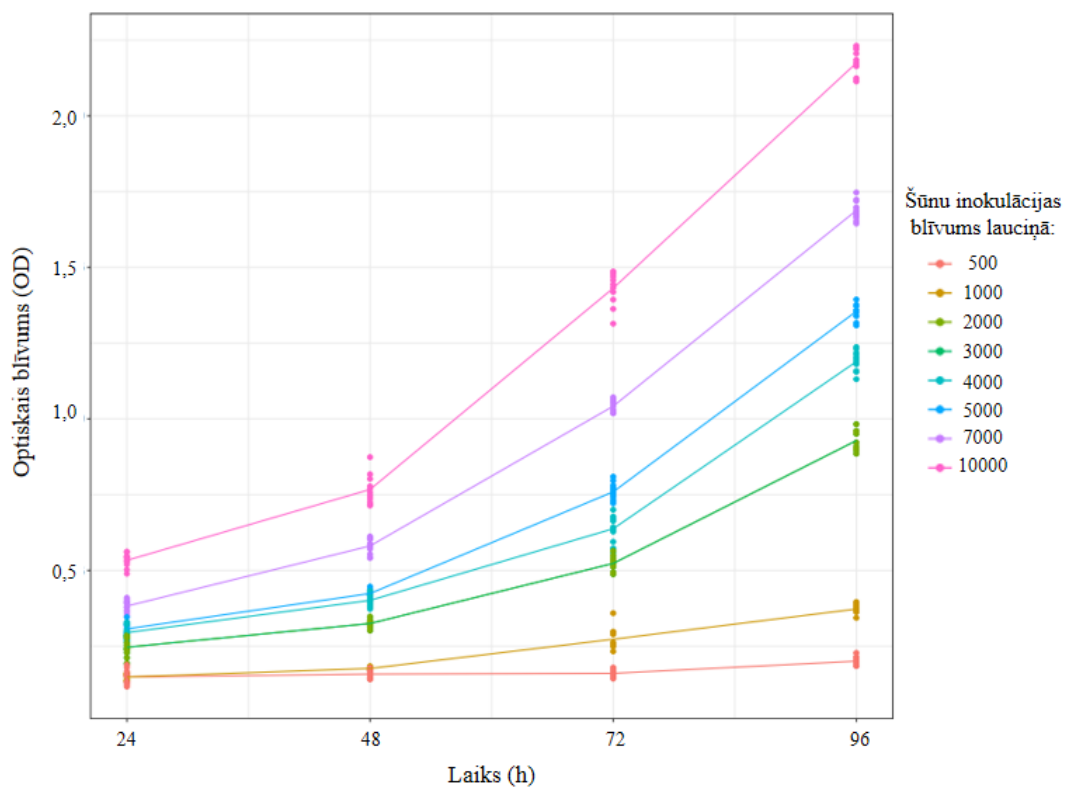


9. attēls. Augšanas līknes kontroles (sarkans) un DOX+1 (zils) kultūrām.

Figure 9. Growth curves of control (red) and DOX+1 (blue) cultures.

### 3.3.. MDA-MB-231 jutības izmaiņas pret citotoksiskajiem savienojumiem pēc doksorubicīna ekspozīcijas

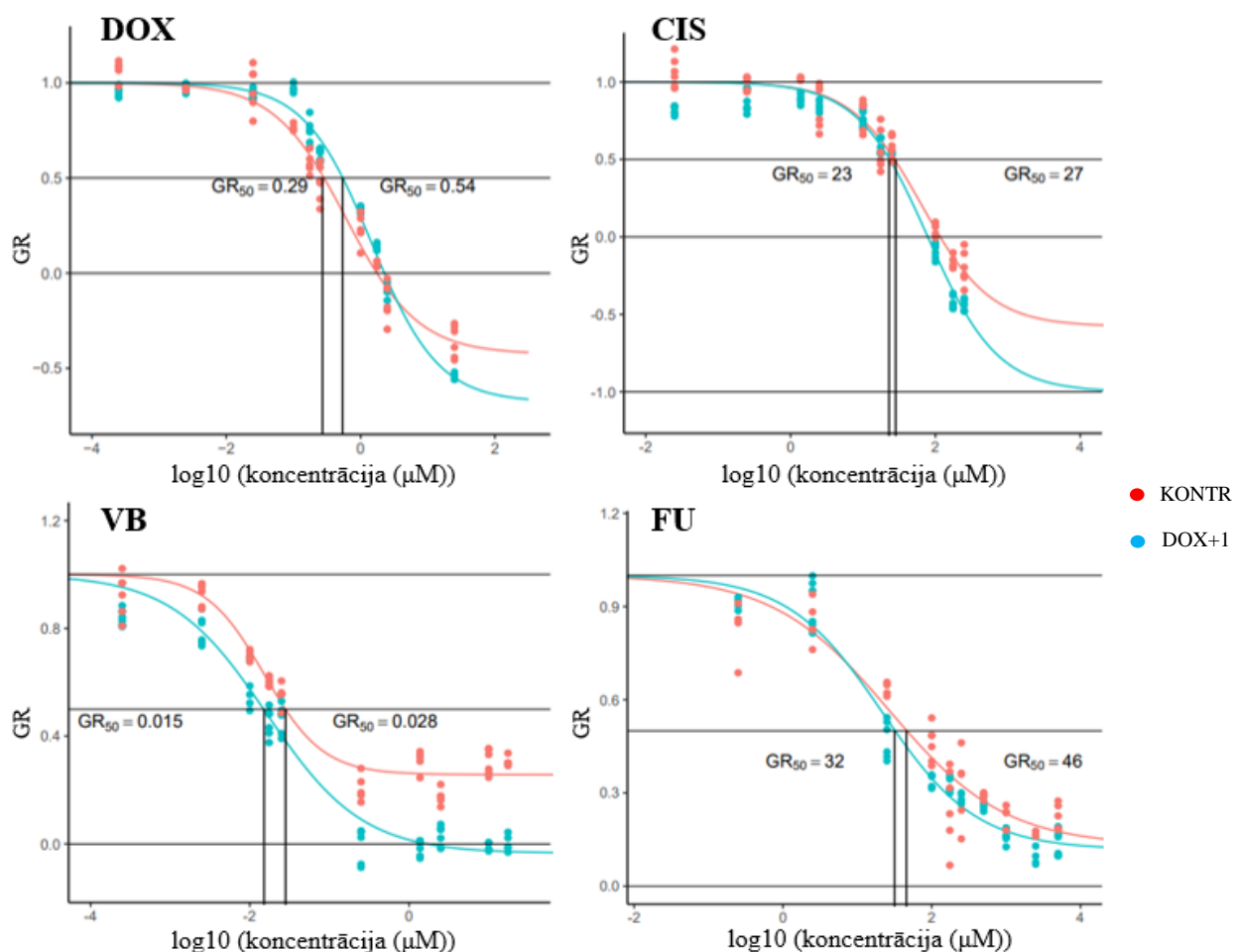
MDA-MB-231 šūnu jutība pret citotoksiskajiem savienojumiem (doksorubicīns (DOX), vinblastīns (VB), cisplatīns (CIS), fluorouracils (FU)) tika noteikta ar citotoksicitātes testu. Lai visa testa garumā nodrošinātu šūnu augšanu eksponenciālajā fāzē, ar augšanas līknēm vienā atkārtojumā tika modelēta MDA-MB-231 šūnu proliferācijas ātruma atkarība no inokulācijas blīvuma (10. attēls). Pamatojoties uz eksperimenta rezultātiem, tika izvēlēti šādi testa parametri: izsēšanas blīvums – 5000 šūnas lauciņā, pārbaudāmā savienojuma pievienošanas laiks pēc izsēšanas un ekspozīcijas laiks – 48 h. Testu sērijā tika izvēlēts optimāls pārbaudāmo ķīmijterapijas medikamentu koncentrāciju intervāls, kurā tiek novērotas šūnu augšanas izmaiņas konkrētā savienojuma ietekmē (DOX: 0,25 nM – 25 μM; VB: 0,25 nM – 17,5 μM; CIS: 25 nM – 250 μM; FU: 0,25 μM – 5 mM).



10. attēls. MDA-MB-231 proliferācijas ātrums atkarībā no inokulācijas blīvuma. Šūnas tika kultivētas 4 dienas un pēc izsēšanas fiksētas ik pēc 24 h. Šūnu skaita izmaiņu noteikšanai izmantots SRB tests.

Figure 10. Cell proliferation dependency on inoculation density. Cells were cultivated for 4 days and fixed every 24 hours after seeding. SRB assay was used for cell number assesment.

Eksperimentā šūnu jutība pret ķīmijterapijas savienojumiem tika salīdzināta A kultūras DOX+1 pasāžā ar kontroles kultūru 46. pasāžā (11. attēls, 8. tabula.).



11. attēls. MDA-MB-231 šūnu jutība pret doksorubicīnu (DOX), cisplatīnu (CIS), vinblastīnu (VB), fluorouracilu (FU) kontroles un DOX+1 kultūrās. Ar zilu krāsu – DOX+1 pasāžas kultūra, ar sarkanu – kontrole 46. pasāžā. Visām modelētajām sakarībām automātiski aprēķinātā  $R^2 \geq 0,95$ .

Figure 11. Sensitivity to chemotherapy compounds (doxorubicin (DOX), cisplatin (CIS), vinblastine (VB), fluorouracil (FU)) of MDA-MB-231 cells after pointwise doxorubicin exposure. Blue indicates DOX+1 passage, red – control culture in 46th passage. Automatically calculated  $R^2$  for all simulated regressions is  $\geq 0,95$ .

8. tabula.

Citotoksicitātes testa GR50 un IC50 vērtības.

Table 8.

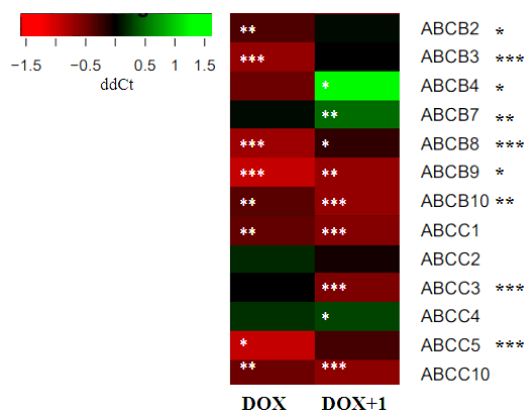
GR50 and IC50 values of cytotoxicity assay.

| N.p.k. | Savienojums | Raksturlielums | Kultūra |         | Reižu atšķirība |
|--------|-------------|----------------|---------|---------|-----------------|
|        |             |                | KONTR   | DOX+1   |                 |
| 1.     | DOX (nM)    | GR50           | 285,61  | 543,08  | 1,90            |
|        |             | IC50           | 439,76  | 1133,30 | 2,58            |
| 2.     | CIS (μM)    | GR50           | 27,27   | 23,30   | 0,85            |
|        |             | IC50           | 40,97   | 43,65   | 1,07            |
| 3.     | VB (μM)     | GR50           | 28,00   | 14,92   | 0,53            |
|        |             | IC50           | 65,38   | 70,98   | 1,09            |
| 4.     | FU (μM)     | GR50           | 46,40   | 32,21   | 0,69            |
|        |             | IC50           | 161,88  | 266,92  | 1,65            |

Pēc iegūtajām GR50 vērtībām, pēc doksorubicīna ekspozīcijas šūnām augstāka rezistence (1,9 reizes) tika novērota tikai pret doksorubicīnu, taču pret pārējiem pārbaudītajiem savienojumiem šūnu jutība bija lielāka, salīdzinot ar kontroli. Savukārt IC50 vērtības uzrāda, ka DOX+1 rezistence pret visiem savienojumiem ir augstāka nekā kontroles kultūras šūnām.

### 3.4. ABC saimes gēnu transkriptomiskās ekspresijas līmeņa izmaiņas MDA-MB-231 šūnu līnijā pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu

Lai noteiktu, kā šūnu punktveida apstrāde ar doksorubicīnu ietekmē ABC saimes gēnu ekspresiju, A replikāta šūnu kultūra preDOX tika salīdzināta ar DOX un DOX+1 kultūrām (12. attēls, 2. un 3. pielikums). 9 no 13 analizētajiem gēniem konstatēta statistiski būtiski paaugstināta ekspresija vienā vai abās kultūrās pēc doksorubicīna apstrādes, 3 no 13 – statistiski būtiski pazemināta ekspresija vienā vai abās kultūrās, salīdzinot ar kontroles kultūru preDOX, savukārt vienam gēnam (*ABCC2*) statistiski būtiskas ekspresijas izmaiņas nebija konstatētas. Kvantitatīvās reālā laika PCR (qPCR) produkts tika vizualizēts agarozes gela elektroforēzē, un *ABCB1*, *ABCB5*, *ABCB6* un *ABCG2* gēniem bija novērojami vairāki atšķirīga garuma produkti, tādēļ šie gēni ekspresijas analīzē netika iekļauti.



12. attēls. ABC saimes gēnu ekspresijas ddCt vērtības eksperimenta kultūrā A uzreiz pēc doksorubicīna ekspozīcijas (DOX) un nākamajā pasāžā (DOX+1), salīdzinot ar kontroles kultūru preDOX. Ar baltām zvaigznītēm atzīmēts dCt vērtību atšķirību būtiskums (p vērtība) DOX un DOX+1 kultūrai, salīdzinot ar kontroles kultūru, bet ar melnām zvaigznītēm – starp DOX un DOX+1 kultūrām (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ).

Figure 12. Gene expression values ddCt of ABC family genes in experimental culture A after doxorubicin exposure (DOX passage) and following passage (DOX+1), compared to control culture preDOX. White stars indicate the statistical significance (p value) of dCt differences between either DOX or DOX+1 and control culture, black stars – between DOX and DOX+1 cultures (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ).

Atkarībā no gēnu ekspresijas atšķirībām, salīdzinot ar preDOX kultūru, izšķiramas trīs gēnu grupas: vienā grupā novērojama augstāka gēnu ekspresija DOX pasāžā (*ABCB2*, *ABCB3*, *ABCB8*, *ABCB9*, *ABCC5*), otrā – DOX+1 pasāžā (*ABCB10*, *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC10*), savukārt četriem gēniem (*ABCB4*, *ABCB7*, *ABCC2*, *ABCC4*) statistiski būtiskas ekspresijas

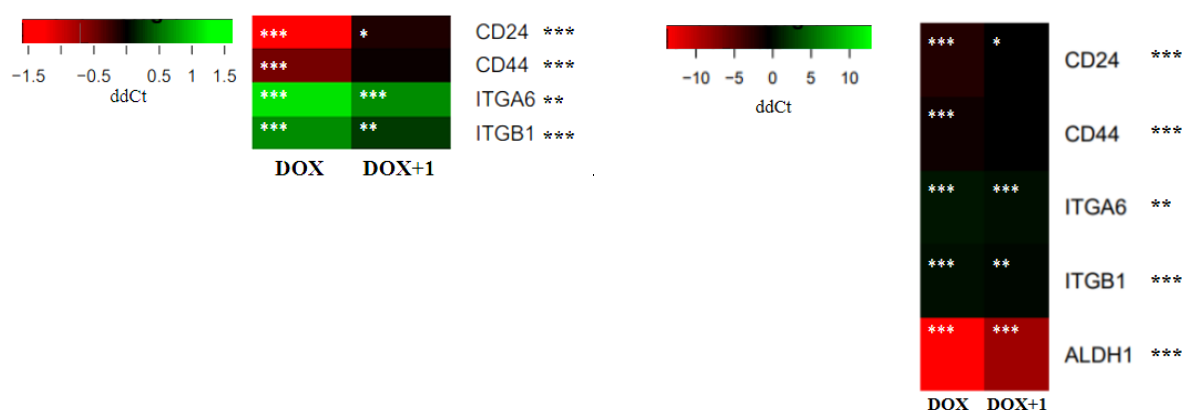
atšķirības nav vai tā ir būtiski zemāka vienā vai abās kultūrās. Lielākajai daļai gēnu ekspresijas atšķirības dažādās kultūrās ir statistiski būtiskas, taču šīs izmaiņas ir salīdzinoši nelielas (relatīvās ekspresijas līmeņa reižu (RQ) vērtības, salīdzinot ar kontroles kultūru preDOX, ir intervālā no 0,422 (*ABCB4* kultūrā DOX+1) līdz 1,914 (*ABCC5* kultūrā DOX)).

### 3.5. Cilmsūnības izmaiņas MDA-MB-231 šūnu līnijā pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu

Vēža cilmes šūnām (VCŠ) raksturīgo pazīmju izmaiņu novērtēšanai MDA-MB-231 šūnām pēc doksorubicīna ekspozīcijas tika izmantotas divas analīžu metodes: VCŠ gēnu transkriptomiskās ekspresijas līmeņa izmaiņu noteikšana un klonogenitātes tests.

VCŠ gēnu ekspresija tika noteikta, izmantojot VCŠ marķieru gēnus - *CD24*, *CD44*, *ALDH1A1*, *ITGA6*, *ITGB1*. Lai noteiktu, vai īslaicīga doksorubicīna ekspozīcija ietekmē VCŠ raksturīgo gēnu ekspresijas izmaiņas šūnās, A kultūras DOX un DOX+1 pasāžas tika salīdzinātas ar preDOX kultūru 45. pasāžā (13. attēls, skatīt 2. un 3. pielikumu).

DOX pasāžā konstatēta 3,00 reizes (RQ) augstāka *CD24* transkriptomiskā ekspresija, kas pēc populācijas atjaunošanās DOX+1 pasāžā bija būtiski zemāka. DOX pasāžā konstatēta 1,42 reizes augstāka *CD44* ekspresija, kas, tāpat kā *CD24*, nākamajā pasāžā ir relatīvi zema. DOX un DOX+1 pasāžu kultūrām *ITGA6* un *ITGB1* ekspresija ir zemāka, salīdzinot ar kontroles kultūru preDOX. Gandrīz visu uzskaitīto gēnu ekspresijas līmenis DOX+1 pasāžā, salīdzinot ar preDOX kultūru, ir statistiski būtiski atšķirīgs, tomēr atšķirības ir nelielas. No visiem eksperimentā iekļautajiem VCŠ marķieru gēniem visvairāk ekspresēts bija *ALDH1A1* – gēna ekspresija preDOX kultūrā nebija novērojama, taču ļoti augsta ekspresija tika konstatēta abās kultūrās pēc apstrādes ar doksorubicīnu.

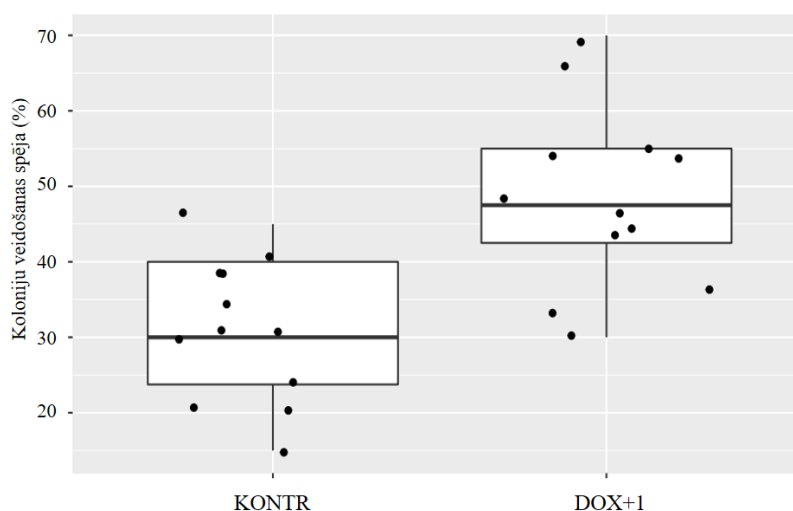


13. attēls. VCŠ marķieru gēnu ekspresijas ddCt vērtības eksperimenta kultūras A DOX un DOX+1 pasāžās, salīdzinot ar kontroles kultūru preDOX. Ar baltām zvaigznītēm norādīts dCt vērtību atšķirību būtiskums (p vērtība) DOX un DOX+1 kultūrai, salīdzinot ar kontroles kultūru, bet ar melnām zvaigznītēm – starp DOX un DOX+1 kultūrām (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ).

Figure 13. Gene expression values ddCt of CSC marker genes in experimental culture A DOX and DOX+1 passages, compared to control culture preDOX. White stars show the statistical significance (p value) of dCt differences between either DOX or DOX+1 and control culture, black stars – between DOX and DOX+1 cultures (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ).

Šūnu koloniju veidošanas spējas novērtēšanai eksperimentā tika veikts klonogenitātes tests. Lai gan darba gaitā tests tika optimizēts gan 24 lauciņu plates formātam (izsēj vairākas šūnas lauciņā), gan 96 lauciņu plates formātam (viena šūna lauciņā), praktisku aspektu dēļ eksperimentā tika veikts 24 lauciņu platēs. Izmēģinājumu sērijā tika noskaidrots, ka MDA-MB-231 šūnu līnijai 20 šūnu izsēšana ļauj visprecīzāk noteikt koloniju skaitu pret izsēto šūnu skaitu pēc 11 dienām. Šūnu koloniju veidošanas spēja tika izteikta kā procentuāla koloniju un lauciņā izsēto šūnu attiecība.

Klonogenitātes testa rezultāti tika iegūti un salīdzināti A replikāta kontroles un DOX+1 kultūrām. Kultūra uzreiz pēc doksorubicīna ekspozīcijas netika analizēta ar šo metodi, jo izmēģinājuma kultūrai pēc apstrādes ar doksorubicīnu DOX pasāžā neviena no 1200 izsētajām šūnām neizveidoja koloniju izmainītās šūnu augšanas dēļ.



14. attēls. Koloniju veidošanas spējas salīdzinājums A kontroles kultūrai 46. pasāžā un DOX+1 pasāžā pēc doksorubicīna punktveida ekspozīcijas.

Figure 14. Comparison of colony formation ability in replicate A control culture in 46th passage and DOX+1 passage after doxorubicin pointwise exposure.

Eksperimentā kultūras DOX+1 pasāžas šūnām tika konstatēta statistiski būtiski ( $p < 0,001$ ) augstāka koloniju veidošanas spēja ( $48,8 \pm 12,0$  %), salīdzinot ar kontroles kultūru ( $30,8 \pm 9,5$  %) (14. attēls).

## 4. DISKUSIJA

### 4.1. Pret doksorubicīnu rezistentu MDA-MB-231 apakšpopulāciju selekcija ar punktveida ekspozīciju

Ķīmijterapijas rezistences pētījumos standarta pieeja ir šūnu kultūru modeļi *in vitro*. Šūnu līniju pētījumos gan tiek eksperimentāli noteikta šūnu atbilde uz ķīmijterapijas savienojumu iedarbību, gan šūnas vairākkārt tiek eksponētas savienojumam, mākslīgi veicinot iegūtas rezistences veidošanos savienojuma ietekmē (Niepel *et al.*, 2017, McDermott *et al.*, 2014). Klīniski nozīmīgā šūnu apakšpopulāciju atlasē un līniju veidošanā šūnas tiek eksponētas relatīvi zemām savienojuma koncentrācijām punktveidā un periodiski, imitējot ķīmijterapijas kursu (McDermott *et al.*, 2014).

Eksperimentā rezistentu šūnu iegūšanai pēc punktveida doksorubicīna ekspozīcijas šūnas tika plānots apstrādāt ar doksorubicīnu klīniski nozīmīgā koncentrācijā. Tomēr devas, vēža tips, pacientu vecums, dzimums, kā arī plazmā esošās medikamenta koncentrācijas noteikšanas metodes atšķiras, tādēļ literatūrā aprakstītas atšķirīgas maksimālās un minimālās koncentrācijas plazmā un koncentrācijas samazināšanās tendences. (Barpe *et al.*, 2010, Hempel *et al.*, 2002, Krischke *et al.*, 2016). Zināms arī, ka doksorubicīna ķīmiskās modifikācijas atšķiras dažādās vidēs (Pavlik *et al.*, 1984, Janssen *et al.*, 1985), tādēļ kultivēšanas barotnē un organismā doksorubicīna stabilitāte atšķiras un ir sarežģīti salīdzināma. Tādēļ eksperimentā apstrādei ar doksorubicīnu tika izmantota izmēģinājuma eksperimentā noteiktā IC50 vērtība doksorubicīnam neeksponētām MDA-MB-231 šūnām. Lai šūnu apstrādi ar doksorubicīnu veiktu pēc iespējas tuvāk klīniskajai situācijai, eksperimenta dizaina uzlabošanai būtu nepieciešams noteikt doksorubicīna ķīmisko modifikāciju parametrus A10- barotnē un iegūto informāciju izmantot doksorubicīna koncentrācijas izmaiņu modelēšanai līdzīgi kā cilvēka organismā.

Audu un šūnu kultūrās mikroorganismu kontaminācija ir problēma, kuras dēļ var tikt zaudētas ne vien atsevišķas kultūras, bet pat vairāki eksperimenti. Mikroorganismu kontamināciju šūnu kultūrās var veidot baktērijas, mikoplazma, raugi un sēnes. Šūnu kultūru kontaminācijas riska samazināšanai standartizēti veic vairākas procedūras: ievēro aseptiskus darba apstākļus, šūnu līnijas iegūst no sertificētām šūnu bankām vai izplatītājiem, šūnas vismaz daļu no kultivēšanas laika kultivē bez antibiotikām, regulāri veic mikoplazmu un vīrusu pārbaudi šūnu kultūrās (Freshney, 2010).

Šajā eksperimentā šūnu kultūru barotnē kā piedevas tika izmantots penicilīna un streptomicīna šķīdums, kā arī B-amfotericīns. Doksorubicīna apstrādes laikā šūnu kultūrās, kā arī visu analīžu laikā daudzlauciņu platēs šūnas tika kultivētas bez šīm piedevām. Lai gan visā

darba izstrādes laikā šūnu kultivēšanas procedūras bija nemainīgas un metožu optimizācijas gaitā vairāk nekā 10 izmēģinājumu eksperimentos šūnas daudzlauciņu platēs veiksmīgi tika kultivētas bez antimikrobiālām piedevām, lielākā daļa eksperimenta analīžu un šūnu kultūru kontaminācijas dēļ tika likvidētas. Analīzēm tika izsētas tikai šūnu kultūras, kurās kontaminācija netika novērota. Savukārt kontaminētās kultūras, analīzes, kā arī šķīdumi un to alikvotas, kas tika izmantotas darbā ar tām, uzreiz tika utilizēti. Pēc kontaminācijas konstatēšanas inkubatorā, ūdens sildvannā un autoklāvā tika nomainīts ūdens, ar 70 % etanolu un UV tika dezinficēts laminārs un šūnu kultivēšanas bokss.

Darba izstrādes gaitā konstatēto kontamināciju dinamika liecina, ka kontamināciju veidojušas pret izmantotajām antimikrobiālajām piedevām rezistentas baktērijas, jo, lai gan kultūrā tās netika novērotas, kontaminācija tika konstatēta visās no vienas šādas kultūras izsētajās analīzēs. Šūnas turpmāk vajadzētu kultivēt barotnē bez antibakteriālām un antifungālām piedevām, un nepieciešamības gadījumā izmantot antimikrobiālas piedevas, kam darbības mehānisms atšķiras no iepriekš izmantotajām.

Lai gan eksperimentā no plānotajiem diviem bioloģiskajiem atkārtojumiem divos tehniskajos replikātos tikai vienā tehniskajā atkārtojumā izdevās iegūt visas nepieciešamās kultūras un analīzes, darbā ir iegūta pret doksorubicīnu rezistenta MDA-MB-231 šūnu apakšpopulācija.

#### **4.2. Šūnu morfoloģijas un proliferācijas ātruma izmaiņas pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu**

Literatūrā minēti novērojumi, kur MDA-MB-231 un citās *TP53* mutantās šūnu līnijās spontāni veidojas milzu šūnas ar palielinātu ģenētiskā materiāla daudzumu. Pēdējos gados arvien vairāk tiek aprakstīta audzējos un vēža šūnu līnijās sastopamo poliploīdo milzu šūnu skaita palielināšanās pēc ķīmijterapijas savienojumu iedarbības (Mirzayans *et al.*, 2018). Citotoksisku ķīmijterapijas savienojumu iedarbības radītajiem bojājumiem šūnās vajadzētu inducēt bojāeju, taču šūnās var tikt ieslēgtas adaptīvas atbildes, kas ļauj daļai vēža šūnu izdzīvot stresa ietekmē (Holohan *et al.*, 2013). Šajā eksperimentā doksorubicīna ekspozīcijas un kultūras pārsēšanas gaitā tika novērots palielināts MDA-MB-231 šūnu izmērs, un atsevišķām šūnām bija novērojami vairāki kodoli vai viens palielināts kodols.

Milzu šūnām dažādos pētījumos ir identificētas VCS īpašības – lēna dalīšanās vai dalīšanās nenotiek, augšanas apstāšanās stresa ietekmē, spēja no jauna uzsākt dalīšanas ciklu (Weihua *et al.*, 2011). Papildus to izdalītajiem augšanas faktoriem, milzu šūnas veicina cilmsūnības veidošanos, amitotiski daloties un veidojot jaunas šūnas ar VCS īpašībām dažādu mehānismu ceļā – pumpurošanās vai pārsprāgšana, depoliploidizācija, horizontāla genomiskā

materiāla pārnese uz citām šūnām. Milzu šūnu dalīšanos sauc par neižozi, un šo šūnu pašatjaunošanās spēja tiek nodrošināta endoreduplikācijas ceļā (defektīvas citokinēzes dēļ) un/vai saplūšanas ceļā, veidojot jaunas, neliela izmēra diploīdas šūnas ar spēju mitotiski dalīties. Milzu šūnu veidotajām pēcteču šūnām ir raksturīgas VCS pazīmes, tai skaitā VCS marķieru gēnu ekspresija, un arī spēja cilmsūnības īpašības nodot citām šūnām, izmantojot citoplazmas savienojumus (Mirzayans *et al.*, 2018). Milzu šūnām pētījumos aprakstītās īpašības ir agresivitāte, paaugstināta rezistence (dažādos vēža tipos konstatēta zemāka jutība pret citotoksiskiem savienojumiem, tai skaitā doksorubicīnu), koloniju un metastāžu veidošanas spēja, kā arī spēja no vienas milzu šūnas izveidot jaunu audzēju modeļorganismos (Weihua *et al.*, 2011; Mirzayans *et al.*, 2018). Literatūrā ir minēta hipotēzeka šūnas, kas spēj kļūt par milzu šūnām ar vairākiem kodoliem, ir VCS vai VCS līdzīga fenotipa šūnas (Weihua *et al.*, 2011).

Eksperimentā novērotā augšanas dinamika DOX+1 pasāžā ir līdzīga citiem gan *in vitro*, gan *in vivo* pētījumiem, kur vēža šūnas vai audzējs pakļauts ķīmijterapijas savienojuma vai jonizējošas radiācijas ietekmei (Mirzayans *et al.*, 2018). Piemēram, pētījumā, kur TP53 mutantas dzemdes kakla vēža un limfomas šūnu līnijas tika pakļautas radiācijai, tika konstatēts, ka šūnu poliploīdija pēc apstrādes katru dienu pieaug un ka rezultātā tikai ~2% milzu poliploīdo šūnu spēj izvairīties no bojāejas un atjaunot šūnu populāciju (Erenpreisa *et al.*, 2008). Darbā novērotās sakarības ir līdzīgas, jo pirmajā DOX+1 kultūras augšanas posmā šūnu izmērs palielinājās, un paralēli pakāpeniski notika šūnu bojāeja. Otrās nedēļas laikā no doksorubicīna ekspozīciju pārcietušajām milzu šūnām sāka veidoties nelielu šūnu kolonijas, un tikai 0,011% no visām flakonā izsētajām šūnām spēja veidot kolonijas līdz 16. dienai.

Populācijas atjaunošanos veidoja šūnu koloniju augšana. DOX+1 pasāžas otrā augšanas posma noslēgumā kultūrā bija novērojamas fenotipiski atšķirīgas šūnas un to kolonijas, tai skaitā mezenhimāla tipa šūnas. DOX+1 pasāžas šūnām tika konstatēta statistiski būtiski zemāks populācijas dubultošanās laiks (PDT). Šos novērojumus iespējams skaidrot ar literatūrā aprakstīto milzu poliploīdo šūnu pēcteču spēju diferencēties un veidot no sākotnējās morfoloģijas šūnām atšķirīgas šūnas, tai skaitā mezenhimāla tipa (Zhang *et al.*, 2013). Vairākos pētījumos norādīta poliploīdo šūnu spēja veicināt epiteliāli mezenhimālo pāreju, kam ir nozīme metastāžu un rezistences veidošanā (Mirzayans *et al.*, 2018).

### **4.3. MDA-MB-231 jutības izmaiņas pret ķīmijterapijas savienojumiem pēc doksorubicīna ekspozīcijas**

Šūnu jutības noteikšanai pret ķīmijterapijas savienojumiem tiek izmantoti šūnu augšanas testi (piemēram, dzīvotspējas un klonogenitātes), kuru ietvaros šūnas tiek apstrādātas ar savienojumu dažādās koncentrācijās un tiek veidota devas un dzīvotspējas līkne (Mckenna *et*

*al.*, 2017; McDermott *et al.*, 2014). Vairāku rezistences veidošanās mehānismu ceļā var veidoties multirezistence (Dean *et al.*, 2001), un tās konstatēšanai šūnu jutību pārbauda pret vairākiem ķīmijterapijas savienojumiem.

Eksperimentā pēc doksorubicīna punktveida ekspozīcijas MDA-MB-231 šūnām DOX+1 pasāžā tika pārbaudītas jutības izmaiņas pret dažādiem ķīmijterapijā pielietotiem savienojumiem, salīdzinot ar kontroles kultūru. Papildus doksorubicīnam (DOX) tika izmantoti citotoksiski savienojumi ar atšķirīgiem darbības mehānismiem: vinblastīns (VB) saistoties ar tubulīnu, depolimerizē mikrocaurulītes un inhibē šūnu dalīšanos mitozē (Gottesman *et al.*, 2001); ciplatīns (CIS) –saistās ar DNS purīna bāzēm, inhibējot DNS reparāciju un izraisot DNS bojājumus (Shaloam & Tchounwou, 2015); 5-fluorouracils (FU) – nukleotīdu analogs, kas gan inhibē timidilāta sintēzi, gan DNS un RNS sintēzi, t.i., replikāciju un transkripciju (Hu *et al.*, 2018). Visi darbā izmantotie ķīmijterapijas savienojumi ir ar multirezistenci saistīto ABC transportproteīnu substrāti (Gottesman *et al.*, 2001).

Pētījumā noteiktā GR50 vērtība norāda pārbaudāmā savienojuma koncentrāciju, pie kuras šūnu augšanas ātrums tiek inhibēts par 50 %, un tā ir normalizēta – šūnu dalīšanās reižu skaitam un izsēšanas blīvumam nav ietekmes uz šo parametru (Hafner *et al.*, 2016, 2017). Iegūtās GR50 vērtības liecina, ka augstāka rezistence veidojusies tikai pret doksorubicīnu.

MDA-MB-231 šūnu līnija literatūrā tiek aprakstīta kā relatīvi rezidenta pret doksorubicīna ietekmi (Kibria *et al.*, 2014). Paaugstinātas rezistences veidošanos pret doksorubicīnu iespējams skaidrot ar konkrētajiem stresa apstākļiem piemērotāko šūnu atlasī, kuru pēcnācējiem, iespējams, notikušas ģenētiskas un/vai epiģenētiskas izmaiņas efektīvākai rezistences nodrošināšanai. Tā kā rezistence pret citiem pārbaudītajiem savienojumiem nav konstatēta, var spriest, ka populācijas atjaunošanās laikā no doksorubicīna rezistentajām šūnām veidojusies populācija, kas rezistences nodrošināšanai izmanto doksorubicīnam specifisku mehānismu vai to kombināciju. Tomēr, tā kā papildus doksorubicīnam tika pārbaudīti tikai trīs ķīmijterapijas savienojumi, ir sarežģīti spriest par iespējamajiem rezistences veidošanās mehānismiem eksperimenta kultūrā, tādēļ būtu nepieciešams šūnu jutības izmaiņas pēc doksorubicīna ekspozīcijas novērtēt plašākam savienojumu panelim.

IC50 ir savienojuma koncentrācija, pie kuras šūnu dalīšanās ātrums ir samazināts par 50 %, bet kas nav normalizēta pēc šūnu blīvuma un dalīšanās ātruma. Šajā eksperimentā pēc apstrādes ar doksorubicīnu IC50 vērtības norādīja uz paaugstinātu rezistenci pret visiem pārbaudītajiem ķīmijterapijas savienojumiem. IC50 vērtība tiek plaši izmantota citotoksisku savienojumu ietekmes novērtēšanai uz šūnām, taču IC50 vērtības eksperimentāli ir grūti reproducējamas (Hafner *et al.*, 2017). Šūnām ar ilgāku dalīšanās laiku matemātiski IC50 vērtība ir lielāka. Šūnu dalīšanās laiks ir atšķirīgs gan dažādu orgānu un audu šūnām, gan šūnām stresa

faktoru ietekmē. Šajā eksperimentā šūnām pēc apstrādes ar doksorubicīnu DOX+1 pasāzā populācijas dubultošanās laiks (PDT) bija ilgāks nekā kontroles kultūrai (attiecīgi  $37,46 \pm 0,17$  h un  $27,73 \pm 0,36$  h), tādēļ iespējams, ka IC50 vērtības neliecina par multirezistences veidošanos doksorubicīna punktveida apstrādi pārdzīvojušā MDA-MB-231 apakšpopulācijā pēc populācijas atjaunošanas. Tā kā R programmas pakotnē *GRmetrics* nav iespējams iegūt IC50 un GR50 vērtību statistiskā būtiskuma rādītājus, nepieciešams veikt papildus aprēķinus jutības izmaiņu novērtēšanai.

GR50 aprēķina metodes autori uzskatāmi parādījuši IC50 vērtības nepilnības, analizējot datus no lielapjoma šūnu līniju un ķīmijterapijas savienojumu datu bāzes (*Genentech Cell Line Screening Initiative gCSI*) un pierādot, ka korelācija starp jutību pret savienojumu un šūnu dalīšanās laiku ir statistiski būtiska ( $p < 0,001$ ) (Hafner *et al.*, 2016, 2017). IC50 vērtība gadu gaitā plaši ir pielietota rezistences un multirezistences pētījumos, tādēļ pētījumu, kuru dizainā nav ņemts vērā šis aspekts un/vai kuros pielietoto šūnu jutības noteikšanas metožu protokoli nav skaidri aprakstīti, rezultāti varētu būt apšaubāmi. Taču, tā kā gan GR50, gan IC50 aprēķina modelī tiek pieņemts, ka šūnu augšanas parametri testa norises laikā ir nemainīgi, šāds šūnu jutības noteikšanas veids ir nepilnīgs (Mckenna *et al.*, 2017).

Šajā eksperimentā citotoksicitātes testa ietvaros šūnu skaita netiešai noteikšanai izmantots B-sulforodamīna (SRB) tests. SRB saistās ar šūnu proteīniem, un attiecīgi saistītais krāsojums ir proporcionāls šūnu skaitam, ja šūnu izmērs kultūrā nemainās. Citotoksicitātes tests tika veikts DOX+1 kultūrai, kurā šūnu morfoloģija ne vien atšķīrās no kontroles, bet arī populācijas ietvaros, tādēļ SRB testa kalibrēšana ļautu precīzāk noteikt šūnu jutības izmaiņas DOX+1 kultūrā. Eksperimentā pēc  $0,26 \mu\text{M}$  doksorubicīna pievienošanas DOX kultūrā bija novērojams, ka 48 h laikā izteikti palielinās šūnu izmērs, bet dzīvo šūnu skaits samazinās. Katra audzēja šūna un/vai apakšpopulācija pēc iedarbības ar ķīmijterapijas savienojumu var veidot atšķirīgu atbildi (Leggett *et al.*, 2017), tādēļ šūnu izmēra izmaiņas atšķirīgu medikamentu klātbūtnē dažādās koncentrācijās nav prognozējamas. Šī iemesla dēļ būtu nepieciešams šūnu skaita noteikšanai citotoksicitātes testā izmantot citu metodi, piemēram, plūsmas citometriju.

#### **4.4. ABC saimes gēnu transkriptomiskās ekspresijas līmeņa izmaiņas pēc doksorubicīna ekspozīcijas**

Pētījumos izmantoto krūts vēža šūnu līniju vidū konstatēta augsta ABC gēnu ekspresijas heterogenitāte gan mRNS, gan proteīnu līmenī. Pētījumos plaši aprakstīta arī ABC saimes gēnu ekspresijas paaugstināšanās pēc ķīmijterapijas savienojumu ekspozīcijas (Saxena *et al.*, 2011). Lai noteiktu, kā ABC transportproteīnu transkriptomiskā ekspresija mainās MDA-MB-231

šūnās pēc doksorubicīna ekspozīcijas, tika izmantots ABC saimes gēnu panelis, kam iepriekš literatūrā aprakstīta saistība ar ķīmijterapijas savienojumu rezistenci un multirezistenci.

Ekspresijas izmaiņas darbā nebija iespējams noteikt četriem gēniem – *ABCB1*, *ABCB5*, *ABCB6* un *ABCG2* –, jo šiem gēniem qPCR analīzē veidojās vairāki dažāda garuma produkti. Ir nepieciešams optimizēt qPCR reakcijas apstākļus šo gēnu ekspresijas noteikšanai.

Gēnu ekspresijas analīzes rezultātos bija izšķiramas trīs gēnu grupas – gēni ar augstāku ekspresiju DOX pasāžā, gēni ar augstāku ekspresiju DOX+1 pasāžā, kā arī gēni, kuriem statistiski būtiskas ekspresijas izmaiņas netika konstatētas vai ekspresija vienā vai abās pasāžās pēc apstrādes ar doksorubicīnu bija zemāka, salīdzinot ar kontroli. Šāda iedalījuma veidošanās liecina par dažādu ABC transportproteīnu atšķirīgo nozīmi rezistences veidošanā un uzturēšanā pret doksorubicīnu.

Saxena *et al.* veiktā pētījumā tika noteikta MDA-MB-231 un citu krūts vēža šūnu līniju ABC transportproteīnu ekspresija un aprakstīta vairāku transportproteīnu ekspresija šajā šūnu līnijā – *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ABCC10* un citi (Saxena *et al.*, 2011). Visiem minētajiem gēniem arī šajā darbā tika konstatēta paaugstināta ekspresija DOX un/vai DOX+1 pasāžās, izņemot *ABCC2* un *ABCC4*, kuriem ekspresijas līmeņa izmaiņas, salīdzinot ar kontroli, netika konstatētas. Saxena *et al.* pētījumā šūnas tika pakļautas doksorubicīna ietekmei, un gēnu ekspresijas paaugstināšanās tika novērota gan transportproteīniem, kuru ekspresija iepriekš nebija novērojama, gan transportproteīniem, kas jau sākotnēji bija ekspresēti šajās šūnās. Interesanti, ka minētajā pētījumā, tāpat kā šajā eksperimentā, pēc doksorubicīna ekspozīcijas tika konstatēta lai gan statistiski nebūtiski, tomēr zemāka *ABCC2* un *ABCC4* gēnu ekspresija. Literatūrā ir aprakstīta *ABCC2* spēja transportēt doksorubicīnu, taču *ABCC4* doksorubicīns nav viens no tā substrātiem (Dean, 2009).

No visu ABC transportproteīnu gēniem atšķirīgi bija divi – *ABCB4* un *ABCB7*, kuriem statistiski būtiski zemāka ekspresija tika konstatēta abās pasāžās pēc doksorubicīna ekspozīcijas. Kolorektālā vēža šūnu līnijā tika pierādīta samazinātas *ABCB4* ekspresijas saistība ar rezistences veidošanu pret 5-fluorouracilu (FU) un izvairīšanos no apoptozes (Hu *et al.*, 2018). *ABCB7*, tāpat kā *ABCB8* un *ABCB10* ir mitohodrijos lokalizēti ABC transportproteīni, tādēļ var spriest, ka, iespējams, citu ABC transportproteīnu ekspresijas paaugstināšanās kompensē vai aizstāj citu (Wang *et al.*, 2011).

Transkriptomiskās ekspresijas izmaiņas tikai daļēji ļauj spriest par attiecīgo sintezētā proteīna daudzumu, tādēļ papildus mRNS ekspresijas līmeņa notiekšanai nepieciešama proteomikas analīze (Smith, 2006). Lai noteiktu, vai ABC transportproteīnu ekspresijas izmaiņas veidojas pastiprinātas gēnu ekspresijas vai amplifikācijas rezultātā, būtu nepieciešams eksperimentā iekļaut arī pārbaudāmo gēnu kopiju skaita noteikšanu.

#### 4.5. Cilmsūnības izmaiņas MDA-MB-231 šūnu līnijā pēc apstrādes ar doksorubicīnu

VCŠ raksturīgo īpašību pret doksorubicīnu rezistentā apakšpopulācijā raksturošanai tika veikta vairāku ar VCŠ saistītu transkriptomiskās gēnu ekspresijas noteikšana.

*CD44+/CD24-* fenotips ir viens no visplašāk pētītajiem VCŠ marķieriem krūts vēža pētījumos, un šāda fenotipa šūnām raksturota audzēja un metastāžu veidošanas spēja, kā arī nelabvēlīgs ārstēšanas iznākums (Deng *et al.*, 2017; Sheridan *et al.*, 2006). MDA-MB-231, salīdzinot ar citām trīskārši negatīvām šūnu līnijām, šūnu populāciju veido galvenokārt *CD44+/CD24-* fenotipa šūnas un tās ir relatīvi rezistentas pret doksorubicīnu un citiem antraciklīniem (Deng *et al.*, 2017). Eksperimentā DOX pasāžā tika novērota paaugstināta ekspresija gan *CD24* (3,00 reizes), gan *CD44* (1,42 reizes), kas DOX+1 pasāžā bija zemāka un tuva sākotnējai. Aizkuņģa dziedera duktālās adenokarcinomas šūnu līnijā ir parādīts, ka radiācijas ietekmē apoptoze mazāk ietekmē tieši *CD44+/CD24+* fenotipa šūnas. Šādam fenotipam pēc radiācijas apstrādes šūnas atrodas galvenokārt G0/G1 fāzes un tām raksturīga zemāka skābekļa radikāļu iekššūnas koncentrācija (Wang *et al.*, 2017). Tādēļ varētu būt iespējams, ka šāds fenotips rezistentām šūnām raksturīgs pēc ķīmijterapijas un staru terapijas apstrādes un ka, iespējams, *CD44+/CD24-* fenotips ne vienmēr liecina par VCŠ fenotipu. Tomēr būtu nepieciešams ekspresijas datus kvantitēt, aprēķinot mRNS kopiju skaitu, lai objektīvāk varētu novērtēt šo gēnu ekspresijas izmaiņas attiecībā pret kontroles kultūru.

*ITGA6* un *ITGB1* ir integrīnu grupas gēni un VCŠ raksturojoši marķieri. Abu gēnu paaugstināta ekspresija literatūrā tiek saistīta ar cilmes šūnu un VCŠ fenotipu, kā arī invazitāti un metastāzēm (Brooks *et al.*, 2016; Kim & Ryu, 2017). *ITGA6+/ITGB1+/CD24+* šūnām pierādīta spēja izveidot audzēju *in vivo* modelī (Vassilopoulos *et al.*, 2013). Eksperimentā pēc doksorubicīna ekspozīcijas tika novērota zemāka abu gēnu transkriptomiskā ekspresija, kas DOX+1 pasāžā bija tuvāka sākotnējam ekspresijas līmenim.

*ALDH1A1* tiek plaši pielietots VCŠ atpazīšanā un raksturošanā. *ALDH1A1* ir raksturota nozīmīga loma ķīmijrezistences nodrošināšanā, un tās ekspresijas līmenis korelē ar ārstēšanas prognozi (El-Badawy *et al.*, 2017). Augsta *ALDH1A1* ekspresija un embrionālās cilmes šūnu marķieru ekspresija novērota pret paklitakselu rezistentā MDA-MB-231 šūnu līnijā (Liu *et al.*, 2013). Literatūrā aprakstīta no *CD44+/CD24-* atšķirīgas *ALDH1A1* ekspresijas izmaiņas dažādās trīskārši negatīva krūts vēža šūnu līnijās (Deng *et al.*, 2017). Eksperimenta kontroles MDA-MB-231 šūnās netika novērota *ALDH1A1* ekspresija, taču DOX un DOX+1 šī gēna ekspresija bija visaugstākā no visiem eksperimentā pārbaudītajiem gēniem. Tas varētu liecināt par iespējamu VCŠ atbilstoša fenotipa šūnu īpatsvara palielināšanos.

VCŠ raksturīgā spēja atjaunot populāciju pēc lielākās populācijas daļas bojāejas doksorubicīna ietekmē eksperimentā tika novērota DOX+1 kultūrā, kur populāciju atjaunošanu nodrošināja relatīvi neliels šūnu skaits (Weihua *et al.*, 2011). DOX+1 pasāžas kultivēšanas gaitā bija novērojama neadherentu šūnu sakopojumu veidošanās, kas vizuāli bija līdzīgi vairākos pētījumos aprakstītajiem un attēlotajiem VCŠ un/vai tām līdzīgu šūnu sakopojumiem mammosfēru testos (El-Badawy *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2015), kā arī sakrita ar suspensijā novēroto dzīvo šūnu skaita izmaiņu dinamiku. Klonogenitātes testā konstatētā statistiski būtiski paaugstinātā koloniju veidošanas spēja DOX+1 pasāžas kultūrai ( $48,8 \pm 12,0$  %), salīdzinot ar kontroli ( $30,8 \pm 9,5$  %), sakrīt ar citos pētījumos atspoguļoto informāciju par milzu šūnu pēcteču šūnām, kam piemīt VCŠ īpašības un paaugstināta koloniju veidošanas spēja (Weihua *et al.*, 2011). Gēnu transkriptomiskās ekspresijas izmaiņas, citu analīžu rezultāti un novērojumi liecina, ka MDA-MB-231 šūnu kultūrā pēc punktveida apstrādes ar doksorubicīnu veidojas šūnas ar VCŠ līdzīgām īpašībām.

## SECINĀJUMI

1. Pēc apstrādes ar doksorubicīnu iegūta heterogēna MDA-MB-231 šūnu kultūra ar samazinātu jutību pret doksorubicīnu.

2. Jutības pret doksorubicīnu samazināšanās, iespējams, saistīta ar paaugstinātu ABC saimes transportproteīnu kodējošo gēnu *ABCB8*, *ABCB9*, *ABCB10*, *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC10* ekspresiju.

3. Lai arī daži no vēža cilmes šūnu raksturojošiem marķiergēniem ir ar paaugstinātu ekspresiju šūnās pēc apstrādes ar doksorubicīnu, ir grūti apgalvot, ka populācijā palielinājies vēža cilmes šūnu īpatsvars.

4. MDA-MB-231 šūnas, kas izdzīvojušas pēc apstrādes ar doksorubicīnu, ir ar augstāku populācijas atjaunošanās un koloniju veidošanās spēju, kas varētu liecināt par saistību starp rezistences veidošanos un agresīvāku un dzīvotspējīgāku šūnu populāciju selekciju.

## PATEICĪBAS

Darba autore izsaka pateicību darba vadītājam Dipl. pharm. Valdim Pirsko un konsultantei Dr. biol. Inesei Čakstiņai, RSU Onkoloģijas institūta direktoram Prof. Dr. biol. Edvīnam Miklaševičam, Molekulārās ģenētikas laboratorijas vadītājai Assoc. prof. Dr. med. Zandai Danebergai un laboratorijas kolektīvam, kā arī Msc. chem. Kārlim Pleiko un Dr. habil. med. Jekaterinai Ērenpreisai.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abuhammad, S., & Zihlif, M. (2013). Genomics Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics*, *101*(4), 213–220.
2. Achuthan, S., Santhoshkumar, T. R., Prabhakar, J., Nair, S. A., & Pillai, M. R. (2011). Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(43), 37813–37829.
3. Alfarouk, K. O., Stock, C. M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., ... Rauch, C. (2015). Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International*, *15*(1), 1–13.
4. Arcamone, F., Cassinelli, G., Faktini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., & Spalla, C. (1969). Antitumor Antibiotic from, *XI*, 1101–1110.
5. Ayob, A. Z., & Ramasamy, T. S. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Journal of Biomedical Science*, *25*(1), 1–18.
6. Barpe, D. R., Rosa, D. D., & Froehlich, P. E. (2010). Pharmacokinetic evaluation of doxorubicin plasma levels in normal and overweight patients with breast cancer and simulation of dose adjustment by different indexes of body mass. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *41*(3–4), 458–463.
7. Begicevic, R.-R., & Falasca, M. (2017). ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11), 2362.
8. Bjerkgvig, R., Tysnes, B. B., Aboody, K. S., & Najbauer, J. (2005). current controversies and new insights, *5*(November), 899–904.
9. Brooks, D. L. P., Schwab, L. P., Krutilina, R., Parke, D. N., Sethuraman, A., Hoogewijs, D., ... Seagroves, T. N. (2016). ITGA6 is directly regulated by hypoxia- inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models. *Molecular Cancer*, 1–19.
10. Chavez, J. K., Garimella, V. S., & Lipkowitz, S. (2012). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis*, *32*, 35–48.
11. Cox, J., & Weinman, S. (2016). Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma, *3*(1), 57–59.
12. Dean, M. (2009). ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *14*(1), 3–9.
13. Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*, *5*(4), 275–284.

14. Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The Human ATP-Binding Cassette transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42(Md), 1007–1017.
15. Deng, X., Apple, S., Zhao, H., Song, J., Lee, M., Luo, W., ... Chang, H. R. (2017). CD24 Expression and differential resistance to chemotherapy in triple-negative breast cancer, 8(24), 38294–38308.
16. Doyle, A. L., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells, 95(December), 15665–15670.
17. Duru, N., Candas, D., Jiang, G., & Li, J. J. (2014). Breast cancer adaptive resistance: HER2 and cancer stem cell repopulation in a heterogeneous tumor society. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140(1), 1–14.
18. El-Badawy, A., Ghoneim, M. A., Gabr, M. M., Salah, R. A., Mohamed, I. K., Amer, M., & El-Badri, N. (2017). Cancer cell-soluble factors reprogram mesenchymal stromal cells to slow cycling, chemoresistant cells with a more stem-like state. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–20.
19. Erenpreisa, J., Ivanov, A., Wheatley, S. P., Kosmacek, E. A., Ianzini, F., Anisimov, A. P., ... Illidge, T. M. (2008). Endopolyploidy in irradiated p53-deficient tumour cell lines: Persistence of cell division activity in giant cells expressing Aurora-B kinase.
20. Filipits, M., Pohl, G., Rudas, M., Dietze, O., Lax, S., Grill, R., ... Jakesz, R. (2005). Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: The Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 23(6), 1161–1168.
21. Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J., & Norris, M. D. (2010). ABC transporters in cancer: More than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer*, 10(2), 147–156.
22. Frank, N. Y., Pendse, S. S., Lapchak, P. H., Margaryan, A., Shlain, D., Doeing, C., ... Frank, M. H. (2003). Regulation of Progenitor Cell Fusion by ABCB5 P-glycoprotein , a Novel Human ATP-binding Cassette Transporter \*, 278(47), 47156–47165.
23. Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.
24. Gewirtz, D. A. (1999). A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin, 57(98), 727–741.
25. Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2001). MULTIDRUG RESISTANCE IN CANCER : ROLE OF ATP-DEPENDENT TRANSPORTERS, 2(January), 48–58.
26. Hafner, M., Niepel, M., Chung, M., & Sorger, P. K. (2016). Growth rate inhibition

metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. *Nature Methods*, 13(6), 521–527.

27. Hafner, M., Niepel, M., & Sorger, P. K. (2017). Alternative drug sensitivity metrics improve preclinical cancer pharmacogenomics, 35(6), 52–54.

28. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

29. Hempel, G., Flege, S., Würthwein, G., & Boos, J. (2002). Peak plasma concentrations of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 49(2), 133–141.

30. Hernan, C.-F., & Coronado, C. (2007). Role of anthracyclines in the era of targeted therapy, 56–60.

31. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 714–726.

32. Hu, H., Wang, M., Guan, X., Yuan, Z., Liu, Z., Zou, C., ... Wang, X. (2018). Loss of ABCB4 attenuates the caspase-dependent apoptosis regulating resistance to 5-Fu in colorectal cancer, 0(January), 1–10.

33. Ishikawa, T. (2012). Recent advances in pharmacogenomics of ABC transporters involved in breast cancer therapy. *Pharmacogenomics*, 13(6), 633–636.

34. Janssen, M. J. H., Crommelin, D. J. A., Storm, G., & Hulshoff, A. (1985). Doxorubicin decomposition on storage. Effect of pH, type of buffer and liposome encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 23(1), 1–11.

35. Jaramillo, A. C., Al Saig, F., Cloos, J., Jansen, G., & Peters, G. J. (2018). How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance? *Cancer Drug Resistance*, 1(1), 6–29.

36. Jia, D., Tan, Y., Liu, H., Ooi, S., Li, L., Wright, K., ... Wang, L. (2015). Cardamonin reduces chemotherapy-enriched breast cancer stem-like cells in vitro and in vivo, 7(1), 2015–2016.

37. Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug in chinese hamster ovary cell mutants permeability, 455, 152–162.

38. Kibria, G., Hatakeyama, H., Akiyama, K., Hida, K., & Harashima, H. (2014). Comparative study of the sensitivities of cancer cells to doxorubicin, and relationships between the effect of the drug-efflux pump P-gp. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37(12), 1926–1935.

39. Kim, W., & Ryu, C. J. (2017). Cancer stem cell surface markers on normal stem cells, 50(6), 285–298.

40. Krischke, M., Hempel, G., Völler, S., André, N., D’Incalci, M., Bisogno, G., ... Boos, J. (2016). Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a “European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium” trial. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78(6), 1175–1184.
41. Kruh, G. D., & Belinsky, M. G. (2003). The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, 22(47 REV. ISS. 6), 7537–7552.
42. Lee, J. S., Scala, S., Matsumoto, Y., Dickstein, B., Robey, R., Zhan, Z., ... Bates, S. E. (1997). Reduced Drug Accumulation and Multidrug Resistance in Human Breast Cancer Cells Without Associated P-Glycoprotein or MRP Overexpression, 526, 513–526.
43. Leggett, S. E., Sim, J. Y., Rubins, J. E., Neronha, Z. J., Williams, K., & Wong, I. Y. (2017). Morphological Single Cell Profiling of the Epithelial- Mesenchymal Transition, 8(11), 1133–1144.
44. Leonard, G. D. (2003). The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *The Oncologist*, 8(5), 411–424.
45. Liang, Y., Zhong, Z., Huang, Y., Deng, W., Cao, J., Tsao, G., ... Zeng, Y. X. (2010). Stem-like cancer cells are inducible by increasing genomic instability in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(7), 4931–4940.
46. Liu, P., Kumar, I. S., Brown, S., Kannappan, V., Tawari, P. E., Tang, J. Z., ... Wang, W. (2013). Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 109(7), 1876–1885.
47. Liu, Y., Peng, H., & Zhang, J. (2005). Expression profiling of ABC transporters in a drug-resistant breast cancer cell line using AmpArray. *Molecular Pharmacology*, 68(2), 430–438.
48. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C T}$  Method, 408, 402–408.
49. McDermott, M., Eustace, A. J., Busschots, S., Breen, L., Crown, J., Clynes, M., ... Stordal, B. (2014). In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Frontiers in Oncology*, 4(March).
50. Mckenna, M. T., Weis, J. A., Barnes, S. L., Tyson, D. R., Miga, I., Quaranta, V., & Yankeelov, T. E. (2017). Modeling Approach for the Study of Doxorubicin Treatment in Triple Negative Breast Cancer. *Scientific Reports*, (February), 1–14.
51. Mirzayans, R., Andrais, B., & Murray, D. (2018). Roles of Polyploid / Multinucleated Giant Cancer Cells in Metastasis and Disease Relapse Following Anticancer Treatment.

52. Moitra, K., Lou, H., & Dean, M. (2011). Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: Insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 89(4), 491–502.
53. Mosieniak, G., Sliwinska, M. A., Alster, O., Strzeszewska, A., Sunderland, P., Piechota, M., ... Sikora, E. (2015). Polyploidy Formation in Doxorubicin-Treated Cancer Cells Can Favor Escape from Senescence. *Neoplasia*, 17(12), 882–893.
54. Niepel, M., Hafner, M., Williams, E. H., Chung, M., Barrette, A. M., Alan, D., ... Sorger, P. K. (2017). A multi-center study on factors influencing the reproducibility of in vitro drug- response studies.
55. Nowell, P. C. (1976). The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations.
56. Patel, A., Li, T. W., Anreddy, N., Wang, D. S., Sodani, K., Gadhia, S., ... Chen, Z. S. (2017). Suppression of ABCG2 mediated MDR in vitro and in vivo by a novel inhibitor of ABCG2 drug transport. *Pharmacological Research*, 121, 184–193.
57. Pavlik, E. J., Kenady, D. E., van Nagell, J. R., Hanson, M. B., Donaldson, E. S., Casper, S., ... Flanigan, R. C. (1984). Stability of doxorubicin in relation to chemosensitivity determinations: Loss of lethality and retention of antiproliferative activity. *Cancer Investigation*, 2(6), 449–458.
58. Rabindran, S. K., He, H., Singh, M., Brown, E., Collins, K. I., Annable, I., & Greenberger, L. M. (1998). Reversal of a Novel Multidrug Resistance Mechanism in Human Colon Carcinoma Cells by Fumitremorgin C, 5850–5859.
59. Rajaraman, R., Guernsey, D. L., Rajaraman, M. M., & Rajaraman, S. R. (2006). Stem cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer. *Cancer Cell International*, 6, 1–26.
60. Rivera, E., & Gomez, H. (2010). Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer : the evolving role of ixabepilone, 12(Suppl 2), 1–12.
61. Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer*.
62. Robey, R. W., To, K. K. K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M., & Bates, S. E. (2009). ABCG2: A perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(1), 3–13.
63. Saxena, M., Stephens, M. A., Pathak, H., & Rangarajan, A. (2011). Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death and Disease*, 2(7), e179-13.
64. Sell, S. (2010). On the Stem Cell Origin of Cancer, 176(6), 2584–2594.
65. Shaloam, D., & Tchounwou, P. B. (2015). Cisplatin in cancer therapy : molecular mechanisms of action, 364–378.

66. Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R. K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C. H., ... Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24-Breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: An early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Research*, 8(5), 1–13.
67. Silverton, L., Dean, M., & Moitra, K. (2011). Variation and evolution of the ABC transporter genes ABCB1, ABCC1, ABCG2, ABCG5 and ABCG8: Implication for pharmacogenetics and disease. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 26(4), 169–179.
68. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., Vistica, D., Warren, J. T., ... Boyd, M. R. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for, 1107–1112.
69. Sliwinska, M. A., Mosieniak, G., Wolanin, K., Babik, A., Piwocka, K., Magalska, A., ... Sikora, E. (2009). Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(1–2), 24–32.
70. Smith, L. (2006). The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 2115–2120.
71. Solazzo, M., Fantappie, O., Amico, M. D., Sassoli, C., Tani, A., Cipriani, G., ... Mazzanti, R. (2009). Mitochondrial Expression and Functional Activity of Breast Cancer Resistance Protein in Different Multiple Drug-Resistant Cell Lines, (18), 7235–7243.
72. Sun, L., Cabarcas, S. M., & Farrar, W. L. (2012). Radioresistance and Cancer Stem Cells: Survival of the Fittest. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 51(01), 1–12.
73. Szakacs, G., Annereau, J., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K. J., ... Gottesman, M. M. (2004). Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells, 6(August), 129–137.
74. Tecza, K., Pamula-Pilat, J., Lanuszewska, J., & Grzybowska, E. (2014). Genetic polymorphisms and response to 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients. *Oncotarget*, 7(41), 66790–66808.
75. Tegze, B., Szállási, Z., Haltrich, I., Péntzváltó, Z., Tóth, Z., Likó, I., & Gyorffy, B. (2012). Parallel evolution under chemotherapy pressure in 29 breast cancer cell lines results in dissimilar mechanisms of resistance. *PLoS ONE*, 7(2), 1–9.
76. Trock, B. J., Leonessa, F., & Clarke, R. (1997). Multidrug Resistance in Breast Cancer :, 917–931.
77. Valent, P., Bonnet, D., Maria, R. De, Lapidot, T., Schuringa, J. J., Stassi, G., ... Johnsen, H. E. (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details, (October).
78. Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, 3(3), 281–290.
79. Vassilopoulos, A., Chisholm, C., Lahusen, T., Zheng, H., & Deng, C. (2013). A

critical role of CD29 and CD49f in mediating metastasis for cancer-initiating cells isolated from a Brca1-associated mouse model of breast cancer, (October), 1–6.

80. Vinogradov, S., Wei, and X., & Thor. (2013). Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*, 7(4), 597–615.

81. Waghary, D., & Zhang, Q. (2017). Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-glycoprotein in Cancer Treatment. *Journal of Medicinal Chemistry*, acs.jmedchem.7b01457.

82. Wang, L.-L., Liu, Y.-H., Meng, L.-L., Li, C. G., & Zhou, S.-F. (2011). Phenotype Prediction of Non-Synonymous Single-Nucleotide Polymorphisms in Human ATP-Binding Cassette Transporter Genes. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 108(2), 94–114.

83. Wang, L. E. I., Li, P., Hu, W. E. I., Xia, Y., Hu, C., Liu, L., & Jiang, X. (2017). CD44 + CD24 + subset of PANC-1 cells exhibits radiation resistance via decreased levels of reactive oxygen species, (9), 1341–1346.

84. Ween, M. P., Armstrong, M. A., Oehler, M. K., & Ricciardelli, C. (2015). The Role of ABC Transporters in Ovarian Cancer Progression and Chemoresistance. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*.

85. Weihua, Z., Lin, Q., Ramoth, A. J., Fan, D., & Fidler, I. J. (2011). Formation of Solid Tumors by a Single Multinucleated Cancer Cell, 4092–4099.

86. Wolking, S., Schaeffeler, E., Lerche, H., Schwab, M., & Nies, A. T. (2015). Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clinical Pharmacokinetics*, 54(7), 709–735.

87. Wu, H., Kang, H., Liu, Y., Tong, W., Liu, D., Yang, X., ... Wei, M. (2012). Roles of ABCB1 gene polymorphisms and haplotype in susceptibility to breast carcinoma risk and clinical outcomes. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(9), 1449–1462.

88. Wu, H., Liu, Y., Kang, H., Xiao, Q., Yao, W., Zhao, H., ... Wei, M. (2015). Genetic Variations in ABCG2 Gene Predict Breast Carcinoma Susceptibility and Clinical Outcomes after Treatment with Anthracycline-Based Chemotherapy. *BioMed Research International*, 2015.

89. Xiang, D., Shigdar, S., Bean, A. G., Bruce, M., Yang, W., Mathesh, M., ... Duan, W. (2017). Transforming doxorubicin into a cancer stem cell killer via EpCAM aptamer-mediated delivery. *Theranostics*, 7(17).

90. Yao, J., Yao, X., Tian, T., Fu, X., Wang, W., Li, S., ... Huo, X. (2017). ABCB5-ZEB1 Axis Promotes Invasion and Metastasis in Breast Cancer Cells. *Oncology Research*, 25(3), 305.

91. Zhang, J. T. (2007). Use of arrays to investigate the contribution of ATP-binding

cassette transporters to drug resistance in cancer chemotherapy and prediction of chemosensitivity. *Cell Research*, 17(4), 311–323.

92. Zhang, S., Xing, Z., Sun, B., Kuang, J., & Liu, J. (2013). Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*, 33(1), 116–128.

93. Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A.-M., & Sampath, J. (2001). The ABC transporter Bcrp1 / ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype, 7(9).

Programmas R pakotnes:

94. Clark N. (2016). GRmetrics: Calculate growth-rate inhibition (GR) metrics. R package version 1.0.0, <https://github.com/uc-bd2k/GRmetrics>.

95. Wicham H. (2017). Tidyverse: Easily Install and Load the 'Tidyverse'. R package version 1.2.1, <https://CRAN.R-project.org/package=tidyverse>.

96. Warnes G. R, Bolker B., Bonebakker L., Gentleman R., Huber W., Liaw A., Lumley T., Maechler M., Magnusson A., Moeller S., Schwartz M., Venables B. (2009). gplots: Various R programming tools for plotting data. R package version 3.0.1. <https://CRAN.R-project.org/package=gplots>

Interneta resursi:

97. [www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26](http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26)

98. [www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)

99. [www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi](http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)

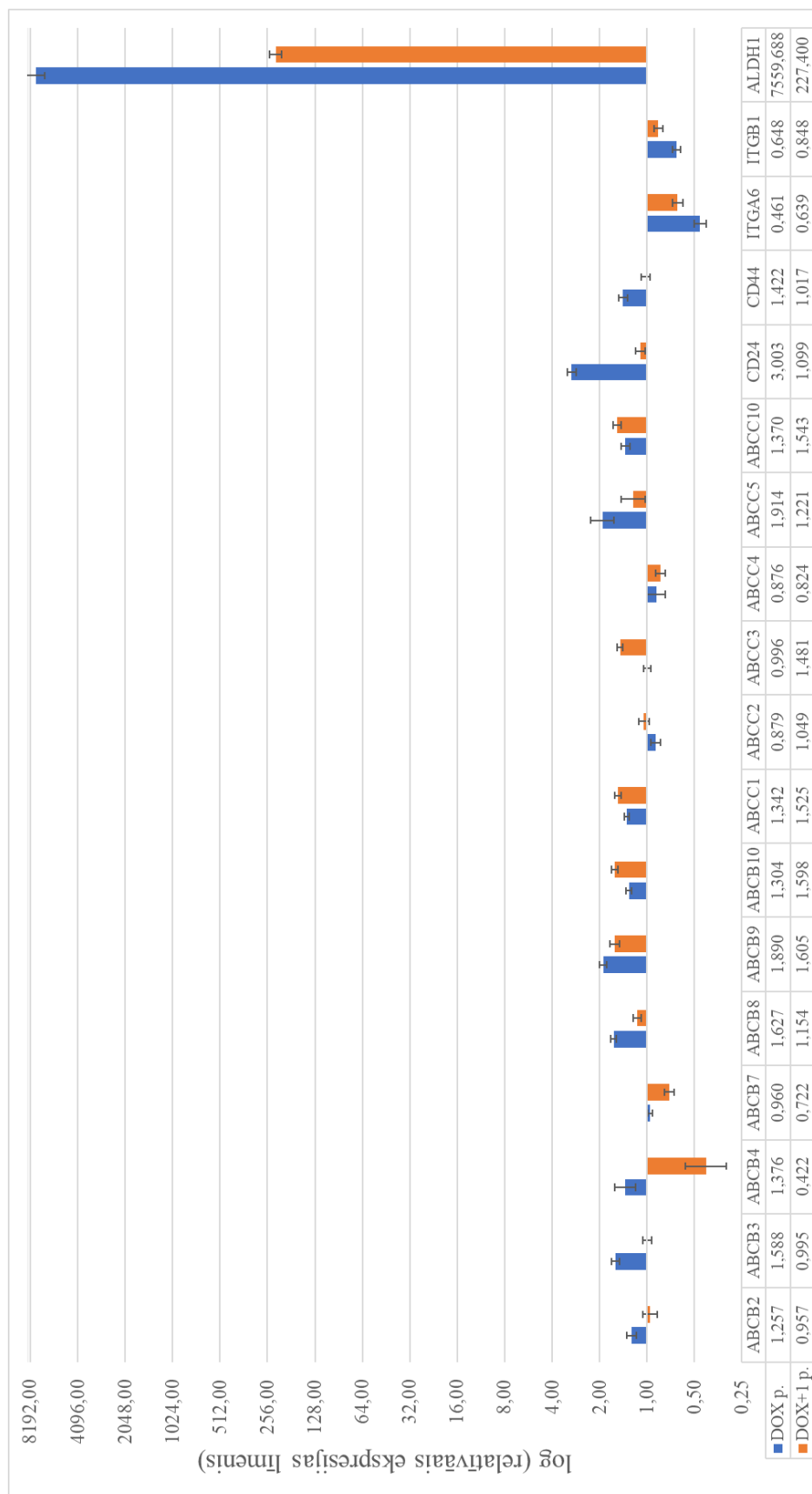
100. [www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber](http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber)

## PIELIKUMI

| <b>Ķīmijterapijas savienojums</b> | <b>N.p.k.</b> | <b>Konc. lauciņā</b> | <b>Šķ. konc.</b> | <b>Šķ. nr.</b> | <b>Šķ. V, <math>\mu</math>l</b> | <b>A10- V, <math>\mu</math>l</b> | <b>Kopējais V, <math>\mu</math>l</b> |
|-----------------------------------|---------------|----------------------|------------------|----------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| FU                                | 1.            | 5 mM                 | 10 mM            | Stoks          | 39                              | 1461                             | 1500                                 |
|                                   | 2.            | 2,5 mM               | 5 mM             | 1.             | 640                             | 640                              | 1280                                 |
|                                   | 3.            | 1 mM                 | 2 mM             | 2.             | 580                             | 870                              | 1450                                 |
|                                   | 4.            | 500 $\mu$ M          | 1 mM             | 3.             | 750                             | 750                              | 1500                                 |
|                                   | 5.            | 250 $\mu$ M          | 500 $\mu$ M      | 4.             | 788                             | 788                              | 1576                                 |
|                                   | 6.            | 175 $\mu$ M          | 350 $\mu$ M      | 5.             | 875                             | 375                              | 1250                                 |
|                                   | 7.            | 100 $\mu$ M          | 200 $\mu$ M      | 6.             | 511                             | 384                              | 895                                  |
|                                   | 8.            | 25 $\mu$ M           | 50 $\mu$ M       | 7.             | 195                             | 585                              | 780                                  |
|                                   | 9.            | 2,5 $\mu$ M          | 5 $\mu$ M        | 8.             | 77                              | 693                              | 770                                  |
|                                   | 10.           | 0,25 $\mu$ M         | 0,5 $\mu$ M      | 9.             | 70                              | 630                              | 700                                  |
| DOX                               | 1.            | 25 $\mu$ M           | 50 $\mu$ M       | Stoks          | 14                              | 1022                             | 1036                                 |
|                                   | 2.            | 2,5 $\mu$ M          | 5 $\mu$ M        | 1.             | 180                             | 1620                             | 1800                                 |
|                                   | 3.            | 1,75 $\mu$ M         | 3,5 $\mu$ M      | 2.             | 1050                            | 450                              | 1500                                 |
|                                   | 4.            | 1 $\mu$ M            | 2 $\mu$ M        | 3.             | 708                             | 531                              | 1239                                 |
|                                   | 5.            | 250 nM               | 500 nM           | 4.             | 400                             | 1200                             | 1600                                 |
|                                   | 6.            | 175 nM               | 350 nM           | 5.             | 854                             | 366                              | 1220                                 |
|                                   | 7.            | 100 nM               | 200 nM           | 6.             | 520                             | 390                              | 910                                  |
|                                   | 8.            | 25 nM                | 50 nM            | 7.             | 195                             | 585                              | 780                                  |
|                                   | 9.            | 2,5 nM               | 5 nM             | 8.             | 77                              | 693                              | 770                                  |
|                                   | 10.           | 0,25 nM              | 0,5 nM           | 9.             | 70                              | 630                              | 700                                  |
| CIS                               | 1.            | 250 $\mu$ M          | 500 $\mu$ M      | Stoks          | 303                             | 1697                             | 2000                                 |
|                                   | 2.            | 175 $\mu$ M          | 350 $\mu$ M      | 1.             | 1050                            | 450                              | 1500                                 |
|                                   | 3.            | 100 $\mu$ M          | 200 $\mu$ M      | 2.             | 800                             | 600                              | 1400                                 |
|                                   | 4.            | 25 $\mu$ M           | 50 $\mu$ M       | 3.             | 405                             | 1215                             | 1620                                 |
|                                   | 5.            | 17,5 $\mu$ M         | 35 $\mu$ M       | 4.             | 910                             | 390                              | 1300                                 |
|                                   | 6.            | 10 $\mu$ M           | 20 $\mu$ M       | 5.             | 600                             | 450                              | 1050                                 |
|                                   | 7.            | 2,5 $\mu$ M          | 5 $\mu$ M        | 6.             | 295                             | 885                              | 1180                                 |
|                                   | 8.            | 1,375 $\mu$ M        | 2,75 $\mu$ M     | 7.             | 462                             | 378                              | 840                                  |
|                                   | 9.            | 0,25 $\mu$ M         | 0,5 $\mu$ M      | 8.             | 140                             | 630                              | 770                                  |
|                                   | 10.           | 25 nM                | 50 nM            | 9.             | 70                              | 630                              | 700                                  |
| VB                                | 1.            | 17,5 $\mu$ M         | 35 $\mu$ M       | Stoks          | 9                               | 1406                             | 1415                                 |
|                                   | 2.            | 10 $\mu$ M           | 20 $\mu$ M       | 1.             | 600                             | 450                              | 1050                                 |
|                                   | 3.            | 2,5 $\mu$ M          | 5 $\mu$ M        | 2.             | 220                             | 990                              | 1210                                 |
|                                   | 4.            | 1,375 $\mu$ M        | 2,75 $\mu$ M     | 3.             | 495                             | 405                              | 900                                  |
|                                   | 5.            | 250 nM               | 500 nM           | 4.             | 164                             | 738                              | 902                                  |
|                                   | 6.            | 25 nM                | 50 nM            | 5.             | 170                             | 1530                             | 1700                                 |
|                                   | 7.            | 17,5 nM              | 35 nM            | 6.             | 910                             | 390                              | 1300                                 |
|                                   | 8.            | 10 nM                | 20 nM            | 7.             | 516                             | 387                              | 903                                  |
|                                   | 9.            | 2,5 nM               | 5 nM             | 8.             | 194                             | 582                              | 776                                  |
|                                   | 10.           | 0,25 nM              | 0,5 nM           | 9.             | 70                              | 630                              | 700                                  |

1. pielikums. Citotoksicitātes testā izmantoto savienojumu atšķaidījumi šūnu jutības pret doksorubicīnu (DOX), cisplatīnu (CIS), vinblastīnu (VB) un fluorouracilu (FU) novērtēšanai.

Appendix 1. Dilutions of compounds used to evaluate cell sensitivity to doxorubicin (DOX), cisplatin (CIS), vinblastine (VB) and fluorouracil (FU) in the cytotoxicity assay.



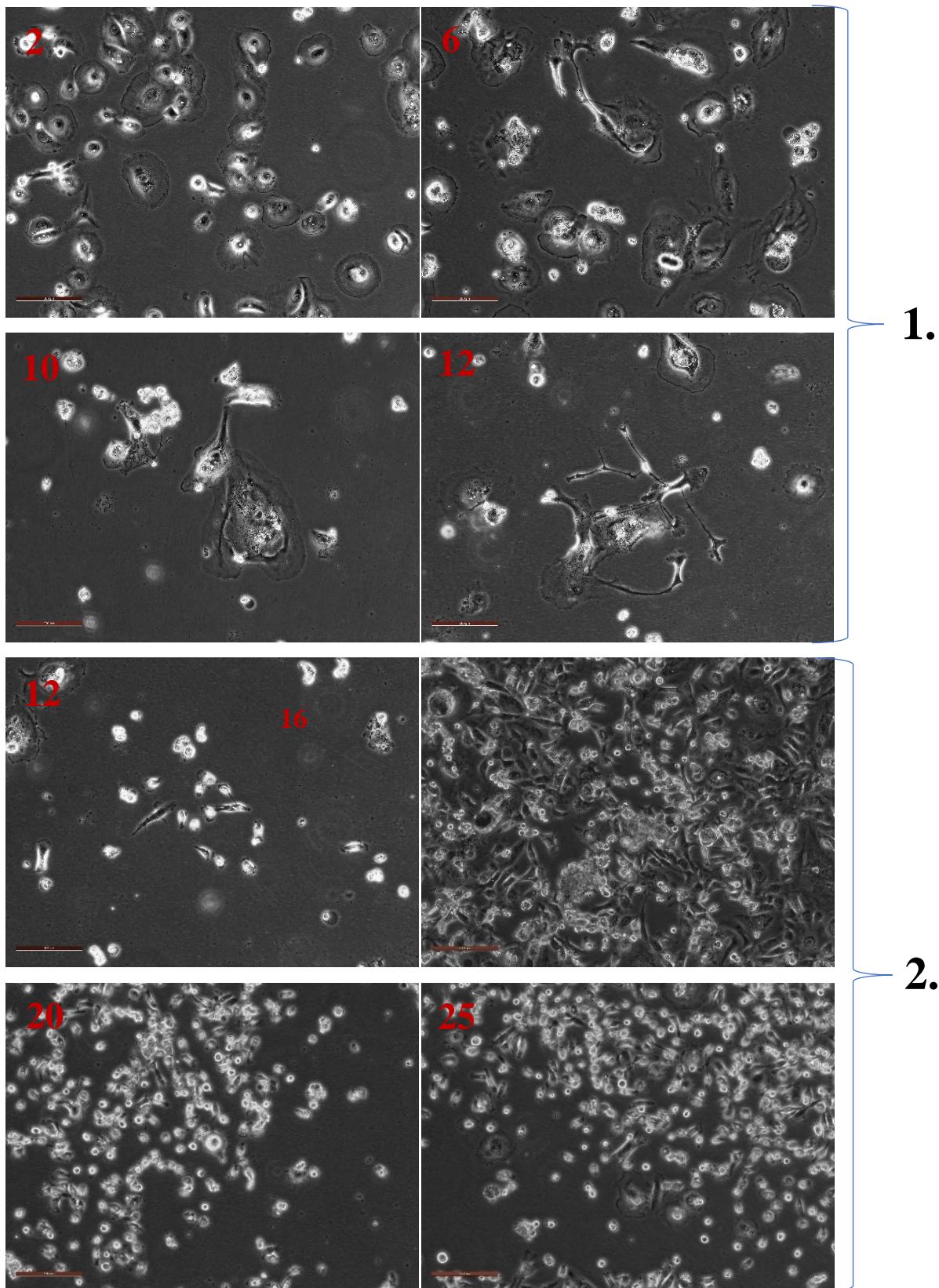
2. pielikums. ABC saimes un VCŠ ģēnu relatīvais ekspresijas līmenis (RQ) pēc doksorubicīna apstrādes pasāžās DOX un DOX+1. Ekspresijas līmeņa izmaiņu (reižu skaita) vērtībām norādīts 95% ticamības intervāls.

Appendix 2. ABC family and CSC gene relative expression level after doxorubicin treatment of passages DOX and DOX+1. Changes in expression level (RQ) are shown with 95% confidence interval.

| Gēns           | A             |                |               |
|----------------|---------------|----------------|---------------|
|                | Kontrole/DOX  | Kontrole/DOX+1 | DOX/DOX+1     |
| <i>ABCB2</i>   | 0,0057 (**)   | 0,6458         | 0,0422 (*)    |
| <i>ABCB3</i>   | 0,0001 (***)  | 0,881          | 0,0004 (***)  |
| <i>ABCB4</i>   | 0,1003        | 0,0450 (*)     | 0,0168 (*)    |
| <i>ABCB7</i>   | 0,202         | 0,0050 (**)    | 0,0089 (**)   |
| <i>ABCB8</i>   | 0,0002 (***)  | 0,0354 (*)     | 0,0007 (***)  |
| <i>ABCB9</i>   | 0,0002 (***)  | 0,0015 (**)    | 0,0229 (*)    |
| <i>ABCB10</i>  | 0,0019 (**)   | 0,0001 (***)   | 0,0067 (**)   |
| <i>ABCC1</i>   | 0,0010 (**)   | 0,0002 (***)   | 0,0609        |
| <i>ABCC2</i>   | 0,1155        | 0,5231         | 0,1096        |
| <i>ABCC3</i>   | 0,9293        | 0,0001 (***)   | 0,0007 (***)  |
| <i>ABCC4</i>   | 0,3864        | 0,0401 (*)     | 0,6507        |
| <i>ABCC5</i>   | 0,0198 (*)    | 0,3155         | 0,0001 (***)  |
| <i>ABCC10</i>  | 0,0080 (**)   | 0,0009 (***)   | 0,0836        |
| <i>CD24</i>    | 0,0001 (***)  | 0,0415 (*)     | 0,0001 (***)  |
| <i>CD44</i>    | 0,0005 (***)  | 0,5693         | 0,0002 (***)  |
| <i>ITGA6</i>   | 0,0004 (***)  | 0,0007 (***)   | 0,0048 (**)   |
| <i>ITGB1</i>   | 0,0001 (***)  | 0,0017 (**)    | 0,0002 (***)  |
| <i>ALDH1A1</i> | >0,0001 (***) | >0,0001 (***)  | >0,0001 (***) |

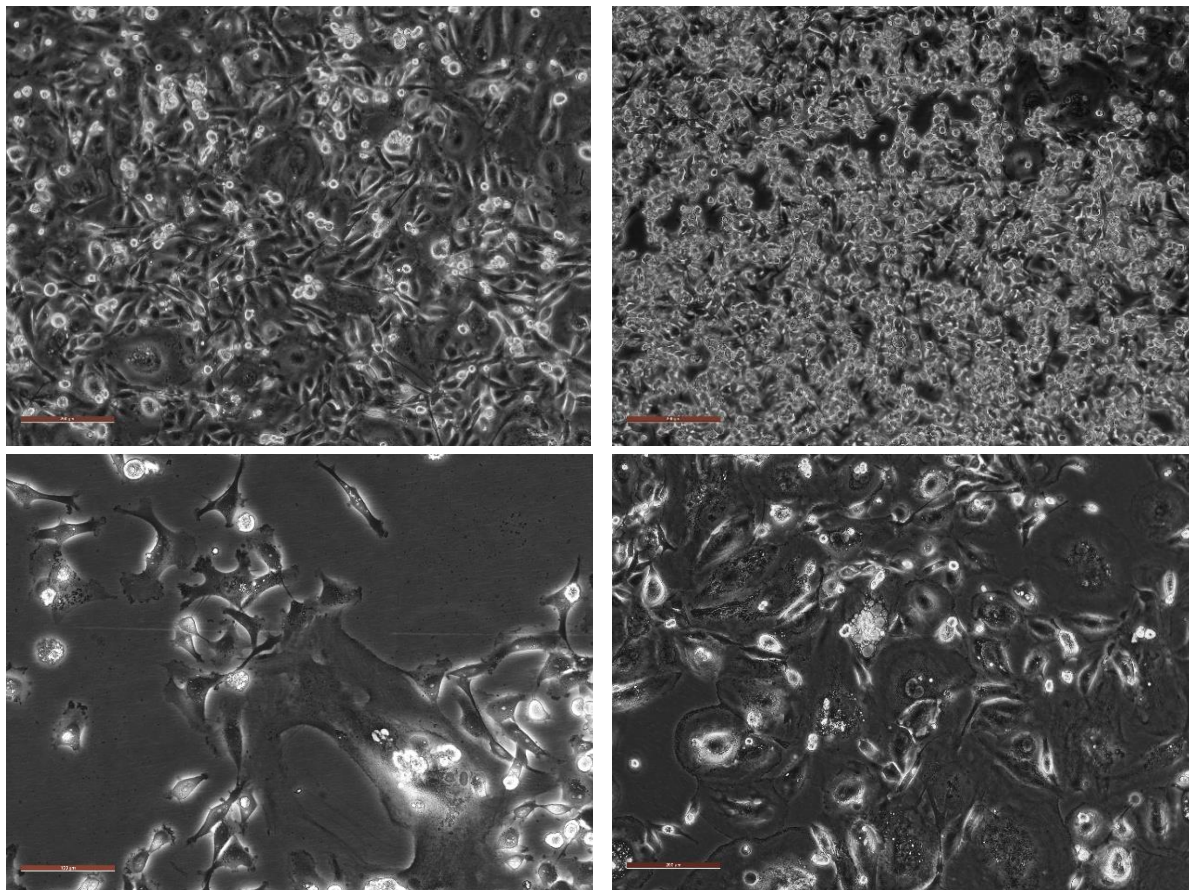
3. pielikums. ABC saimes un VCŠ gēnu transkriptomiskās ekspresijas dCt vērtību atšķirību statistiskais būtiskums (p vērtība) DOX un DOX+1 pasāžu kultūrām (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ).

Appendix 3. Statistical significance (p value) of ABC family and CSC gene transcriptomic expression dCt values of culture passages DOX and DOX+1 (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ).



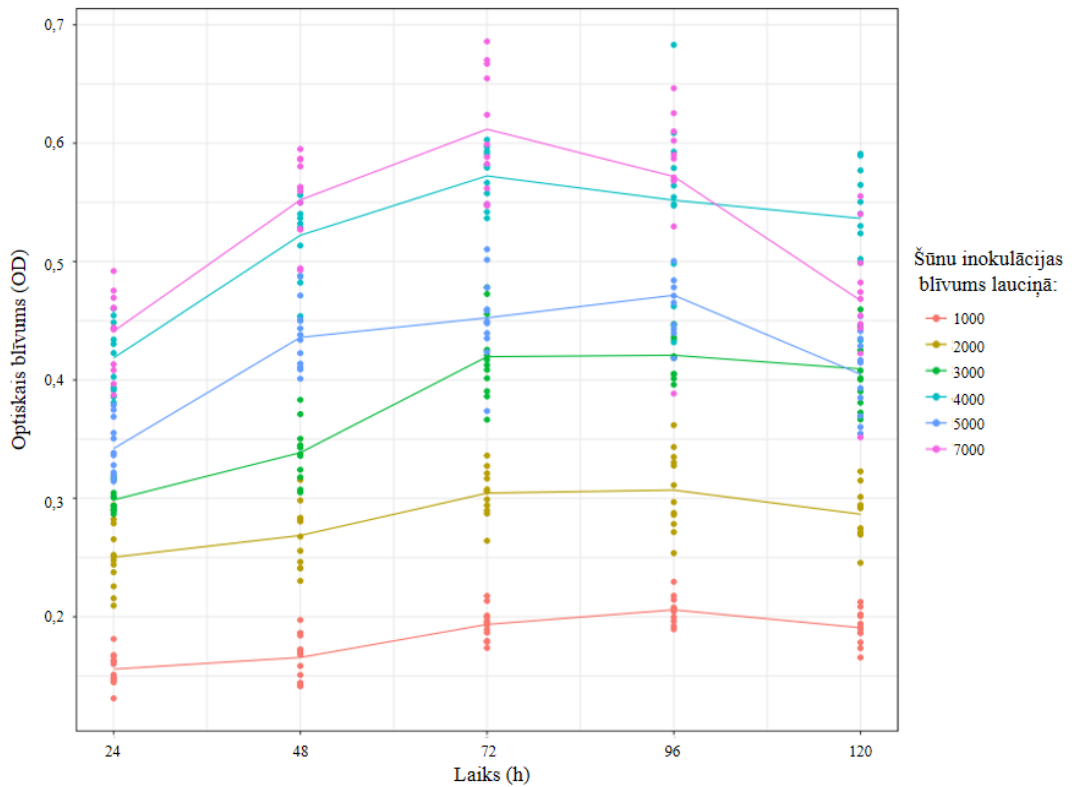
4. pielikums. Doksorubicīna iedarbībai pakļauto MDA-MB-231 šūnu morfoloģija (DOX+1 pasāža) – pirmais (šūnu izmēra palielināšanās un bojāeja) un otrais (koloniju veidošanās un populācijas atjaunošanās) augšanas posms. Cipari norāda kultivēšanas dienu. Attēla palielinājums ir 100x, mēroga nogrieznis – 200  $\mu$ m.

Appendix 4. Morphology of MDA-MB-231 cells after doxorubicin exposure (DOX+1 passage) – first (cell size increase and cell death) and second (colony formation and regeneration of population) growth stage. The day of cultivation is marked with numbers. Magnification – 100x, length of scalebar – 200  $\mu$ m.



5. pielikums. Šūnu morfoloģija pēc doksorubicīna ekspozīcijas DOX+1 pasāžā. Attēlotas atšķirīgas morfoloģijas šūnu kolonijas un grupas atjaunotā šūnu populācijā pirms pārsēšanas un sagatavošanas analīzēm (33. diena). Attēla palielinājums – 100x, mēroga nogrieznis – 200  $\mu\text{m}$ .

Appendix 5. Cell morphology after doxorubicin exposure in DOX+1 passage. Colonies and groups with different morphology in a regenerated cell population before reseeded and preparation for analyses (day 33) are shown. Picture magnification – 100x, length of scalebar – 200  $\mu\text{m}$ .



6. pielikums. Izmēģinājuma kultūras pēc doksorubicīna ekspozīcijas (DOX pasāža) modelētās augšanas līknes dažādos izsēšanas blīvumos (1000-7000 šūnas lauciņā). OD vērtību pieaugums un sekojoša samazināšanās skaidrojama ar eksperimenta kultūrā A novēroto šūnu izmēra palielināšanos un secīgu bojāeju DOX+1 kultūras pirmajā augšanas posmā.

Appendix 6. Growth curves with different cell seeding densities (1000-7000 cells per well) from trial culture after doxorubicin exposure (passage DOX). The increase of OD values can be explained by the observed enlarging of cell size followed by cell death during the first growth phase of experimental culture A during DOX+1 passage.