

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

ATŠĶIRĪGU BAROTŅU IETEKME UZ KRŪTS VĒŽA ŠŪNU
LĪNIJU FENOTIPISKĀM PAZĪMĒM

Bakalaura darbs

Autore: Rasma Dortāne

Stud.apl. Nr. rd13009

Darba vadītājs: Dipl. pharm. Valdis Pirsko

RĪGA 2016

KOPSAVILKUMS

Krūts vēzis ir ļaundabīgs audzējs, kas atšķiras gan viena audzēja ietvaros, gan starp indivīdiem. Lai noskaidrotu pacientam piemērotāko ārstēšanas veidu, tiek noteikti vēža tipi pēc tos veidojošo šūnu morfoloģijas, producētajiem receptoriem, kā arī gēnu ekspresijas. Šūnu kultūrās barotņu sastāvs un citi augšanas apstākļi ietekmē kultivēto šūnu signālprocesus un gēnu ekspresiju.

Darbā tika pārbaudīta četru atšķirīgu barotņu ietekme uz krūts vēža līniju (MCF7 un MDA-MB-231) un fibroblastu (HDFa) šūnu līnijas augšanu un fenotipu. Atšķirības tika konstatētas, imūnfluorescenti salīdzinot proteīnu ekspresijas intensitāti, izmantojot augstas caurlaidspējas attēlieguves sistēmu *InCell analyzer 2200*. Atšķirīgos barotņu sastāvos, izmainījās šūnu veidotie proteīni un fenotips.

Atslēgvārdi: krūts vēzis, imūnfluorescence, šūnu morfoloģija, šūnu kultūras

SUMMARY

Breast cancer is malignant tumor with high heterogeneity between individual patients and even within one tumor. Cancer subtypes are classified by cell morphology, produced receptors and gene expression. This information is necessary for choosing the most appropriate therapy.

Components of cell culture media and other factors affect cell signalling and gene expression. Therefore, the aim of this study is to compare three different cell lines cultured in four types of media by using immunofluorescence, observe changes in growth and phenotype. The expression of proteins in breast cancer cell lines (MCF7 and MDA-MB-231) and stromal fibroblast cell line HDFa was compared by using InCell analyzer 2200 imaging system. The protein expression and cell phenotype changed in different cell culture media.

The title of the work: Effect of different culture media on the phenotype of breast cancer cell lines

Key words: breast cancer, immunofluorescence, phenotype, cell morphology, cell culture

SAĪSINĀJUMI

µg	mikrogrami
µl	mikrolitri
A5	barotne ar piedevām, DMEM:F12 attiecībā 1:1
A10	barotne bez piedevām, ar 10% FBS
ALDH1A1	aldehīda dehidrogenāze
apgr./min	apgriezieni minūtē
ATCC	Amerikas audu kultūras kolekcija (<i>American Type Culture Collection</i>)
B5	barotne ar piedevām, M199 un F12 attiecībā 1:1
CALR	kalretikulīns
Ct	holeras toksīns
D5	barotne ar piedevām, DMEM:F12 attiecībā 1:3
DMEM F12	Dulbeko modificētā Īgla vide ar barotnes piedevu F-12 attiecībā 1:1 (<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium Ham`s F-12 (1:1)</i>)
DPBS	Dulbeko fosfāta buferēts fizioloģiskais šķīdums (<i>Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline</i>)
E2	estradiols
EGF	epidermālais augšanas faktors
EpCam	epitēlija šūnu adhēzijas molekula
ER	estrogēna receptors
F12	<i>Ham`s F-12 Nutrient Mixture</i>
FBS	Teļa fetālais serums (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
g	grami
HC	hidrokortizons
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinītanefosfonijskābe
HER2/ERBB2	cilvēka epidermālā augšanas faktora 2 receptors
I	insulīns
ICF	imūnfluorescence
KAF	karcinomas fibroblasti
Ki67	šūnu proliferācijas marķieris
KRT5/6	keratīns 5/6
KRT14	keratīns 14
KRT19	keratīns 19
M199	vide 199 (<i>Medium 199</i>)

ml	mililitri
MUC1	mucīns 1
NAF	normāla krūts dziedzeru fibroblasti
NGS	normālais kazas serums (<i>Normal Goat serum</i>)
Pen/Strep	penicilīna streptomicīna šķīdums
PGR	progesterona receptors
RNS	ribonukleīnskābe
Se	nātrijs selenīts
T3	3,3',5-trijodo-L-tironīns
TUBA4A	alfa tubulīns
T	transferīns
VIM	vimentīns

SATURS

Kopsavilkums	2
Summary.....	3
Saīsinājumi	4
Saturs	6
Ievads.....	8
1. Literatūras apskats	9
1.1. Krūts uzbūve, to veidojošie šūnu tipi.....	9
1.2. Krūts vēzis un tā klasifikācija	13
1.2.1. Histoloģiskā klasifikācija	13
1.2.2. Imūnhistoķīmiskā un molekulārā klasifikācija.....	15
1.3. Šūnu kultivēšana	17
1.3.1. Zīdītāju šūnu kultūras	17
1.3.2. Audzēja šūnu kultivēšana	19
1.4. Krūts vēža šūnu līnijas	22
1.5. Biomarkieri	23
1.6. Barotnes sastāvs	25
2. Materiāli un metodes	28
2.1. Materiāli.....	28
2.1.1. Šūnu līnijas	28
2.1.2. Reaģenti	29
2.1.3. Laboratorijas iekārtas	30
2.1.4. Laboratorijas materiāli.....	31
2.1.5. Darba šķīdumi	31
2.1.6. Barotnes	32
2.2. Metodes.....	35
2.2.1.Šūnu kultivēšana.....	35
2.2.1.1. Šūnu atsaldēšana	35

2.2.1.2.	Šūnu pārsēšana	36
2.2.1.3.	Šūnu skaitīšana	36
2.2.1.4.	Izsēšana dažādās barotnēs	37
2.2.1.4.	Šūnu kultivēšana, novērošana un pārsēšana.....	37
2.2.1.5.	Šūnu saldēšana.....	39
2.2.1.6.	Imūnfluorescence.....	39
3.	Rezultāti un diskusija	43
3.1.	Šūnu morfoloģija	43
3.2.	Populācijas dubultošanās laiks un šūnu dzīvotspēja.....	46
3.3.	Imūnfluorescentā iezīmēšana.....	49
3.4.	Šūnās producētie proteīni.....	51
	Secinājumi	61
	Pateicības.....	62
	Literatūras saraksts	63

IEVADS

Krūts vēzis ir viens no biežākajiem vēža veidiem pasaulē. Pēc ATCC (*American Type Culture Collection*) pieejamajiem datiem ir izveidotas 45 krūts vēža šūnu līnijas. Tomēr pētījumi tiek veikti arī ar izdalītu materiālu no pacientēm. Kultivējot vēža šūnas, tām ir jānodrošina specifiski augšanas apstākļi. Barotnes sastāvam ir ļoti liela ietekme uz šūnu signālprocesiem un gēnu ekspresiju. Izdalot primārās krūts vēža šūnas no biopsijas materiāla, tiek iegūts heterogēns šūnu paraugs, kas satur ne tikai audzēja šūnas, bet arī stromas šūnas (fibroblastus vai asinsvadu endotēliju). Šīs šūnas inhibē krūts karcinomas epitēlija šūnu augšanu, kas traucē vēža šūnu pētīšanu (Freshney 2012). Lai samazinātu cilvēka saistaudu šūnu daudzumu un veicinātu tieši audzēja šūnu proliferāciju *in vitro*, ir nepieciešams specifisks barotnes sastāvs.

Šajā pētījumā tika pārbaudīta četru atšķirīgu barotņu ietekme uz divām krūts vēža līnijām (MCF7 un MDA-MB-231) un pieauguša cilvēka dermālo fibroblastu (HDFa) šūnu līnijas augšanu un fenotipu. Atšķirības tika konstatētas veicot imūnfluorescento iezīmēšanu, salīdzinot proteīnu ekspresijas intensitāti, izmantojot augstas caurlaidspējas attēlieguves sistēmu – InCell analīzētāji 2200.

Bakalaura darba mērķis ir ar imūnfluorescences palīdzību salīdzināt trīs atšķirīgu šūnu līniju augšanas un fenotipa izmaiņas, kultivējot tās četros dažādos augšanas apstākļos.

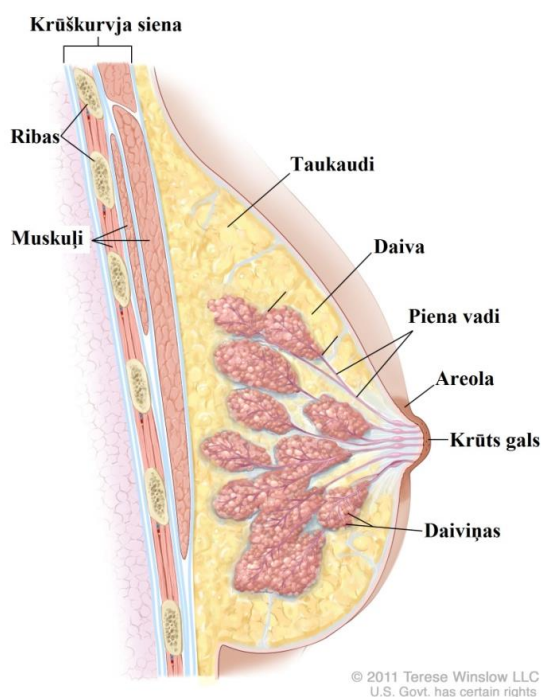
Lai sasniegtu mērķi tika izvirzīti šādi uzdevumi:

1. kultivēt atsauces šūnu līnijas četrās atšķirīgās barotnēs,
2. veikt imūnfluorescento iezīmēšanu ar krūts vēža šūnu fenotipu un proliferāciju raksturojošiem biomarķieriem,
3. analizēt iegūtos datus, salīdzinot fluorescences intensitāti.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Krūts uzbūve, to veidojošie šūnu tipi

Pienu izdaloši dziedzeri, kas nepieciešami pēcnācēju barošanai, ir raksturīgi tikai zīdītājiem. Sievietēm krūtis ir apaļi izaugumi, kas veidoti no piena dziedzeriem, bagātīgi izklātas ar taukaudiem un blīvajiem saistaudiem (1.attēls) (Jatoi and Kaufmann 2010). Krūts stromu veido adipocīti, fibroblasti, endotēlija šūnas (Carels *et al.* 2016). Tajā atrodas asinsvadi, limfvadi, limfmezgli un nervi (Lieberman 2005). Krūts āda ir plāna, tā satur matu folikulus, tauku dziedzerus un eksokrīnos sviedru dziedzerus. Krūti apasiņo galvenokārt iekšējā piena un laterālā krūškurvja artērija. Limfātiskajai krūts drenāžai ir liela nozīme brīdī, kad izplatās ļaundabīgs krūts audzējs (Harris *et al.* 2010).



1.attēls. Sievietes krūts anatomiskā uzbūve šķērsgriezumā

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/pmh/PMH_Authoring/media/Images/originals/FemBreastAnatomySideView300dpi.jpg).

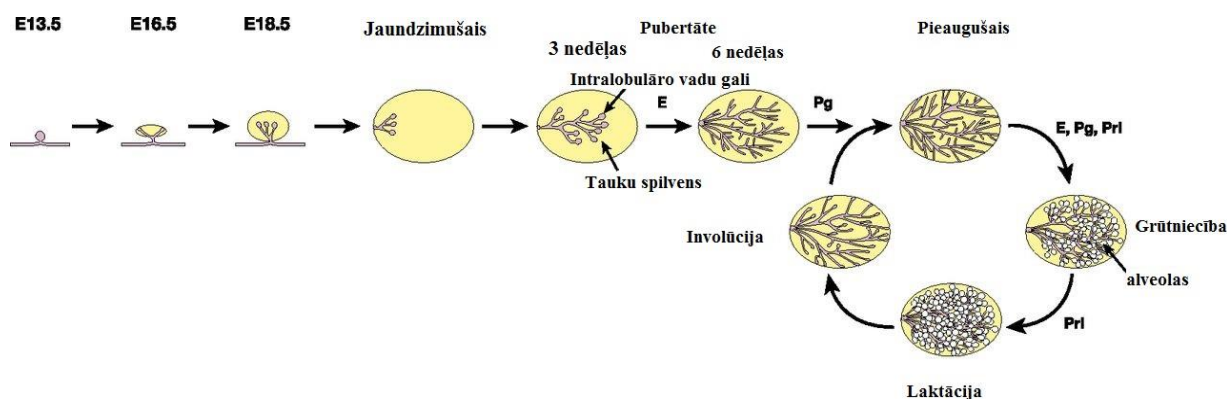
Figure 1. Anatomy of female breast in cross section

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/pmh/PMH_Authoring/media/Images/originals/FemBreastAnatomySideView300dpi.jpg).

Sieviešu krūts dziedzeris dzīves laikā maina savu struktūru, formu un apmērus. Jaundzimušajam nav attīstītas krūts dziedzera daiviņas. Mazulim saistaudu stromā ir redzami

tikai zaroti izvadkanāli. Pubertātē pastiprināti pieaug krūts dziedzeru masa, jo notiek tauku šūnu priekšteču proliferācija un diferenciācija. Vienlaikus notiek arī epitēlija proliferācija, kuras rezultātā piena izvadkanāli pagarinās un zarojas, līdz tie ir sasnieguši krūts fasciju. Krūts dziedzeru vienu daiviņu veido intralobulārie (daiviņu) piena vadi un terminālo vadiņu jeb acinusu kompleksi (Markovs 2007). Starpdaivu (interlobulārie) piena vadi transportē pienu uz krūts galu (Santagata *et al.* 2014). Vienu krūts daivu veido vairākas daiviņas, bet piena dziedzeri veido 15-20 daivas (Jatoi and Kaufmann 2010). Krūts dziedzeru stromas augšdaļā atrodas turētājsaites jeb Kūpera saites (Markovs 2007).

Peles piena dziedzeru agrīnā ontogēnēze sākas ar to, ka embrija attīstības 13,5 dienā (E13,5) rodas piena dziedzeru pumpuri, kas iekļaujas mezenhīmā. Līdz embrija 15,5 dienai šie pumpuri izplatās un veido lūmenu. 18,5 dienā ir attīstījies neliels piena dziedzeris, kas atrodas mazā tauku spilvenā. Turpmāk piena dziedzeris ir relatīvi neaktīvs līdz pubertātes trešajai nedēļai, kad estrogēna (E) ietekmē notiek turpmākā attīstība. Pubertātes beigās dziedzeru zarošanos regulē progesterons (2.attēls) (Visvader and Stingl 2014).



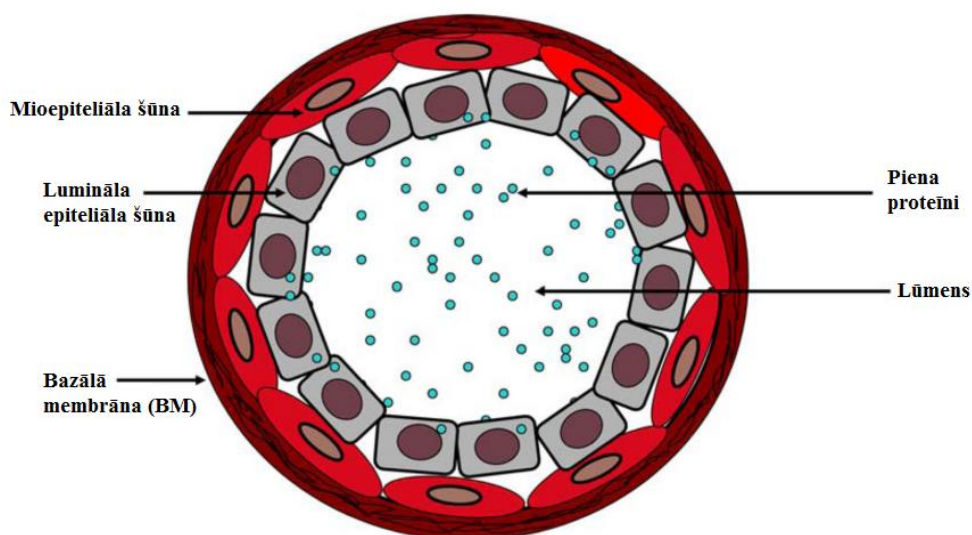
2.attēls. Shematiska agrīna peles piena dziedzeru ontogēnēze embrijā un pieaugušā īpatnī (Visvader and Stingl 2014).

Figure 2. Schematic ontogeny of mouse mammary gland in the embryo and adult (Visvader and Stingl 2014).

Grūtniecības pirmajā trimestrī estrogēna ietekmē notiek epitēlija šūnu proliferācija intralobulārajos vados un veidojas jauni acinusi. Otrajā grūtniecības trimestrī progesterona ietekmē diferenciējas dziedzeru šūnu acinusi. Tajos ir daudz mitohondriju un labi attīstīts graudainais endoplazmatiskais tīkls. Pēdējā grūtniecības trimestrī šo šūnu citoplazmā parādās sekretorās granulas un tauku pūslīši. Tieši pirms dzemdībām tiek sekretēti laktalbumīns, lizozīms un laktoferīns. Laktācija sākas pēc dzemdībām, kad piena dziedzerī prolaktīna ietekmē izdalās piens. Laktācijas laikā terminālie vadiņi transformējas par alveolārajiem acinusiem, kam ir lielāks tilpums. Starpdaivu piena vadi savāc piena sekrētu no vienas daivas.

Tos veido intralobulārie vadi, kuri, saplūstot kopā, veido inetrlobulāros vadus (Markovs 2007). Pēc zīdīšanas beigām glandulocīti apoptozes ceļā iet bojā. Ar leukocītu palīdzību tiek fagocitēti apoptotiskie ķermeņi un piena komponenti, samazinās acinusu lūmens (Markovs 2007). Pēc laktācijas dziedzeris atgriežas tādā pašā stāvoklī kā pirms grūtniecības (Visvader and Stingl 2014).

Pienvadi veido katras daivas izvada gala posmu, un tos izklāj daudzkārtainais plakanais epitēlijs. Krūts dziedzeris veido pienu vadus izklāj vienkārtainais cilindriskais vai kubiskais epitēlijs (Makarovs 2007). To veido divu veidu epitēlija šūnas – mioepiteliālās šūnas, kas veido ārējo slāni, un polāras luminālās epitēlija šūnas, kas veido iekšējo slāni. Šos abus slāņus ieskauj bazālā membrāna (3.attēls) (Pandey *et al.* 2010). Trešais sastopamais šūnu tips krūts dziedzerī ir bazālās šūnas, kas ir epitēlija šūnu priekšteči (Tornillo and Smalley 2015).



3.attēls. Piena dziedzeris vada šķērsgrīzums (Pandey *et al.* 2010).

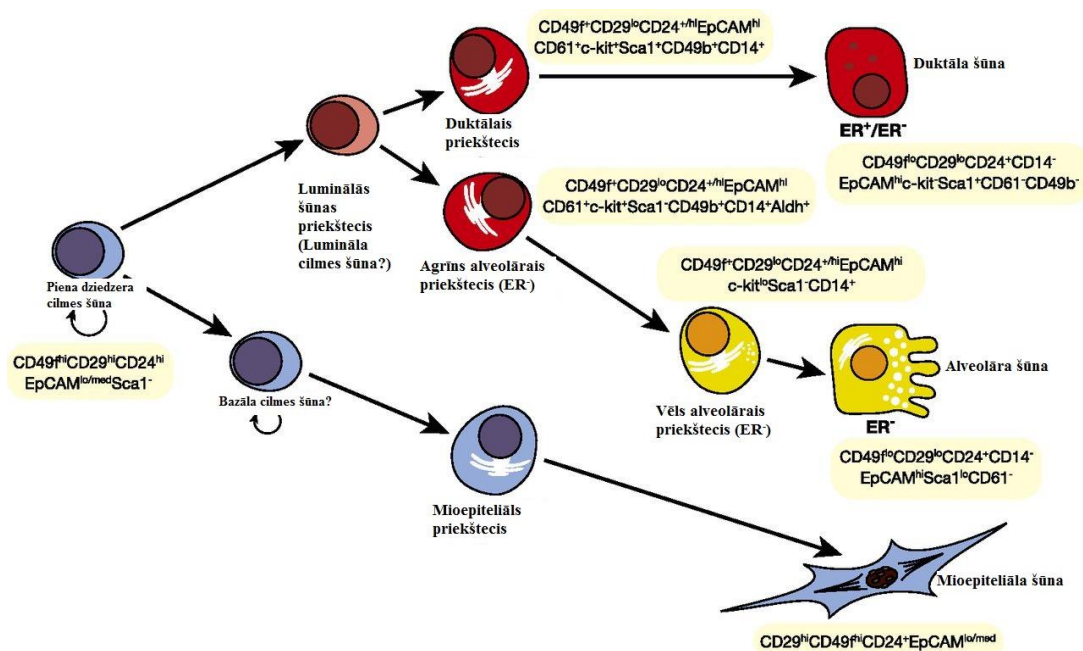
Figure 3. Cross section of mammary gland duct (Pandey *et al.* 2010).

Luminālās A šūnas ir bazofilas un satur daudz ribosomu. (Harris *et al.* 2010). Tām centrā ir ovāls kodols, neliels daudzums citoplazmas. Tās ir kubiskas formas. Luminālo šūnu galvenā funkcija ir piena producēšana (Jatoi and Kauffman 2010). Luminālās šūnas ekspresē ER, CK7, CK8, CK18, CK19, PR u.c. receptorus (Bertucci *et al.* 2012).

Bazālās šūnas ir caurspīdīgas ar olveida kodolu, bez kodoliņa (Harris *et al.* 2010). Dažādos literatūras avotos nav vienota viedokļa par bazālajām B šūnām. Ir minējums, ka bazālās šūnas ir mioepiteliālās šūnas, kas ir funkcionāli specializējušās (Sleeman *et al.* 2007). Daži uzskata, ka piena dziedzeru epitēlijs ir veidots no luminālām un bazālām/mioepiteliālām šūnām (Carels *et al.* 2016). Bertucci *et al.* norāda, ka mioepiteliālās šūnas, kas atrodas tuvu bazālajai membrānai, tiek maldinoši sauktas par bazālajām šūnām. Bazālās šūnas uzskata par

nenobriedušiem priekštečiem un cilmes šūnām (Bertucci *et al.* 2012). Krūts vēža cilmes šūnas tiek raksturotas pēc ALH1A1, CD44 un CD24 ekspresijas. Šāda tipa šūnas biežāk ir sastopamas pacientiem, kuri jau ir saņēmuši ķīmijterapiju. Tas apstiprina aizdomas, ka krūts vēža cilmes šūnas ir populācija audzējā, kas ir rezistenta pret ķīmijterapiju. Dažādos attīstības posmos krūtī atrodami atšķirīgi cilmes šūnu veidi. Lai gan tās atrodas krūts bazālajā slānī, arī luminālo šūnu daļa satur šūnas, no kurām var attīstīties krūts vēzis (Clevers *et al.* 2011).

Mioepiteliālās šūnas nodrošina piena izgrūšanu no luminālajām šūnām (Jatoi and Kaufmann 2010). Mioepiteliālajām šūnām piemīt īpašības, kas raksturīgas gan epitēlija, gan gludo muskuļu šūnām. Tāpat kā gludajos muskuļos mioepiteliālajās šūnās ir aktīva filamentu un miozīns, un tām piemīt kontraktīlas īpašības. Mioepiteliālajās šūnās ir daudz mikrofilamentu un gludajiem muskuļiem raksturīgie citoskeleta proteīni – alfa aktīns un miozīns (Pandey *et al.* 2010). Kā epitēlija šūnas tās veido starpfilamentus un tām ir ar kadherīnu saistītie starpšūnu kontakti (Adriance *et al.* 2005). Šūnas ir zarotas, zvaigzņveida formas. Šo šūnu kontraktīlo darbību stimulē steroīdie hormoni - prolaktīns un oksitocīns (4.attēls) (Harris *et al.* 2010).



4.attēls. Iespējamie epitēlija šūnu priekšteči un marķieri to noteikšanai (Visvader and Stingl 2014).

Figure 4. Prospectively identified epithelial cell progenitors and their markers (Visvader and Stingl 2014).

Piena dziedzeru bazālās membrānas sastāvā ietilpst IV tipa kolagēns, laminīns, fibronektīns u.c. proteīni. Visi šie savienojumi ir atrodami gan piena vadu, gan daiviņu

bazālajās membrānās. Bazālā membrāna ir nepieciešama daudzām epitēlija šūnu funkcijām: piena producēšanai, mijiedarbībai ar prolaktīnu un ER α ekspresijai. Šīs funkcijas nodrošina starpšūnu kontakti. Kontakts starp epitēlija šūnām un bazālo membrānu ir ļoti svarīgs audu veidošanā un funkcionēšanā. Piemēram, audu kultūrās krūts epitēlija šūnām, kas nespēj noenkuroties pie laminīna bazālajā membrānā, ir traucēta polaritāte un tās neveido piena proteīnu β -kazeīnu. Laminīns aktivizē β -kazeīna gēna ekspresiju (Jatoi and Kauffman 2010).

Krūtī ir trīs veidu saistaudi: irdenie saistaudi daiviņās, blīvie neregulārie saistaudi starp daiviņām un taukaudi. Blīvajos saistaudos ir biezi kolagēna un elastīgo saišu sakopojumi, kas ietver atsevišķas daiviņu vienības. Epitēlija un stromas mijiedarbība ir nepieciešama normālai krūts attīstībai un diferenciacijai (Jatoi *et al.* 2010).

Starpdaivu (interlobulāros) saistaudus veido pārsvarā fibroblasti un adipocīti. Daivu saistaudos ir arī makrofāgi, eozinofilie leikocīti, limfocīti un plazmas šūnas. Cilvēka krūts fibroblastiem piemīt spēja inhibēt epitēlija šūnu proliferāciju, tomēr tad, ja fibroblastu ir vairāk par epitēlija šūnām, šis efekts samazinās (Jatoi and Kaufmann 2010). Uzskata, ka ar karcinomu saistītie fibroblasti veicina vēža attīstību. Ja normāla krūts dziedzera fibroblastus (NAF – *normal breast associated fibroblasts*) salīdzina ar karcinomas fibroblastiem (CAF – *carcinoma-associated fibroblasts*), tad novēro, ka NAF ievērojami vairāk par CAF nomāc epitēlija šūnu proliferāciju. Iespējams, kanceroģenēzes rezultātā fibroblasti zaudē ietekmi uz epitēlija šūnu dalīšanos (Sadlonova *et al.* 2005).

1.2. Krūts vēzis un tā klasifikācija

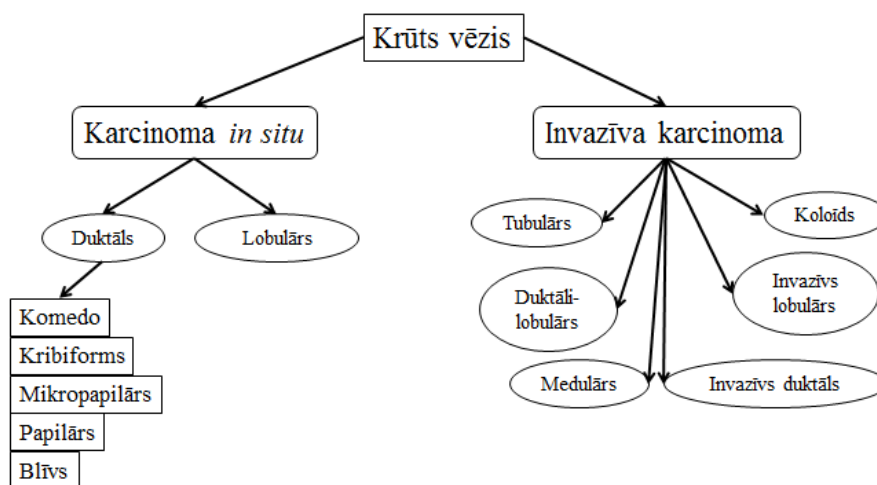
1.2.1. Histoloģiskā klasifikācija

Krūts vēzis ir ļaundabīgs audzējs. Pēc morfoloģiskām pazīmēm to iedala karcinomās un sarkomās. Sarkoma ir sastopama tikai ~ 0,1% gadījumos. Tā veidojas no stromas šūnām krūts audos (Adem *et al.* 2004). Karcinoma ir krūts vēzis, kas veidojas no epitēlija šūnām (Jatoi *et al.* 2010). Karcinomu iedala: karcinoma *in situ* un invazīva karcinoma (5. attēls).

Karcinoma *in situ* ir stadija, kad vēl nav notikusi ļaundabīgo šūnu invāzija krūts audos. Šīs vēža šūnas proliferē krūts daiviņās un vados. Šī karcinoma var kļūt par invazīvu karcinomu, kuras šūnas aug ārpus daiviņām un piena vadiem. Invazīvas karcinomas var veidot attālas metastāzes un izplatīties ķermenī (Anonymus 2015a). Epiteliāli-mezenhimālās tranzīcijas laikā šūnas zaudē epiteliālās iezīmes un iegūst mezenhimālu raksturu.

Šīs šūnas metastāžu veidošanās laikā migrē prom no primārā audzēja, iekļūst limfvados un izplatās dažādos ķermeņa orgānos (visbiežāk – smadzenēs, plaušās, aknās, kaulos). Metastāzes veidojošās šūnas producē vimentīnu, tāpēc šūnu kultūras raksturošanai var noteikt

tā ekspresiju (Ackland *et al.* 2003). Histoloģiski karcinoma *in situ* tiek iedalīta duktālajā vai lobulārajā atkarībā no epiteliālo šūnu izcelsmes vietas (piena vadi vai daiviņas). Duktālā karcinoma *in situ* (DCIS) ir sastopama biežāk nekā lobulārā karcinoma *in situ* (LCIS).



5.attēls. Krūts vēža histoloģiskais iedalījums (Malhotra *et al.* 2010).

Figure 5. Histological classification of breast cancer (Malhotra *et al.* 2010).

Konstatējot krūts vēzi, parasti tiek noteikta arī tā malignitāte. To nosaka, mikroskopiski salīdzinot normālas krūts šūnas ar audzēja šūnām histoloģiskā griezumā. Izmanto dažādas sistēmas, bet viena no tādām ir Notingemas histoloģiskā punktu sistēma, kas klīnikā tiek izmantota visbiežāk. Pamatā tiek izvirzīti 3 faktori:

1. Noformētu dziedzeru daudzums:
 - a. >75% audzēja laukuma veido dziedzerveida struktūras,
 - b. 10-75% audzēja laukuma veido dziedzerveida struktūras,
 - c. <10% audzēja laukuma veido dziedzerveida struktūras.
2. Kodola pazīmes:
 - a. mazs kodols, kas ir nedaudz lielāks nekā normālās šūnās, regulāra šūnas robeža, maza lieluma variācija;
 - b. šūnas lielākas nekā normāli, ar lielu vezikulāru kodolu, redzamu kodoliņu un vidēju variāciju lielumā un formā;
 - c. vezikulārs kodols, izteikts kodoliņš, ļoti liela dažādība izmērā un formā, nereti megašūnas
3. Mitotiskā aktivitāte:
 - a. 50x palielinājumā 10 laukos ir 7-10 šūnas mitozes fāzē;
 - b. 50x palielinājumā 10 laukos ir 8-14 šūnas mitozes fāzē;
 - c. 50x palielinājumā 10 laukos ir vairāk par 15 šūnām mitozes fāzē.

Katrā no faktoriem tiek piešķirti punkti no viens līdz trīs. Agresivitātes pakāpe tiek noteikta pēc punktu skaita, jo mazāka pakāpe, jo mazāk agresīvs audzējs: pirmā pakāpe (līdz pieciem punktiem), otrā pakāpe (līdz septiņiem punktiem) un trešā pakāpe (līdz 9 punktiem) (Anonymus 2015b).

1.2.2. Imūnhistoķīmiskā un molekulārā klasifikācija

Klasificējot krūts vēzi ir svarīgi ņemt vērā ne tikai morfoloģiskās atšķirības, bet arī receptoru statusu šūnās, ko nosaka imūnhistoķīmiski, un gēnu ekspresiju molekulārā līmenī. Izmantojot tikai histoloģisko klasifikāciju, bieži gadās situācijas, ka pacientiem ar līdzīgām pazīmēm un to kombinācijām atšķiras klīniskie rezultāti, bet labāka gala iznākuma panākšanai nepieciešamas atšķirīgas ārstēšanas metodes (Schnitt 2010). Krūts vēža šūnām ir receptori uz šūnas virsmas, citoplazmā un kodolā, kurus izmanto imūnhistoķīmiskajā vēža klasifikācijā. Tie ir: estrogēna receptors (ER), progesterona receptors (PR) un cilvēka epidermālā augšanas faktora receptors (HER2) (Carels *et al.* 2016). Ar imūnhistoķīmijas palīdzību patoloģists nosaka šo receptoru statusu šūnās. Histoloģisko griezumam ar imūnhistoķīmijas palīdzību iekrāso pret attiecīgo receptoru, kuru pārbauda. Pēc tā, kāds daudzums no šūnām ir iekrāsojies audu paraugā, tiek piešķirti punkti (no viens līdz trīs), vai procentuāls novērtējums (Anonymus 2015c).

Estrogēna receptoru kodē *ESR1* gēns. Steroīdie hormoni un to receptori ir iesaistīti eikariotu gēnu ekspresijas regulēšanā un ietekmē šūnu proliferāciju un diferencēšanos (UniProt 2016). Estrogēns ir nepieciešams piena dziedzeru attīstībai un nobriešanai. Dziedzeros ir divu veidu estrogēna receptori: ER α un ER β . ER α ir detektēts epitēlija šūnās tāpat kā ER β , bet izteikts ER β signāls ir novērojams mioepitēliālajās šūnās (Speirs *et al.* 2002). Ja vēža šūnas ekspresē estrogēna receptorus, to augšana ir atkarīga no estrogēna. Lai ārstētu šo vēža apakštipu, tiek izmantoti antagonisti (piemēram, tamoksifēns), kas bloķē estrogēna efektu ER signālceļā (Carels *et al.* 2016).

Progesterons ir hormons, ko sintezē olnīcas. Progesterona iedarbību organismā nav iespējams nošķirt no estrogēna. Abi šie hormoni mijiedarbojoties, nodrošina krūts dziedzera attīstību gan agrīnā ontogēnēzē, pubertātē, grūtniecības laikā un laktācijā. Progesterons iedarbojas, saistoties ar augstu afinitāti pie progesterona receptora, kam ir divas izoformas (A un B). PR atrodas smadzenēs, kur tas kontrolē reproduktīvo uzvedību, kā arī krūtī un reproduktīvajos orgānos. Progesterons ir krūts dziedzera šūnu mitogēns. Tādēļ PR tāpat kā ER tiek izmantots terapijā, lai inhibētu audzēja attīstību (Lange and Yee 2014).

HER2 (ERBB2) jeb cilvēka epidermālā augšanas faktora receptors ir membrānas tirozīna kināze, un aktivizētā stāvoklī tas veicina šūnu proliferāciju un dzīvotspēju. *ERBB2* onkogēns atrodas 17. hromosomas garā pleca 12. reģionā (17q12). *ERBB2* gēna amplifikācija izraisa HER2 receptora pārekspresiju un veicina krūts audzēja attīstību. *ERBB2* ir amplificēts aptuveni 15-20% krūts vēža gadījumā. *ERBB2* gēna amplifikācija retāk ir notikusi klasiskās invazīvas lobulāras karcinomas gadījumā (10% gadījumu), nekā invazīvas duktālās karcinomas gadījumā. Visretāk HER2 ir sastopams tubulārajā karcinomā, zemāka tā produkcija ir sastopama iedzimtajā krūts vēzī, kas saistīta ar mutāciju *BRCA1* vai *BRCA2* gēnos. Bieži vien pozitīva HER2 produkcija tiek saistīta ar agresīvu slimību, pastiprinātu šūnu proliferāciju un ER un PR receptoru negatīvitāti. HER2 tiek producēts visās krūts epitēlijā šūnās. Tāpēc nosakot šī receptora statusu, ir nepieciešams noteikt intensitātes atšķirības (Krishnamurti and Silverman 2014)

Nosakot HER2, ER un PR statusu audos, izmantojot IHC, nākas saskarties ar problēmām, kas ietekmē signāla detekciju: fiksācijas veids un ilgums, antivielas tips (poliklonāla vai monoklonāla), antigēna atgūšanas intensitāte, pozitīvā signāla kontroles trūkums u.c. Lai korekti varētu konstatēt gēnu pārekspresiju, nepieciešams standartizēts protokols visiem paraugiem (Krishnamurti and Silverman 2014).

Lai paraugā noteiku aktīvi proliferējošās šūnas, paraugā iezīmē Ki-67 proteīnu. Interfāzes laikā antigēns atrodas tikai kodolā, bet mitozes laikā lielāka daļa proteīna atrodas uz hromosomu virsmas. Ki-67 proteīns ir atrodams šūnā visās šūna cikla aktīvajās fāzēs (G_1 , S, G_2 un mitozē), bet tā nav šūnās, kuras ir miera fāzē G_0 . Tādēļ tas ir īpaši piemērots marķieris, lai pētītu, vai kultūrā esošās šūnas aktīvi proliferē (Scholzen and Gerdes 2000).

Pēc molekulārās klasifikācijas krūts vēzi iedala trīs lielās grupās: luminālā, HER2 un bazālā (1.tabula).

Luminālais krūts vēzis ir saistīts ar hormonu receptoru ekspresiju, tas ir sastopams aptuveni 70% invazīvas karcinomas gadījumā. Luminālo apakštipu sīkāk iedala luminālā A un B. Tie atšķiras ar HER2 ekspresiju, kas raksturīga luminālam B (Schnitt 2010). Vismaz viens procents no luminālās karcinomas šūnām ekspresē estrogēna vai progesterona receptorus vai abus, izraisot estrogēn-atkarīgu augšanu. 20-30% no visiem krūts vēža pacientiem un 40-50% no pacientiem ar lumināla tipa krūts vēzi veidojas metastāzes (Ogba *et al.* 2014). Luminālā krūts vēža šūnām ir zema koloniju veidošanas aktivitāte un palielināta adhēzija. Pētot MCF7 šūnu līniju, kas pieder pie luminālā A tipa, tika noskaidrots, ka šūnām ir augsts e-kadherīna, zems CD44 ekspresijas līmenis un nav CD24 ekspresijas (Chekhun *et al.* 2013). Ārstēšanā visbiežāk izmanto hormonatkarīgo terapiju (Schnitt 2010).

1.tabula.

Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija molekulārajos krūts vēža apakštipos (Schnitt 2010).

Table 1.

Imunohistochemical marker expression in molecular subtypes of breast cancer (Schnitt 2010).

Molekulārais apakštips	Biomarķiera profils
Luminālais A	ER+ un/vai PR+, HER2-, zema Ki67 ekspresija (<14%)
Luminālais B	ER+ un/vai PR+, HER2+
	ER+ un/vai PR+, HER2-, augsta Ki67 ekspresija (>14%)
HER2	ER-, PR-, HER2+
Bazālais	ER-, PR-, HER2-, CK5/6 un/vai EGFR+

HER2 apakštipā ir *HER2* gēna pārekspresija un netiek ekspresēti ER un PR. Sastopams aptuveni 15% gadījumu (Schnitt 2010).

Bazālais apakštips ekspresē bazālos citokeratīnus. Tas ir ER, PR, HER2 negatīvs. Bazālā tipa krūts vēzim ir sliktākās prognozes. To nevar ārstēt ar hormonu terapiju, tā kā šūnām nav estrogēna un progesterona receptoru (1. tabula). Pacientēm ar bazāla tipa krūts vēzi ir augstāks metastāžu veidošanās risks (Montgomery *et al.* 2012). Bazāla tipa krūts vēzim ir mazdiferencētas karcinomas, vairums ir duktālās karcinomas (Chen and Russo 2010). Šūnām ir zemas adhezīvo kontaktu spējas, ko izraisa novirze no e-kadherīna ekspresijas normas, ievērojams CD44 ekspresijas pieaugums un zems CD24 ekspresijas līmenis (Chekhun *et al.* 2013).

1.3. Šūnu kultivēšana

1.3.1. Zīdītāju šūnu kultūras

Šūnu audzēšanai kultūrā nepieciešami atbilstoši augšanas apstākļi: barotnes sastāvs, osmotiskais spiediens, pH, temperatūra, gāzu sastāvs. Zīdītāju šūnu kultivēšanas barotnes parasti satur aminoskābes, monosaharīdus, vitamīnus, neorganiskos savienojumus un mikroelementus. Barotnē ir komponenti, kas palīdz uzturēt osmotisko spiedienu (aptuveni 260-320 mOsm/kg), jo šūnām ir jāatrodas izotoniskā vidē. Šūnu augšanai ir svarīgs arī pH, kas šūnu kultūrās parasti ir no 7,2 līdz 7,4 (Yang and Xiong 2012). Šo līmeni uztur atmosfēras

CO₂, kas šūnu kultūru inkubatorā ir 5%, kā arī hidrogēnkarbonāta (HCO₃⁻) joni, kas atrodas barotnē parasti NaHCO₃ sāļu veidā (Freshney 2012). Ja šūnas bieži tiek pakļautas vides maiņai (t.i., ilgāku laiku izņemtas no inkubatora), barotnei var pievienot HEPES (Yang and Xiong 2012).

Inkubatorā ir jākontrolē arī skābekļa koncentrācija, lai tā nebūtu pārāk augsta, jo izšķīdušais O₂ var būt toksisks un veidot brīvos radikāļus. Šūnas šiem apstākļiem adaptējas ar antioksidatīvajiem mehānismiem, izmantojot, piemēram, glutationu. Barotnei var pievienot nātrija selenītu, kas samazina skābekļa toksiskumu šūnās. Inkubatorā tāpat kā gaisā ir 21% brīvā skābekļa. Ir inkubatori, kuros šo līmeni var regulēt. Dažas šūnu kultūras labāk aug hipoksijas apstākļos, bet citām proliferāciju veicina paaugstināts skābekļa daudzums (95% šūnām, kas izdalītas no embrija). Optimālā temperatūra, kādā tiek kultivētas šūnas, ir atkarīga no organisma, no kura tās ir iegūtas. Zīdītāju šūnu kultūrām tie ir 37 °C (Freshney 2012).

Šūnu kultivēšanai izmanto dažādas barotnes. Tās ir dabiskās vai sintētiskās. Dabiskā barotne ir dzīvnieku ķermeņa vai audu šķidrums: plazma, serums, limfa u.c. Šādas barotnes satur daudz uzturvielu un hormonus. Laboratorijās lielākoties izmanto sintētiskās barotnes, kurām pievieno serumu. Serumu iegūst no asins plazmas, atdalot no tā proteīnus, polipeptīdus, lipīdus, ogļhidrātus, augšanas faktorus, hormonus, neorganiskos jonus u.c. Visas šīs sastāvdaļas vai nu pastiprina, vai nomāc šūnu augšanu. Serumu lielākoties iegūst no liellopiem. Liellopa seruma veidi ir: jaundzimuša teļa serums (NCF - *newborn calf serum*), liellopa teļa serums (BCS - *bovine calf serum*) kā arī liellopa embrija serums (FBS - *fetal bovine serum*). FBS iegūst no liellopa augļa dzemdībās, NCF izdala no teļa 24 stundas (h) pēc dzemdībām, bet liellopa teļa serumu - 10-30 dienas pēc dzemdībām. FBS ir vispiemērotākais šūnu kultūrām, jo to vismazāk ir ietekmējuši ārējās vides apstākļi, tajā ir vismazāk izveidojušās antivielas un citi komponenti (Yang and Xiong 2012). Lai gan serums ir visbiežāk izmantotā piedeva barotnei, tam ir daudzi trūkumi.

- daudzas sastāvdaļas nelielos daudzumos, kurām nav zināma ietekme uz šūnām,
- atšķirības starp dažādām sērijām, sastāvs rada dažādus augšanas apstākļus, ir grūti atkārtot eksperimentu, lai būtu nodrošināt vienādi apstākļi,
- serums var būt piesārņots ar vīrusiem, tomēr tie var arī neietekmēt šūnas,
- lielas izmaksas;
- var saturēt augšanas inhibitorus (Freshney 2012).

Sintētiskā barotne ir ar noteiktām vielu koncentrācijām tās sastāvā. Šobrīd ir pieejams plašs šo barotņu piedāvājums. Pamatā visām barotnēm ir četras vielu grupas: neorganiskie sāļi (CaCl₂, KCl, MgSO₄, NaCl, NaHCO₃, Na₂H₂PO₄), aminoskābes, vitamīni (piemēram, riboflavīns, piridoksīns, tiamīns u.c.) un ogļhidrāti (glikoze). Indikators fenolsarkanais tiek

pievienots barotnei, lai varētu noteikt pH līmeni (Yang and Xiong 2012) Tas ir sarkans pie pH 7,4, oranžs pie pH 7,0 un dzeltens pie pH 6,5, bet videi paliekot bāziskai, maina krāsu no rozā līdz violetai (Freshney 2012). Biežāk izmantotās barotnes ir MEM, DMEM, RPMI1640, M199, F12 u.c. Šīs barotnes savstarpēji atšķiras ar sastāvu un dažādu elementu koncentrāciju tajās (Yang and Xiong 2012).

Tiek izmantotas divējādas barotnes - tādas, kurām pievieno serumu un serumu nesaturošas barotnes. Parasti izmanto barotnes, kurām pievieno 10% seruma, bet šo pievienoto daudzumu var samazināt, vai neizmanto vispār, aizvietojo to ar citām piedevām. Serumu nesaturošām barotnēm ir vairākas priekšrocības – vienmērīgu augšanas apstākļu nodrošināšana, vieglāka eksperimenta atkārtojamība, precīza šūnu funkciju novērtēšana un labāka kontrole pār fizioloģiskajiem procesiem šūnās. Tomēr arī šai audzēšanas metodei ir savi trūkumi - tās ir jutīgākas pret straujām pH, temperatūras, osmolaritātes izmaiņām un mehānisku spēku un enzīmu ietekmi (Yang and Xiong 2012). Šūnu proliferācija mēdz būt lēnāka. Serumu nesaturošām barotnēm pievieno hormonus, augšanas faktorus, enzīmu inhibitorus, proteīnus, un mikroelementus, ar kuru palīdzību heterogēnā šūnu paraugā var proliferēt tās šūnas, kam konkrētais barotnes sastāvs ir augšanu veicinošs. Bet šūnas, kurām nepieciešami citas piedevas dzīvotspējas un augšanas nodrošināšanai var iet bojā. Tādēļ katram eksperimentam ir rūpīgi jāpiemeklē barotnes sastāvs, ar kura palīdzību tiks veicināta tieši pētāmo šūnu proliferācija (Freshney 2012).

Lai novērstu mikroorganismu kontaminācijas risku, barotnei klāt var pievienot antibiotikas. Visbiežāk izmantotās ir penicilīns-streptomicīns (Pen/Strep), B amfotericīns, gentamicīns, ampicilīns u.c. (Yang and Xiong 2012). Tomēr šūnas mēdz būt jutīgas pret antibiotikām barotnē, kā arī pastāv rezistentu mikroorganismu attīstības risks (Freshney 2012).

1.3.2. Audzēja šūnu kultivēšana

Izdalot šūnu paraugu no audzēja (primārā kultūra), bieži vien nākas saskarties ar problēmu, ka izdalītajā paraugā ir dažādi šūnu veidi, tajā skaitā arī stromas šūnas (fibroblasti un asinsvadu endotēlijs), kas mēdz pāraugt epitēlija šūnas. Tāpēc tiek veiktas izmaiņas šūnu barotnes sastāvā, kas palielina iespējas proliferēt epitēlija šūnām un nomāc stromas šūnu augšanu un dalīšanos. Vislielākā iespēja kontrolēt šūnu augšanu ir, izmantojot serumu nesaturošu barotni. Serumam var būt fibroblastu dalīšanos veicinošs un epitēlija šūnu proliferāciju inhibējošs efekts. Ir iespējams kombinēt serumu saturošu barotni, ar augšanas

hormoniem. Šādā veidā tiek vairāk kontrolētas šūnas kultūrā, to augšana nav atkarīga tikai no serumā esošajiem komponentiem (Freshney 2012).

Viena no galvenajām problēmām jebkura audzēja šūnu kultivēšanā ir tā, ka audzēja kultūrām raksturīga plaša daudzveidība gan starp dažādu pacientu paraugiem, gan viena parauga ietvaros. Bieži novēro, ka audzēja šūnas, kas aug *in vivo*, nespēj augt *in vitro*. Iespējams, audzēja šūnām nepieciešamas citas barības vielas nekā tās, kuras izmanto normālas šūnas. Iepriekš minētā atbrīvošanās no stromas šūnām var izrādīties nepareiza taktika. Stromas šūnas var veidot matricu epitēlija šūnām, saturēt uzturvielas un izdalīt signālus, kas nepieciešami audzēja šūnu izdzīvošanai. Izdalot šūnas no audzēja, tās tiek šķeltas gan mehāniski, gan enzimatiski, panākot pēc iespējas lielāku atšķaidījumu. Tas nodrošinātu lielāku pieejamo uzturvielu daudzumu vienai šūnai. Tomēr tas var izraisīt signālu komunikācijas traucējumus. Šūnas vairs neatrodas blīvi viena pie otras un daži autokrīnie signāli, kuri var iedarboties arī homokrīni (arī uz blakus esošajām šūnām), nerasniedz mērķa receptorus. Šūna nesaņem signālus, kas nepieciešami tās attīstībai. Jāņem vērā arī tas, ka audzēja šūnām un tām atbilstošo normālo šūnu augšanai neatbilst tie paši augšanas apstākļi. Normālās šūnas var sintezēt augšanas faktora supresorgēnus un novecošanas gēnus, kad audzēja šūnā šie gēni var būt neaktīvā stāvoklī vai mutēti. Tādēļ šūnu reakcija uz kultūrai pievienotajiem augšanas faktoriem var būt atšķirīga (Freshney 2012).

Augšanas faktori, kas nepieciešami vienām šūnām, var inhibēt citu šūnu augšanu. Pētījumā ar luminālajām krūts vēža šūnām konstatēja, ka visaugstākā proliferācija ir novērojama, izmantojot 5% seruma barotni ar piedevām: insulīnu, hidrokortizonu, holeras toksīnu, epidermālo augšanas faktoru un progesteronu (Ethier *et al.* 1993).

Insulīns ir hormons, kas veicina aminoskābju, glikozes un taukskābju nonākšanu šūnas iekšējā vidē un palīdz pārvērst glikozi un taukskābes par glikogēnu un triglicerīdiem. Insulīns ierosina uzņemt glikozi no asinīm, dažās šūnās tam piemīt augšanas faktoriem līdzīgas īpašības (Krūmiņa un Baumanis 2015). Insulīns veicina MCF7 šūnu augšanu, bet neietekmē MDA-MB-231 (Osborne *et al.* 1980).

Insulīns un estrogēns ir krūts epitēlija šūnu mitogēni. Iedarbojoties vienlaikus, tie ierosina G₁- fāzes šūnu ciklu. Estrogēns veicina mitogēnu aktivitāti, kas ir svarīga sieviešu reproduktīvās sistēmas attīstībā, kā arī tam ir viena no galvenajām lomām krūts vēža attīstībā. Tā darbības mehānisms saistīts ar estrogēna receptora aktivāciju vai potenciāli ar transkripciju nesaistītiem mehānismiem, izmantojot starpšūnu signālceļus. Estrogēns stimulē G₀ vai G₁ fāzē esošās šūnas, iesaistīties šūnas ciklā, izejot cauri G₁-S fāzei, tā nodrošinot šūnas dalīšanos (Mawson *et al.* 2005).

Glikokortikoīdam hidrokortizonam ir šūnu proliferāciju veicinoša ietekme, ja tas tiek pievienots kopā ar epidermālo augšanas faktoru (EGF). Šis hormons maina EGF saistīšanās spēju, palielinot receptoru daudzumu uz šūnas virsmas. Tomēr tā darbība ir atkarīga no pievienotās koncentrācijas. Eksperimentā ar HeLa šūnām, kurām ir dzemdes kakla vēža izcelsme, tika novērots, ka, pievienojot hidrokortizonu par daudz, tam ir augšanu inhibējoša iedarbība (Wu *et al.* 1981). Glikokortikoīdu ietekme uz šūnu attīstību bieži vien ir atkarīga no dažādiem eksperimenta apstākļiem: šūnu blīvuma, pasāžas, pacienta vecuma, citiem pievienotajiem faktoriem. Vairumā gadījumu tie neietekmē šūnu augšanu, bet kombinācijā ar EGF veicina šūnu proliferāciju. Pētījumā ar olnīcu vēzi tika novērots, ka hidrokortizons inhibē kolagēna sintēzi. Ja barotnei pievienoja tikai EGF, tas veicināja epiteliāli-mezenhimālo tranzīciju, bet šūnām, kurām tika pievienots gan hidrokortizons, gan EGF, bija daudz izteiktāka mezenhimālo šūnu morfoloģija (Salamanca *et al.* 2004).

Augšanas faktori ir signālmolekulas, kas veicina barības vielu uzņemšanu, ATF sintēzi, inhibē makromolekulu noārdīšanos, tādējādi veicinot šūnu augšanu (Krūmiņa un Baumanis 2015). EGF ir polipeptīds cilvēku un dzīvnieku asinīs un sekrētos, kas stimulē visu veidu epitēlija šūnu augšanu. EGF veicina MCF7 šūnu augšanu, bet neietekmē MDA-MB-231 (Osborne *et al.* 1980). Ja krūts epitēlija šūnām ir EGF receptori, tas nenozīmē, ka, pievienojot EGF, būs novērojama mitogēna atbildes reakcija. Pētījumā 1984. gadā noskaidroja, ka no četrām pētītajām šūnu līnijām tikai divām bija novērojama augstāka proliferācija augšanas faktora ietekmē (MCF-7 un T-47D). Šūnu līnijām MDA-MB-231 un ZR-75-1 izmaiņas netika novērotas, kaut gan MDA-MB-231 ekspresēja īpaši lielu daudzumu EGFR (Fitzpatrick *et al.* 1984).

Holēras toksīns (Ct) ir 84kDa liels proteīns, kas izdalīts no patogēna *Vibrio cholerae*. Tas sastāv no divām vienībām: A un B. Toksīna iedarbība ir saistīta ar cAMP (cikliskā adenozinā monofosfāta) koncentrācijas izmaiņām šūnā. Eksperimentā ar keratinocītiem šūnām tika pievienots Ct. Kamēr šūnas bija logaritmiskajā fāzē, Ct veicināja proliferāciju un koloniju veidošanos. Kad tika sasniegta konfluēnce, šis efekts zuda un kultūrā esošais DNS un proteīnu daudzums samazinājās (Okada *et al.* 1982). Ct ierosina morfoloģiskas izmaiņas olnīcu šūnās, padarot tās vairāk plakanas un palielinot šūnu adherenci (Rieber *et al.* 1975). Šis proteīns palielina augšanas ātrumu, blīvumu un iespējamo pasāžu skaitu krūts dziedzerā šūnās (Stampfer 1982).

Transferīnu izmanto kā barotnes piedevu, lai nodrošinātu pietiekamu dzelzs daudzumu šūnām kultūrā. Transferīnam ir ļoti augsta afinitāte pret dzelzs joniem, kas vidē nav pieejami brīvā formā, tāpēc tiem nav iespējas veidot brīvos radikāļus, kas, savukārt, var radīt oksidatīvo stresu. Transferīns, kas ir saistījies ar dzelzi, pievienojas transferīna receptoram uz

šūnas virsmas. Zemā pH dzelzs tiek atbrīvots un tiek iekļauts intracelulārajos proteīnos. Apo-transferīns (bez dzelzs) tiek nogādāts atpakaļ vidē (Sigma 2016a).

Vairogdziedzera hormons 3,3',5-trijodo-L-tironīns (T3) ir viens no diviem vairogdziedzera hormoniem. Sākotnēji tiek sintezēts tiroksīns (T4), no kura veidojas T3 (Bassett and Williams 2016). T3 stimulē glikogēna sintēzi (Betley *et al.* 1993). Vairogdziedzera hormoni regulē šūnu proliferāciju, diferenciaciju, bet var stimulēt arī apoptozi. Pētījumā ar MCF7 šūnām konstatēja, ka T3 pievienošana šai šūnu līnijai represēja SMP30 proteīna ekspresiju, kas ierosināja apoptozi šajās šūnās (Sar *et al.* 2011). Jau divas līdz trīs stundas pēc T3 pievienošanas barotnei šūnās var novērot palielinātu RNS polimerāzes aktivitāti, nukleozīdu transportu un glikozes patēriņu (Samuels and Tsai 1973). Vairogdziedzera hormoni regulē arī mitohondriju aktivitāti, kas ir saistīta ar glikozes izmantošanu (Senese *et al.* 2014).

1.4. Krūts vēža šūnu līnijas

Pētījumā tika izmantotas divas krūts vēža šūnu līnijas - MCF7 un MDA-MB-231. Abu līniju molekulāro marķieru statuss apkopots 2. tabulā.

2.tabula.

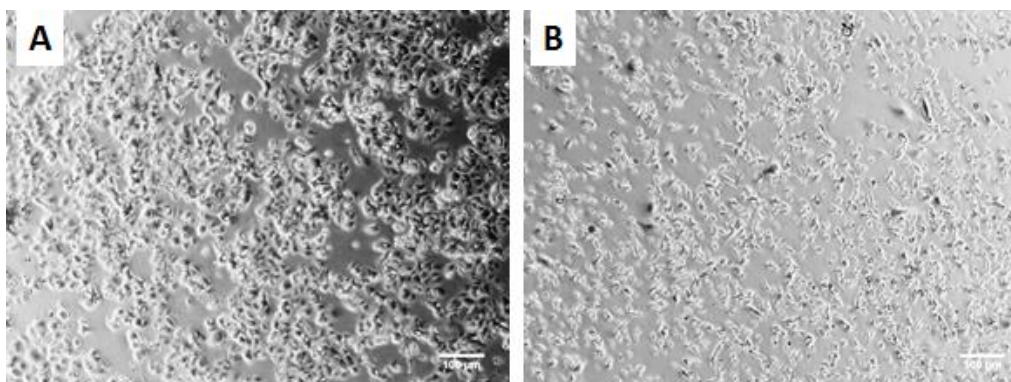
MCF7 un MDA-MB-231 šūnu līniju molekulāro marķieru ekspresijas salīdzinājums (Kao *et al.* 2009).

Table 2.

MCF7 and MDA-MB-231 cell line comparison of molecular markers (Kao *et al.* 2009).

Šūnu līnija	Vēža tips	Krūts vēža apakštips	ER	PR	HER2	EGFR	Ki67	EpCam
MCF7	Metastātiska adenokarcinoma	Lumināls	+	+	-	+	+	+
MDA-MB-231	Metastātiska adenokarcinoma	Bazāls	-	-	-	+	+	-/+

MCF7 ir lumināla tipa krūts vēža šūnu līnija (ATCC 2014b) (6. A attēls), savukārt MDA-MB-231 ir bazāla tipa krūts vēzis (ATCC 2014a) (6. B attēls).



6. attēls. Krūts vēža šūnu līniju morfoloģija. A – MCF7, B – MDA-MB-231.

Figure 6. Breast cancer cell line morphology. A – MCF7, B – MDA-MB-231.

Šūnu līnija MCF-7 ir iegūta no sievietes ar metastātisku krūts vēzi no izsvīduma pleirā. Paciente iepriekš tika ārstēta ar staru terapiju un hormonālajiem preparātiem (ATCC 2014b). Šūnas ekspresē ER, AR, PR, EGFR receptorus (Subik *et al.* 2010). Ir vairāki pētījumi, kas salīdzina no dažādiem avotiem iegūtu šūnu līniju atšķirības vai salīdzina vienā laboratorijā audzētu šūnu klonus. Krasas morfoloģiskas atšķirības netika novērotas. Vienīgā atšķirība bija MCF-7 šūnu līnija, kas ir no ražotāja ATCC. Šajā kultūrā ik pa laikam varēja novērot ļoti lielas daudzkodolainas šūnas ar diviem līdz četriem kodoliem. Citu ražotāju šūnu līnijās šūnām bija pārsvarā 1-3 kodoli. ATCC šūnu līnija atšķiras arī ar to, ka tās populācijas dubultošanās laiks (PDT) bija 14 stundām ilgāks (46 h) nekā pārējām šūnu līnijām (Osborne *et al.* 1987). Autori pēc kariotipu salīdzināšanas secināja, ka MCF7 no ATCC patiesībā ir šūnu līnija no cita indivīda.

MDA-MB-231 ir bazāla tipa krūts vēža šūnu līnija (6. B attēls) Šūnas ir PR, ER un HER2 negatīvas. Arī šo šūnu izcelsme ir metastātiska adenokarcinoma (Kao *et al.* 2009). Tāpat kā MCF7 šūnas, tās iegūtas no pleiras izsvīduma un tām ir epiteliāla/mezenhimāla morfoloģija (ATCC 2014b).

1.5. Biomarkieri

Progesterona receptori ir atrodami dažādās audu grupās, ieskaitot smadzenes, kur progesterons regulē reproduktīvo uzvedību, kā arī krūtīs un reproduktīvajos orgānos. Progesterons ir iekšējā sekrēcijas dziedzeru hormons, ko izstrādā olnīcas. Tas ir svarīgs normālā krūts attīstībā pubertātes laikā un brīdī, kad organisms gatavojas laktācijai un barošanai ar krūti. Progesterona iedarbību nevar nošķirt no citiem hormoniem, tas mijiedarbojas arī ar augšanas faktoriem, prolaktīnu, kā arī estrogēnu. PR lielākoties atrodas šūnas kodolā (Lange and Yee 2014).

Estrogēna receptors (ER) atrodas muskuļu šķiedrās (gludajos muskuļos) un sieviešu dzimumorgānos. Proteīns lokalizēts kodolā (ProteinAtlas 2016). Estrogēns ir iesaistīts daudzās fizioloģiskās funkcijās krūts dziedzerā, olnīcu šūnu proliferācijā un diferenciācijā, kā arī tas nodrošina mehānismu, ar kura palīdzību tiek regulēta hormonatkarīgo audzēju attīstība (Lahsaee *et al.* 2016). Ne mioepiteliālās, ne stromas šūnas nespēj ekspresēt gēnus, kas kodē ER un PR veidošanos, bet šo gēnu ekspresiju var veikt luminālās epitēlija šūnas (Clarke *et al.* 2004).

EpCam ir epitēlija šūnu adhēzijas molekula. Tā iesaistās arī šūnu signālceļos, migrācijā, proliferācijā un diferenciācijā. Krūtī EpCam tiek pastāvīgi ekspresēts zemā līmenī luminālajās epitēlija šūnās, bet tā ekspresija pieaug šūnās, kurās ir p53 gēna darbības traucējumi. Pārekspressija ir saistīta ar agresīvāku audzēju (Ohashi *et al.* 2016). EpCam ir iesaistīts epitēlijam raksturīgajos Ca_2^+ neatkarīgajos starpšūnu kontaktos. *In vivo* EpCam ekspresija ir saistīta ar pastiprinātu epitēlija proliferāciju un negatīvi ietekmē šūnu diferenciāciju. EpCam ir pastiprināti ekspresēts dažāda veida karcinomās, ieskaitot prostatas, aknu, plaušu, galvas un krūts karcinomas EpCam ekspresijas intensitāte ādā un krūts dziedzerī ir neliela, salīdzinot ar citiem ķermeņa orgāniem, kā tievā zarna, resnā zarna, žultspūslis (Went *et al.* 2004).

MDA-MB-231 šūnu līnijā ir tik neliela EpCam ekspresija, ka to varētu uzskatīt par negatīvu. MDA-MB-231 nedaudz ekspresē HER2. EpCam un HER2 ekspresēto receptora piesaistes vietu daudzuma attiecība ir 1:8. MCF7 šūnu līnijā, savukārt ir augsta EpCam ekspresija, bet HER2 tiek ekspresēts deviņas reizes mazāk (Prang *et al.* 2005). Tā kā HDFa ir ādas stromālās šūnas, EpCam nevajadzētu tikt producētam šajā šūnu līnijā.

P53 ir audzēja supresorgēns, kas kontrolē šūnas ciklu un izraisa apoptozi, kad šūnas bojājumi ir pārāk lieli. Normālās šūnās p53 tiek veidots pāris minūšu laikā, tas ļoti ātri arī tiek noārdīts. Mutāciju rezultātā šis proteīns tiek stabilizēts, un tas uzkrājas šūnas kodolā. Šī gēna mutācijas sastopamas 18-25% krūts vēža karcinomās. Tas tiek saistīts ar agresīvu audzēju (Yang *et al.* 2013)

CD44 ir transmembrānas glikoproteīns, kas veicina šūnu migrāciju normālās šūnās. Tas ir pastiprināti ekspresēts vēža šūnās. CD44 saistīts ar proteīniem, kas ir atbildīgi par ekstracelulārajām izmaiņām, svarīgi šūnu adhēzijas, proliferācijas, augšanas, dzīvotspējas, kustīguma, migrācijas, angiogēnēzes un diferenciacijas regulēšanā. Tas mijiedarbojas ar kolagēnu, laminīnu, fibronektīnu. Iesaistīts signālceļos, kas saistīti ar audzēja veidošanos mijiedarbojoties ar tādiem receptoriem kā, piemēram, tirozīna kināze (Jaggupilli and Elkord 2012).

CD24 ir neliels šūnas virsmas proteīns. Tas iesaistīts visos starpšūnu, kā arī šūnas-ārpussūnas matriksa kontaktos. Saistīts ar šūnu adhēziju un metastāzēm audzējā. CD24 ir

mazāk sastopams priekšteču šūnās, tas vairāk tiek ekspresēts šūnās, kas jau ir diferencējušas (Sheridan *et al.* 2006).

Lai gan CD24 un CD44 tiek izmantoti kā cilmes šūnu marķieri, tiem ir lielas ekspresijas atšķirības starp dažādām šūnu līnijām, pat šūnās ar vienādu vēža apakštīpu (Jaggupilli and Elkord 2012). MDA-MB-231 ir CD44⁺ un CD24⁻, bet MCF ir CD44⁻ un CD24⁺ (Sheridan *et al.* 2006).

Starpfilamentu ekspresija krūts dziedzerī tiek saistīta ar augļa krūts attīstību, pēcpubertitātes šūnu diferenciaciju un audzēja veidošanos. Vimentīns (VIM) ir starpfilaments, kas tiek sintezēts visos ķermeņa audos. Šis proteīns tiek saistīts ar epiteliāli-mezenhimālo tranzīciju. Vairumā gadījumu VIM⁺ karcinomas ir trešajā stadijā, ER⁻, ar metastāžu invāzijas potenciālu un rezistentas pret ķīmijterapiju (Korsching *et al.* 2005).

Kalretikulīns ir čaperons, kas atrodas endoplazmatiskā tīkla lumenā. Atrodams gandrīz visos ķermeņa audos. Ir maz informācijas par šī proteīna saistību ar krūts vēzi (Lwin *et al.* 2015). Tas ir abās šajā darbā izmantotajās krūts vēža šūnu līnijās, bet lielāka gēna ekspresija ir MDA-MB-231, bazālajai šūnu līnijai, kura ir vairāk agresīvs audzēja raksturs nekā MCF7. Pastiprināta kalretikulīna produkcija korelē ar audzēja lielumu, un attīstības stadiju (Shao *et al.* 2015).

Tubulīns šūnās veido mikrocaurulītes. Mikrocaurulītes ir nepieciešamas iekššūnas transportā, mitozē, baktērijās tās nepieciešamas kustību nodrošināšanai. Tubulīns ir heterodimērs, ko veido α un β tubulīns (Krūmiņa un Baumanis 2015). Šo proteīnu bieži izmanto kā kontroles marķieri šūnās, lai varētu iezīmēt šūnas robežas un noteikt citu proteīnu lokalizāciju.

Visiem zīdītājiem šūnās ir trīs veidu filamentu: aktīna mikrofilamenti, starpfilamenti un mikrocaurulītes. Citokeratīni ir proteīni starpfilamentu sastāvā, tie ir ekspresēti epitēlija šūnās. Luminālajās epitēlija šūnās tiek ekspresēts citokeratīns 19 (KRT19), bet mioepitēlija šūnās un bazālajās šūnās ir citokeratīns 5 un 14 (KRT5 un KRT14). Normālās piena dziedzera šūnās neliels šūnu daudzums ir KRT5/6 pozitīvas, tām ir cilmes šūnu īpašības (Abd El-Rehim *et al.* 2004). MCF7 un MDA-MB-231 šūnas producē KRT19, bet ne KRT5/6. MCF7 šūnās nenotiek KRT14 produkcija.

1.6. Barotnes sastāvs

Eksperimentā tika izmantoti četri dažādi barotņu sastāvi. Šīm barotnēm variēja pamatbarotne, kā arī FBS daudzums un piedevas. Visas šūnas sākotnēji tika audzētas DMEM

F12 barotnē, kurai pievienots 10% FBS. Eksperimenta gaitā tika izmantotas barotnes: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM F12), Medium 199 (M199) un Ham's F-12 Nutrient Mixture (F12). Katrai no šīm barotnēm ir savs specifiskais sastāvs, kas var atšķirties arī starp dažādiem ražotājiem (1. pielikums). Freshney norāda, ka F12 un M199 ir barotņu sastāvā ir liels daudzums dažādu aminoskābju, papildus vitamīni, metabolīti (piemēram, lipīdi) un minerāli. Barības vielu koncentrācijas ir vismazākās F12 barotnē un visaugstākās DMEM. Tādejādi 1980. gadā Barnes un Sato apvienoja ar piedevām bagātu F12 un barības vielām koncentrēto DMEM, izveidojot barotni DMEM F12 (1:1) (Freshney 2012).

Izmantotajām barotnēm vislīdzīgākais ir aminoskābju sastāvs (1. pielikums). Dažādu ražotāju DMEM F12 aminoskābju sastāvs neatšķiras. No šīm barotnēm vislielākā aminoskābju koncentrācija ir barotnē M199 un DMEM F12. M199 barotnē ir ievērojami augstāka koncentrācija L-asparģīnskābei (atšķirība 2-4 reizes), L-glutamīnskābei (4-9 reizes), Glicīnam (2-6 reizes). Asparģīnskābe ir nozīmīga citu aminoskābju sintēzē un dažu nukleotīdu sintēzē (NCIT 2016). Visi olbaltumvielu monomēri ir vismaz divas reizes mazāk barotnē F12. Tomēr F12 ir vienīgā no visām barotnēm, kurai sastāvā ir L-alanil L-glutamīns, kā arī tai ir lielākā L-cisteīna un L-arginīna koncentrācija. L-arginīns ir universāla aminoskābe, ko bieži izmanto barotnēs, jo tas veicina šūnu proliferāciju (Greene *et al.* 2013).

Visdažādākais vitamīnu sastāvs ir barotnei M199. Tai papildus ir seši vitamīni, kuru nav nevienā no citām barotnēm. Salīdzinājumā ar citām barotnēm, tiem ir mazākā koncentrācija. Vitamīni, kas ir sastāvā visām barotnēm ir: holīna hlorīds, folijskābe, niacinamīds, piridoksīna hidrohlorīds, riboflavīns, tiamīna hidrohlorīds. Tomēr M199 atšķiras ar to, ka tai vienīgajai nav B12 vitamīna, kas ir svarīgs elements šūnu metabolismā. Tā trūkums var izraisīt lēnāku proliferāciju un straujāku diferenciaciju (Battaglia-Hsu *et al.* 2009). B12 vitamīns var būt FBS sastāvā, bet, kā jau serumā, tā daudzums var variēt (Freshney 2012). M199 ir pievienots pirdoksāla hidrohlorīds. Gan pirdoksīnam, gan pirdoksālam ir līdzīgas funkcijas šūnu kultūrā, bet pirdoksīns ir stabils savienojums vidē, var darboties kā antioksidants. Pirdoksāls neenzimātiski degradē aminoskābes, vidē nav stabils, šo īpašību bieži vien izmanto audu inženierijā (Sigma 2016b). Menadions (K_3) tāpat kā visi vitamīni ir katalizators šūnas metabolisma procesos, tomēr menadiona pievienošana barotnei var izraisīt oksidatīvo stresu šūnās. Aspartāta un menadiona savienojums izraisa leukēmijas šūnu nāvi šūnu kultūrā (Beck *et al.* 2011). Viskonzentrētākais vitamīnu daudzums ir DMEM F12, bet visvairāk folijskābes ir F12. Folijskābe nodrošina oglekļa monomēru pārvietošanu, kas nepieciešams šūnu augšanai, diferenciacijai un izdzīvošanai (Sigma 2016c).

DMEM F12 neorganisko sāļu sastāvs nedaudz atšķiras Gibco un Sigma piedāvātajām barotnēm. Gibco izmanto bezūdens magnija hlorīdu, savukārt, Sigma piedāvā $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. Izrēķinot Mg jonu koncentrāciju, pievienotas magnija daudzums būtiski neatšķiras (2.pielikums). Nātrija hlorīda Sigma barotnē ir par 0,5 mg/ml vairāk. M199 netiek pievienoti mikroelementi – Cu un Zn. Šie elementi ir četru neorganiskie sāļu sastāvā, kas ir visās pārējās barotnēs: vara sulfāts, dzelzs sulfāts, bezūdens Na_2HPO_4 un cinka sulfāts. Dzelzs sulfāts nepieciešams šūnu elpošanai (Sigma 2016d), vara sulfāts palīdz veidot starpšūnu kontaktus, palielina šūnu stiepes spēku (Makris *et al.* 2013), cinks stabilizē šūnu membrānas, dažiem enzīmiem cinks darbojas kā katjons, cinka pirkstu sastāvā piedalās RNS sintēzes regulācijā (Sigma 2016d). Dzelzs nitrīts un bezūdens nātrija sulfāts, savukārt, netiek pievienoti tikai F12. Visvairāk nātrija hidroģēnkarbonātu, kas ir buferis pH kontrolei, pievieno M199, un tā pievienotais daudzums atšķiras gandrīz divas reizes. Ievērojami vairāk šai barotnei tiek pievienots arī kālija hlorīds. F12 ir augstākais nātrija hlorīda saturs.

Aplūkojot atsevišķu jonu daudzumu barotnēs, starp Gibco un Sigmas piedāvāto DMEM F12 nav novērojamas būtiskas atšķirības. Visvairāk Ca ir M199, vismazāk F12. Varš vispār netiek pievienots M199, bet F12 barotnē tas ir vairāk nekā DMEM F12. Visvairāk dzelzs ir F12 sastāvā, bet pārējās barotnēs daudzums ir līdzīgs. M199 visvairāk tiek pievienots Magnijs, Kālijs, Nātrijs, tās sastāvā nav cinka. Cinka daudzums ir ievērojami lielāks F12, salīdzinot ar tā daudzumu DMEM F12.

No pārējām piedevām M199 satur lielāko daudzveidību- 12 atšķirīgas piedevas, kas nav citu barotņu sastāvā: adenīnsulfāts, adenoīntrifosfāts (ATP), adenoīnmonofosfāts (AMP), holesterīns, dezoksiriboze, glutations, guanīna hidrohlorīds, timīns, uracils un ksantīns, riboze un TWEEN 80. Tween 80 izmanto kā emulsijas stabilizētāju vai disperģējošu aģentu (NCBI 2016). Holesterīns ir svarīgs lipīds, kas veicina šūnu proliferāciju, šūnas, īpaši vēža šūnas, bez šīs piedevas neaug. Parasti holesterīns ir seruma sastāvā (Haeffner *et al.* 1984). Ir arī piecas piedevas, kuru nav tikai M199: linolskābe, putrescīna hidrohlorīds, timidīns un nātrija piruvāts. Citu barotņu piedevu sastāvs ir atšķirīgs arī starp dažādu ražotāju DMEM F12. Glikoze ir vairāk par 1 mg/ml Gibco barotnē, Sigma pievieno DL-tioktīnskābi. Gibco savās barotnēs izmanto hipoksantīnu ar nātriju, kurš to ražotajam DMEM F12 ir nedaudz vairāk, bet fenolsarkano bez nātrija.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1. Šūnu līnijas

Atsauces šūnu līnijas:

- MDA-MB-231 trīskārši negatīva krūts vēža šūnu līnija *;
- MCF7 lumināla A tipa krūts vēža šūnu līnija *;
- HDFa cilvēka dermālie fibroblasti **

* šūnu līnijas iegūtas no BMC Vēža izpētes grupas laboratorijas ar vadītājas Dr. A.Linē atļauju.

** šūnu līnija iegūta no PSKUS Šūnu Transplantācijas centra ar vadītāja Ē.Jakobsona atļauju.

2.1.2. Reaģenti

3. tabula.

Šūnu kultivēšanas barotnes, piedevas un reaģenti.

Table 3.

Cell cultivation media and supplements.

Nosaukums	Ražotājs	Ražotājvalsts
Dulbeko modificētā Īgla vide ar barotnes piedevu F-12 attiecībā 1:1 (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium Ham's F-12 (1:1)</i>) (DMEM F-12)	Sigma-Aldrich	Vācija
Dulbeko modificētā Īgla vide ar barotnes piedevu F-12 attiecībā 1:1 (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium Ham's F-12 (1:1)</i>) (DMEM F-12)	GIBCO	ASV
Vide 199 (<i>Medium 199</i>) (M199)	Sigma-Aldrich	Vācija
F12	GIBCO	ASV
Teļa fetālais serums (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	Sigma-Aldrich	Vācija
L-glutamīns	Life technologies	ASV
Penicilīns-Streptomicīns (Pen/Strep)	Lonza	ASV
Dulbeko fosfāta buferēts fizioloģiskais šķīdums (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>) (DPBS)	Sigma- Aldrich	Vācija
Hidrokortizons (HC)	Sigma- Aldrich	Vācija
Epidermālais augšanas faktors (EGF)	Sigma-Aldrich	Vācija
17β estradiols (E2)	Cayman Chemical	ASV
Apo-transferīns	AppliChem	Vācija
Holeras toksīns	Sigma-Aldrich	Vācija
Insulīns	Sigma-Aldrich	Vācija
Trijodtironīns	Sigma-Aldrich	Vācija
HEPES (<i>Hepes cell culture grade</i>)	AppliChem	Vācija
Paraformaldehīds (PFA)	Sigma-Aldrich	Vācija
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Vācija
0,25 % Tripsīna-EDTA šķīdums	Sigma-Aldrich	Vācija
Tripānzilais	Sigma-Aldrich	Vācija
Kazas serums (<i>Normal Goat serum</i>)	Abcam	Lielbritānija
Fluorescentais montēšanas šķīdums ar DAPI (<i>Fluoroshield Mounting Medium With DAPI</i>)	Abcam	Lielbritānija

4.tabula.

Antivielas, to izmantotās koncentrācijas.

Table 4.

Antibodies and used concentrations.

Antiviela	Kataloga Nr. Izcelsme (rb-trusis, ms-pele)	Atšķaidījums	Sākuma koncentrācija	Darba koncentrācija
CD24	ab134375 ms	1/200	1mg/ml	5 µg/ml
CD44	701406 rb	1/400	0,5 mg/ml	1,25µg/ml
PGR	ab2764 ms	1/200	1mg/ml	5 µg/ml
ER	ab32063 rb	1/800	2,649mg/ml	3,31 µg/ml
MKI67	ab15580 rb	1/500	1mg/ml	2µg/ml
TP53	ab26 ms	1/200	1 mg/ml	5µg/ml
MUC1	ab15481 rb	1/400	0,2 mg/ml	0,5µg/ml
EpCam	ab 20160 ms	1/400	1 mg/ml	2,5 µg/ml
KRT14	ab181595 rb	1/800	1,996 mg/ml	2,495 µg/ml
KRT5/6	ab17133 ms	1/50	N	N
KRT19	ab52625 rb	1/323	1mg/ml	2,5 µg/ml
VIM	ab8978 ms	1/400	1mg/ml	2 µg/ml
TUBA4A	ab80779 ms	1/800	1 mg/ml	1,25 µg/ml

2.1.3. Laboratorijas iekārtas

5. tabula.

Laboratorijas iekārtas.

Table 5.

Laboratory equipment.

Nosaukums	Ražotājs	Ražotājvalsts
Laminārs (AV-100)	Telstar	Spānija
CO ₂ inkubators (New Brunswick)	Eppendorf	ASV
Neibauera hemocitometrs (Bright line)	Hausser-Scientific	ASV
Ledusskapis	Liebherr	Vācija
Ultrazemas temperatūras saldētava (-70 °C)	Dairei	Dānija
Centrifūga (5810R)	Eppendorf	ASV
Mikrocentrifūga Velocity 15µ	Dynamica	Lielbritānija
Mikroskops (DFC450)	Leica	ASV

2.1.4. Laboratorijas materiāli

6. tabula.

Piederumi darbam ar šūnu kultūrām.

Table 6.

Laboratory tools.

Nosaukums	Ražotājs	Ražotājvalsts
Audu un šūnu kultivēšanas flakoni (T75 un T 25) (cell +)	Sarstedt	Vācija
6-lauciņu šūnu kultivēšanas plates (cell +)	Sarstedt	Vācija
96-lauciņu šūnu kultivēšanas plates (standart)	Sarstedt	Vācija
Pipešu uzgaļi	Sarstedt	Vācija
Vienreizlietojamās seroloģiskās pipetes (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt	Vācija
Seroloģisko pipešu pipetēšanas palīgs	Thermo- Scientific	ASV
Automātiskās pipetes (0,2 – 2 µl; 2 – 20 µl; 20 – 200 µl; 200 – 1000 µl)	Eppendorf	Vācija
Daudzkanālu pipete (20 – 100 µl; 20-300µl)	Eppendorf	Vācija
Centrifugēšanas stobriņi (15, 50 ml)	Sarstedt	Vācija
Mikrocentrifugēšanas stobriņi (1,5 ml)	Sarstedt	Vācija
Saldēšanas stobriņi (1,6 ml)	Sarstedt	Vācija
Saldēšanas trauks	Sigma-Aldrich	ASV
Statīvs stobriņiem (15ml un 50ml)	Sarstedt	Vācija
Statīvs mikrocentrifugēšanas stobriņiem	Sarstedt	Vācija
Rezervuārs daudzkanālu pipetei	Cole Parmer	ASV

2.1.5. Darba šķīdumi

- Tripsīna aktivitātes inhibēšanas šķīdums: 20% FBS/DPBS. 50 ml šķīdumam: 10 ml FBS, 40 ml PBS.
- Permeabilizācijas šķīdums: 0,1% Triton-x100, 1xDPBS. 50ml šķīdumam: 50 µl Triton-x100, 49,95 ml 1xDPBS
- Bloķēšanas šķīdums: 4% NGS/DPBS. 50 ml šķīdumam: 2ml NGS, 48ml DPBS
- DAPI fluorescentās iezīmes šķīdums (1/30): 4450µl šķīduma: 148 µl DAPI, 4320 µl DPBS)
- Paraugu iezīmi fiksējošais šķīdums (*mounting solution*): 78% glicerīns. 100 ml šķīdumam: 78g glicerīna, līdz 100 ml atzīmei pievieno dH2O.

2.1.6. Barotnes

6.tabula.

A10 barotnes sastāvs.

Table 6.

Components of media A10.

Barotnes sastāvdaļa	Procentuālais daudzums barotnē	Pievienotais daudzums, ml
DMEM F12		44,5
FBS (<i>Fetal bovine serum</i>)	10%	5
Pen/Strep (Penicilīns- Streptomicīns)	1%	0,5

7.tabula.

A5 barotnes sastāvs.

Table 7.

Components of media A5.

Barotnes sastāvdaļa	Procentuālais daudzums barotnē	Pievienotais daudzums, ml
DMEM F12		41,567
FBS (<i>Fetal bovine serum</i>)	5%	2,25
Pen/Strep (Penicilīns- Streptomicīns)	1%	0,45
HEPES	1%	0,45
HC (hidrokortizons)	0,1%	0,045
EGF (epidermālais augšanas faktors)	0,1%	0,045
Ct (holeras toksīns)	0,1%	0,045
E2 (17β estradiols)	0,1%	0,045
T (transferīns)	0,1%	0,045
I (insulīns)	0,05%	0,023
Se (selenīts)	0,044 %	0,020
T3 (trijodtironīns)	0,033%	0,015

8.tabula.

B5 barotnes sastāvs.

Table 8.

Components of media B5.

Barotnes sastāvdaļa	Procentuālais daudzums barotnē	Pievienotais daudzums, ml
M199		20,78
F12		20,78
FBS (<i>Fetal bovine serum</i>)	5%	2,25
Pen/Strep (Penicilīns- Streptomicīns)	1%	0,45
HEPES	1%	0,45
HC (hidrokortizons)	0,1%	0,045
EGF (epidermālais augšanas faktors)	0,1%	0,045
Ct (holeras toksīns)	0,1%	0,045
E2 (17β estradiols)	0,1%	0,045
T (transferīns)	0,1%	0,045
I (insulīns)	0,05%	0,023
Se (selenīts)	0,044 %	0,020
T3 (trijodtironīns)	0,033%	0,015

9.tabula.

D5 barotnes sastāvs.

Table 9.

Components of media D5.

Barotnes sastāvdaļa	Procentuālais daudzums barotnē	Pievienotais daudzums, ml
DMEM F12		21
F12		21
FBS (<i>Fetal bovine serum</i>)	5%	2,25
Pen/Strep (Penicilīns- Streptomicīns)	1%	0,45
HC (hidrokortizons)	0,1%	0,045
EGF (epidermālais augšanas faktors)	0,1%	0,045
Ct (holeras toksīns)	0,1%	0,045
E2 (17β estradiols)	0,1%	0,045
T (transferīns)	0,1%	0,045
I (insulīns)	0,05%	0,023
Se (selenīts)	0,044 %	0,020
T3 (trijodtironīns)	0,033%	0,015

2.2. Metodes

2.2.1. Šūnu kultivēšana

2.2.1.1. Šūnu atsaldēšana

Visas trīs darbam nepieciešamās šūnu līnijas sākotnēji bija sasaldētas. Lai atsaldētu šūnas, jārikojas ātri, jo saldēšanas barotnē ir DMSO, kas ir toksisks šūnām. Vispirms sagatavo visu nepieciešamo atsaldēšanai. Iestata ūdens termostata temperatūru uz 37 °C, pagatavo un sasilda barotni, kurā tiks kultivētas šūnas. Izņem šūnas no saldētavas un kriostobriņu ieliek ūdens termostatā, lai tā korķītis nesaskaras ar ūdeni, kas ir potenciāls kontaminācijas risks. Gaida aptuveni vienu minūti, ik pa laikam paskatoties, vai stobriņa saturs ir izkusis. Kad ir

palicis neliels ledus gabaliņš, sildīšanu ūdens termostatā pārtrauc. Pirms ievietošanas laminārā kriostobriņu apsmidzina ar 70% etanolu, lai izvairītos no kontaminācijas. Ar 2 ml pipeti pārvieto kriostobriņa saturu uz 15 ml stobriņu. Ar 2 ml pipeti lēni, pa pilienam, nepārtraukti maisot, pievieno siltu barotni, lai šūnām samazinātu osmotisko šoku. Ar 10 ml pipeti pievieno barotni līdz 8 ml atzīmei, jo tas ir tilpums, kurā krioprotektants vairs neietekmē šūnas. Ar vēl vienu ml barotnes izskalo kriostobriņu. Šūnu suspensiju centrifugē 150 apgr./min 8 min. Pēc tam ar 10 ml pipeti, lēnām nosūc supernatānu. Šūnu nogulsnes resuspendē 1 ml barotnes. Atkarībā no tā, kādā blīvumā tika saldētas šūnas, tās izsēj vai nu uz T25 vai T75 audu kultivēšanas flakonā. Pēc atsaldēšanas šūnas aug uz pusi mazākā barotnes daudzumā (attiecīgi 3,5 un 7,5 ml), ik pēc divām dienām pievienojot pa 2 ml barotnes, līdz tiek sasniegts kultivēšanai nepieciešamais tilpums (7 ml un 15 ml).

2.2.1.2. Šūnu pārsēšana

Šūnas tiek kultivētas inkubatorā ar 5% CO₂ koncentrāciju. Pēc atsaldēšanas šūnas kultivē līdz T75 audu kultūras flakonā ir sasniegta 80% konfluence. No audu kultūru flakona atsūc barotni, skalo šūnu monoslāni ar 1x DPBS un pievieno 2 ml 0,25% tripsīna. Ievieto flakonu inkubatorā uz aptuveni 3-5 min. Mikroskopiski pārbauda, vai šūnas ir atdalījušās no flakona virsmas. Apstādina tripsīna darbību, pievienojot 2 ml 20%FBS/DPBS. Šūnu suspensiju pārvieto uz 15 ml stobriņu. Flakonu skalo 1-2 reizes ar 5-10 ml DPBS. 15ml stobriņu ar šūnu suspensiju centrifugē 150 apgr./min 8 min. Supernatantu nosūc ar 10 ml pipeti. Novērtē nogulšņu daudzumu un attiecīgi piemērotākajā tilpumā resuspendē šūnas (visbiežāk 1 ml).

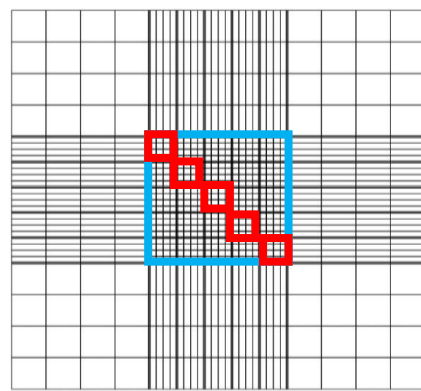
2.2.1.3. Šūnu skaitīšana

Lai noskaidrotu šūnu skaitu un dzīvotspēju sajauc 7 µl tripānzilā un 7 µl šūnu suspensijas un uznes 10 µl maisījuma uz hemocitometra. Hemocitometru novieto uz mikroskopa priekšmetgaldiņa un skaita šūnas 10x palielinājumā. Šūnas skaita vidējā kvadrāta piecos mazajos laukumos, ja šūnu skaits ir liels. Ja šūnu ir mazāk, skaita visos 25 mazajos laukumos (7. attēls).

Ja šūnas skaita piecos laukumos, to skaitu dala ar 5 un reizina ar 25. Tā kā suspensija tika atšķaidīta uz pusi ar tripānzilo, skaitu reizina ar 2, un reizina ar 10 000, lai iegūtu šūnu skaitu 1ml. Šie aprēķini formulā:

$$\text{Šūnu skaits/ml} = \frac{\text{Šūnu skaits 5 laukumos}}{5} * 25 * 2 * 10000$$

Šūnas, kas ir iekrāsojušās zilas, nav dzīvotspējīgas, tām ir bojāta membrāna. Nosakot šūnu skaitu, ņem vērā tikai dzīvās šūnas. Lai izrēķinātu šūnu dzīvotspēju, dala dzīvo šūnu skaitu ar visu šūnu skaitu un izsaka procentuāli.



7.attēls. Hemocitometrs. Ar zilo norādīts centrālais kvadrāts, ar sarkanu atzīmēti pieci mazie laukumi (http://www.microbehunter.com/wp/wpcontent/uploads/2010/06/counting_chamber7.jpg).

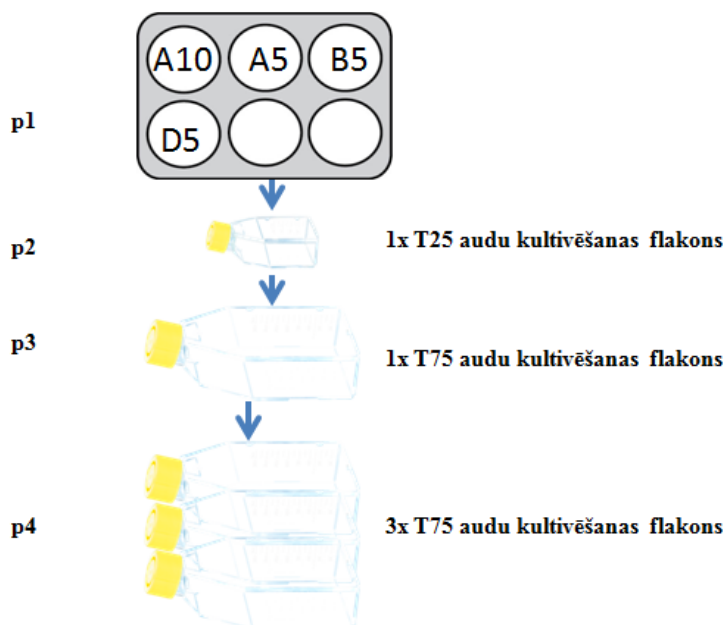
Figure 7. Hemocytometer. Central square in blue, five small squares in red (http://www.microbehunter.com/wp/wpcontent/uploads/2010/06/counting_chamber7.jpg).

2.2.1.4. Izsēšana dažādās barotnēs

Pēc šūnu skaitīšanas, izrēķina barotnes daudzumu, kurā ir nepieciešamais šūnu daudzums, 3500 šūnas/cm^2 . Uz viena 6-lauciņu plates lauciņa tas ir 31 000 šūnu. Lai rezultāti būtu precīzāki, resuspendētās šūnas atšķaida lielākā tilpumā, atkarībā no šūnu skaita, pievienojot klāt pāris ml barotnes. Veic nepieciešamos aprēķinus un ar 1ml automātisko pipeti paņem no suspensijas četras reizes pa 31 000 šūnu, katru savā 15 ml stobriņā. Šūnu atlikumu sasaldē. Šiem četriem stobriņiem pievieno klāt DPBS, lai tilpums stobriņā būtu vismaz 3 ml. Centrifugē 150 apgr./min 8min. Atsūc supernatantu ar 5 ml seroloģisko pipeti. Nogulsnēm pievieno 1 ml attiecīgās barotnes, kurā tiks audzētas šūnas. Pievieno 6-lauciņu plates četriem lauciņiem 1 ml barotnes. Resuspendētās šūnas uzsēj uz plates. Skalo stobriņus vienu reizi ar 1 ml barotni, kuru arī pievieno attiecīgajam lauciņam. Liek plati inkubatorā.

2.2.1.5. Šūnu kultivēšana, novērošana un pārsēšana

Jau iepriekš minēts, ka šūnas tika audzētas četrās dažādās barotnēs četras pasāžas pēc shēmas (8. attēls). Sākumā šūnas izsēj uz viena 6-lauciņu plates lauciņa, pārsēj uz T25 audu kultivēšanas flakona, pēc tam uz viena T75 audu kultivēšanas flakona un ceturtajā pasāžā šūnas sadala uz trīs T75 audu kultivēšanas flakoniem.



8. attēls. Šūnu kultivēšanas shēma četriem pārsējumiem.

Figure 8. Cell cultivation scheme for four passages.

Uzsētās šūnas tiek monitorētas mikroskopiski ik pēc divām dienām, iegūstot fotogrāfijas un datus par sasniegto konfluenci, šūnu daudzumu, kas atrodas suspensijā, un procentuālo granulāro/ vakuolizēto šūnu daudzumu. Šūnas tiek barotas katru otro dienu, mainot pusi no barotnes. Kad šūnas sasniedz 80% konfluenci, tās tirpsinizē, skaita, kā aprakstīts iepriekš. Izsēj pa 3500 šūnu/cm² (10. tabula).

10.tabula.

Šūnu skaits dažādos kultivēšanas traukos.

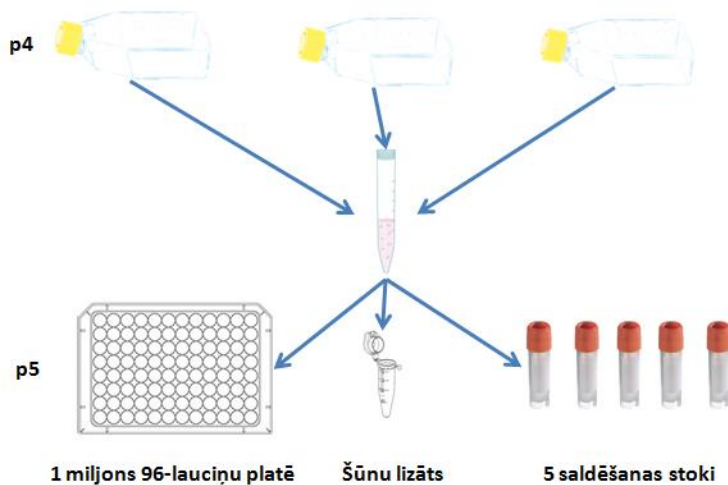
Table 10.

The amount of cells in different cell culture dishes.

Kultivēšanas trauks	Šūnu daudzums
6-lauciņu plate	31'000
T25 audu kultivēšanas flakons	87'500
T75 audu kultivēšanas flakons	262'500

Pēc tam, kad visos trīs audu T75 audu kultivēšanas flakonos ir sasniegta 80% konfluences, šūnas tripsinizē, skaita, apvieno kopā. Viens miljons šūnu tiek izsēts uz vienas

96-lauciņu šūnu kultūru plates (1000 šūnu/lauciņā), viens miljons šūnu tiek lizēts RNS izdalīšanai un atlikums tiek sasaldēts (9. attēls).



9.attēls. Rīcība pēc pietiekamas konfluences sasniegšanas ceturtajā pārsējumā.

Figure 9. Action after achieving confluency in passage 4.

2.2.1.6.Šūnu saldēšana

Lai saglabātu šūnas tālākiem eksperimentiem, tās nepieciešams sasaldēt. Saldējot šūnas, tām jāpievieno krioprotektants DMSO, lai novērstu ledus kristālu veidošanos, kas var saplēt šūnas. Ražotājs iesaka saldēšanas blīvumu 1,5-3 miljoni šūnu 1 ml, DMSO koncentrācija 5%. Pārsvārā šūnas tiek saldētas pa 2 miljoniem vienā ml. Ja paredzēts sasaldēt piecos saldēšanas stobriņos pa vienam ml, pagatavo 2,5 ml 10% DMSO šķīduma un šūnu suspensiju ar nepieciešamo skaitu resuspendē 2,5 ml barotnes ar 20% FBS. Abus stobriņus 1h uzglāba pie +4 °C. Pa to laiku, marķē saldēšanas stobriņus un ievieto saldētavā pie -20 °C. Pēc stundas lēnām apvieno abus šķīdumus un iepilda pa vienam ml katrā saldēšanas stobriņā. Visus stobriņus ievieto saldēšanas traukā. Tajā esošais izopropanols nodrošina, ka šūnas sasalst vienmērīgi, aptuveni par 1 °C/min. Ievieto -70 °C saldētavā. Nākamajā dienā kriostobriņus var pārvietot uz kastīti, kas paredzēta sasaldēto šūnu uzglabāšanai.

2.2.2.7. Imūnfluorescence

Lai iegūtu rezultātus šajā eksperimentā, tika izmantota imūnfluorescentā iezīmēšana. Tā ir laboratorijas metode, ar kuras palīdzību var noteikt antigēnu vai specifisku proteīnu atrašanās vietu šūnās. Šai metodei ir vairāki posmi: šūnu fiksēšana, permeabilizācija, bloķēšana, primāro antivielu, sekundāro antivielu un atsaucē marķiera pievienošana.

Šūnas izsēj uz 96 lauciņu plates 10000 šūnu/lauciņā. Izmanto sterilu rezervuāru, kas paredzēts daudzkanālu pipetei. Katrā lauciņā iepilda 100 µl barotnes ar šūnu suspensiju. Plati liek inkubatorā. Ļauj šūnām pieķerties virsmai aptuveni 1-2 dienas. Mikroskopiski novēro. Ja blīvums ir pietiekams, šūnas fiksē.

Fiksēšana.

Fiksēšanai izmanto 4% PFA šķīdumu, kas atšķaidīts barotnē ar 10% FBS. Tas darbojas, radot starpmolekulāros tiltus starp brīvajām aminogrupām, veidojot savstarpēji saistītu antigēnu tīklu. Šūnas skalo vienreiz ar 100 µl DPBS. Ar daudzkanālu pipeti lēni uznes ledusaukstu fiksēšanas šķīdumu. Plati liek ledusskapī +4 °C uz 15 min. Skalo trīs reizes ar 100 µl DPBS katru reizi pa 10 min.

Permeabilizācija

Ir šūnu marķieri, kas neatrodas uz membrānas, bet gan šūnas organelās, tādēļ nepieciešams padarīt šūnas membrānu caurlaidīgāku, šūnas permeabilizējot. Izmanto 0,1% Triton X-100 šķīdumu, kas atšķaidīts DPBS. Permeabilizāciju veic trīs reizes pa 5 min, uz lauciņa pievienojot 50 µl permeabilizācijas šķīduma. Pēc tam šūnas skalo trīs reizes pa 10 min ar 100 µl DPBS.

Bloķēšana

Pirms imunoiezīmēšanas ir svarīgi novērst nespecifisku antivielu saistīšanos. Jāievēro, ka bloķēšanas šķīduma seruma izcelsme nedrīkst būt tāda pati kā primāro antivielu izcelsme. Vispiemērotākais ir serums, kurš iegūts no tās pašas sugas kā sekundārās antivielas. Šajā gadījumā izmanto 4% normālā kazas seruma (NGS)/ DPBS šķīdumu. Uz lauciņa nepieciešami 50 µl. Inkubē istabas temperatūrā 30 min.

Iezīmēšana ar primārajām antivielām

Eksperimentā tika izmantotas 16 antivielas. Katrai no tām iepriekš tika noteikta nepieciešamā darba koncentrācija. Izkārtojot antivielas uz plates, tika ņemts vērā, lai rezultātā no viena lauciņa varētu iegūt attēlu ar informāciju par trīs dažādiem antigēniem. Pirmajā iekrāsošanas daļā tika veikta paralēlā krāsošana, bloķēšanas šķīdumam pievienojot uzreiz divas primārās antivielas ar dažādu sugu izcelsmi (pele un trusis). Arī sekundārās antivielas tika pievienotas divas uzreiz, attiecīgi kazas sekundārā anti-pele un kazas sekundārā anti-trusis. Otrajā iezīmēšanas daļā tika izmantots sekvenciālās iekrāsošanas protokols. Uz tiem pašiem lauciņiem tika pievienota viena primārā anti-pele un tad sekundārā anti-pele, kuras fluorofors atšķīrās no iepriekš izmantotajiem. Eksperiments tika dalīts četrās daļās, katrā no daļām tika iekrāsotas visas 11 plates ar trīs līdz sešām antivielām vienā piegājienā (11. tabula).

Iekrāsošana ar antivielām sadalījums pa datumiem.

Table 11.

Immunostaining layout by dates.

Nr.p.k.	Datums	Primārās antivielas mērķproteīns	Sekundārajai antivielai pievienotais fluorofors
1.	12.05.16-13.05.16	CD44, CD24, PGR, ER, TUBA4A	Cy3, Cy5, FITC
2.	16.05.16-17.05.16	TP53, MKI67, MUC1, EpCam, TUBA4A	Cy3, Cy5, FITC
3.	19.05.16-20.05.16	KRT14, KRT19, KRT5/6, VIM, TUBA4A	Cy3, Cy5, FITC

Lai iekrāsotu ar primārajām antivielām, tās ir nepieciešams atšķaidīt. Paralēlajā iekrāsošanā ir iespējams izmantot vairākas primārās antivielas vienlaicīgi, ar nosacījumu, ka tām ir atšķirīga sugu izcelsme. Šajā gadījumā tika izmantotas primārās antivielas no truša un peles. Izrēķina katras antivielas koncentrāciju uz nepieciešamo tilpumu un atšķaida tās vienā bloķēšanas šķīdumā. Katrā lauciņā tika pievienoti 50 µl primāro antivielu maisījuma. Inkubē +4 °C pa nakti. Katrai antivielai tika veikti trīs atkārtojumi, viens lauciņš atstāts kontrolei. Tam tika pievienotas tikai sekundārās antivielas, lai pārbaudītu, vai nav notikusi nespecifiska saistīšanās (12. tabula).

Sākot darboties ar sekundārajām antivielām, jāstrādā tumsā, lai nezaudētu signāla intensitāti. Sekundārajām antivielām jau ir pievienots fluorofors, kas radīs fluorescento signālu, ko var detektēt mikroskops. Sekundārās antivielas atšķaida. Paralēlās krāsošanas protokolā bloķēšanas šķīdumam pievieno divas antivielas, kas saistās ar dažādām sugām (pele, trusis) un tām ir jābūt ar atšķirīgiem fluoroforiem, lai varētu detektēt atšķirīgu viļņu signālus. Jāņem vērā, ka sekundārās antivielas ir sugu specifiskas, tāpēc tām ir jābūt tādai pašai izcelsmei kā primārajām antivielām. Uz lauciņa pievieno 50 µl, šoreiz šķīdumu pievieno arī kontroles lauciņā. Inkubē 1,5 h istabas temperatūrā, skalo trīs reizes ar 100 µl DPBS.

12. tabula.
 Antivielu izkārtojums uz 96-lauciņu plates.
 Table 12.
 Antibody layout on the 96-well plate.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B				K	KRT14 KRT 5/6	KRT14 KRT 5/6	KRT14 KRT 5/6					
C				K	KRT19 VIM	KRT19 VIM	KRT19 VIM					
D				K	TP53 MKI67	TP53 MKI67	TP53 MKI67					
E				K	MUC1 EpCam	MUC1 EpCam	MUC1 EpCam					
F				K	CD24 CD44	CD24 CD44	CD24 CD44					
G				K	PGR ER	PGR ER	PGR ER					
H												

Turpina darboties pēc sekvenciālas iekrāsošanas protokola. Tiem pašiem lauciņiem, kuri jau tika iekrāsoti pēc paralēlās krāsošanas protokola, pievieno bloķēšanas šķīdumu. Inkubē 30 min. Pievieno atšķaidītu primāro antivielu kontroles marķieri, kas iekrāsos tubulīnu. Nepievieno kontrolei. Uz lauciņa pievieno 50 µl atšķaidītās antivielas šķīduma. Inkubē 1 h istabas temperatūrā. Skalo trīs reizes ar 100 µl DPBS. Pievieno 50 µl atšķaidītas sekundārās antivielas, kuras fluorofors atšķiras no iepriekš izmantotajiem. Inkubē 1,5 h istabas temperatūrā. Skalo trīs reizes ar 100 µl DPBS.

Šūnas iezīmē ar fluorescento krāsvielu DAPI, kas saistās ar nukleīnskābēm šūnu kodolos. DAPI atšķaida attiecībā 1:30. Uz lauciņa pievieno 50 µl. Inkubē 5 min. Lauciņu skalo trīs reizes ar 100 µl DPBS, katru reizi pa 10 min. Paraugu fiksē ar 78% glicerīna šķīdumu. Tas samazina parauga iztvaikošanu.

Pēc imūnfluorescentās iezīmēšanas attēlus ieguva, izmantojot augstas caurlaidspējas attēlieguves sistēmu *InCell Analyzer 2200*. Iegūtos attēlus analizēja lietotājprogrammā *InCell Developer*, bet datus apkopoja ar programmas *SPSS statistics* palīdzību.

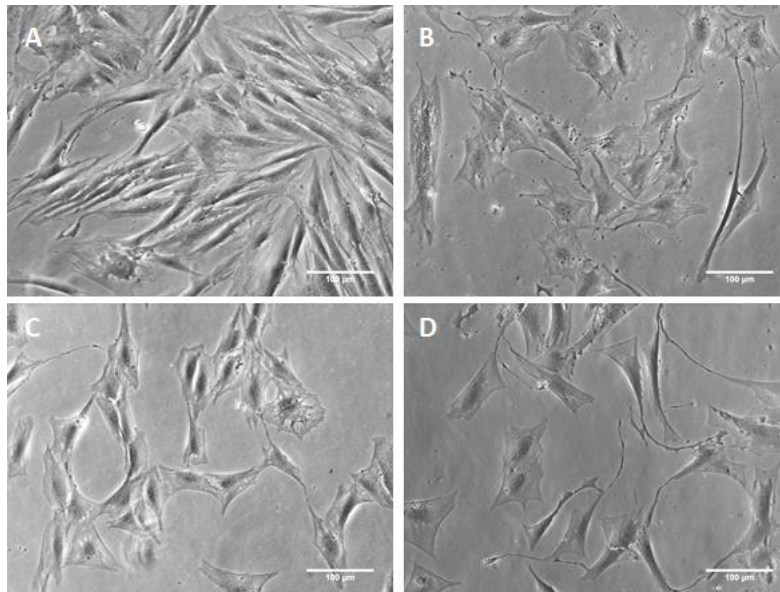
Attēlanalizē vispirms atrada šūnu kodolus ar DAPI iezīmes palīdzību, tad šūnas citoplazmas aprišu noteikšanai izmantoja imūnfluorescento iezīmi ar alfa tubulīnu (FITC kanāls). Turpmāko attēla segmentāciju veica ar *watershedding* algoritmu, atlasot tos FITC kanāla segmentus, kuros ir arī kodols un kas nesaskaras ar attēla malu. Proteīnu ekspresijas analizē noteica Cy3 un Cy5 kanāla pelēkā krāsojuma vidējo intensitāti iepriekš definētajos objektos (šūnās un šūnu kodolos).

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.2. Šūnu morfolģija

Lai izvēlētos piemērotāko barotni epitēlija šūnu audzēšanai, šajā darbā tika izveidotas trīs barotņu modifikācijas. Viena barotne tika saglabāta kontrolei, lai varētu salīdzināt rezultātus. Visām jaunizveidotajām barotnēm tika pievienoti vienādi hormoni un augšanas faktori, bet atšķīrās sintētiskā barotne. Barotnes piedevas tika izvēlētas, ņemot vērā (Ethier *et al.* 2000) publikācijas ieteikumus primāro šūnu kultivēšanai. Šūnas izdala autokrīnus un hemokrīnus, kas nepieciešami starpšūnu komunikācijā, dzīvības procesu nodrošināšanā un programmētas šūnu nāves izraisīšanā (Freshney 2012). Eksperimenta gaitā šūnām tika mainīta tikai puse barotnes katru otro dienu, lai saglabātu tās vielas un signālus, ko ir izveidojušas pašas šūnas. Audzējot šūnas barotnē, kurai tiek pievienoti hormoni, pirms barotnes nomaiņas ir svarīgi to svaigi pagatavot. Daudzi hormoni un augšanas faktori pēc pievienošanas barotnei dažu dienu laikā zaudē savas īpašības (Mather and Roberts 1998).

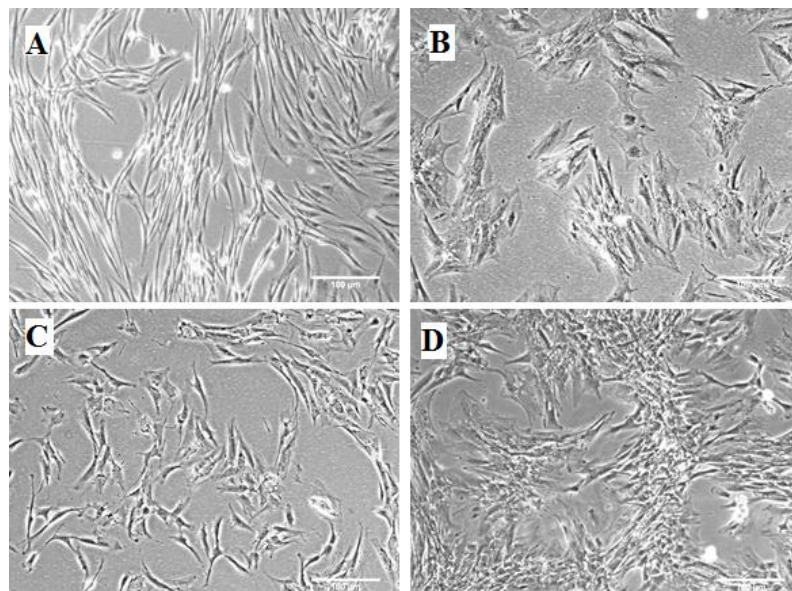
Lai salīdzinātu izmaiņas šūnās, kultivējot tās atšķīrīgās barotnēs, ik pēc divām dienām tika veikti mikroskopiski novērojumi un iegūti attēli, kas reprezentē šūnu kultūras. Izteiktas atšķīrības šūnu morfolģijā tika novērotas HDFa šūnu līnijā. Šūnas jau astotajā dienā pēc uzsēšanas izmainīja fenotipu (10. attēls). A10 barotnē šūnas ir vārpstveida, iegarenas, ar smailiem citoplazmas pagarinājumiem. A5 barotnē šūnām nav izteiktas robežas, tās ir robotas, neregulāras formas. Atsevišķas šūnas ir šauras, adatveida. B5 barotnē šūnām ir epiteliāls raksturs, tās aug cieši viena pie otras, veidojot bruģim līdzīgu struktūru, tāpat redzami smaili citoplazmas pagarinājumi, kas gan nav tik izteikti kā barotnē D5. Šajā barotnē šūnas ir heterogēnas, ir grupas, kas ir saglabājušas fibroblastiem raksturīgo vārpstveida formu, ir mezenhimāla un epiteliāla rakstura šūnas. Iegareno formas zudumu varēja izraisīt barotnei pievienotais HC un EGF, kas veicina mezenhimālas morfolģijas veidošanos (Salamanca *et al.* 2004). M199 sastāvu veido tādas komponentes, kas veicina šūnu diferenciaciju (folijskābe, B12 vitamīna trūkums).



10.attēls. HDFa šūnu morfoloģija astotajā dienā pēc uzsēšanas. A- šūnas A10 barotnē; B- šūnas A5 barotnē; C- šūnas B5 barotnē; D- šūnas D5 barotnē.

Figure 10. Morphology of HDFa eight days after seeding. A- cells in A10 medium; B- cells in A5 medium; C- cells in B5 medium; D- cells in D5 medium.

Arī 35 dienas pēc uzsēšanas A5 barotnē šūnas saglabā mezenhimālu raksturu, veido blīvas šūnu grupas, augot cieši viena pie otras (11. attēls). To forma ir vairāk regulāra. B5 barotnē vairumam šūnu ir vārpstveida struktūra līdzīgi kā A10 barotnē, bet tās ir īsākas.

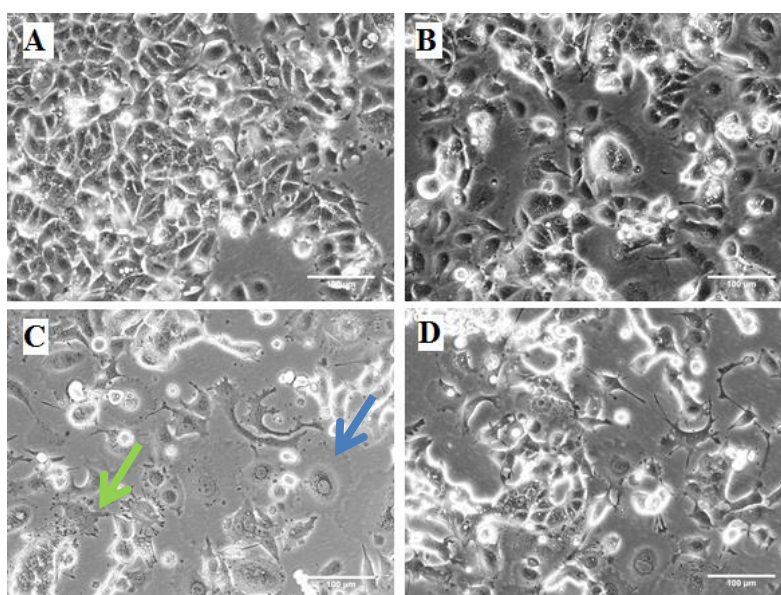


11. attēls. HDFa šūnu morfoloģija (35. diena pēc uzsēšanas. Trešais pārsējums). A- šūnas A10 barotnē; B- šūnas A5 barotnē; C- šūnas B5 barotnē; D- šūnas D5 barotnē.

Figure 11. Morphology of HDFa (35. day after seeding. Third passage). A- cells in A10 medium; B- cells in A5 medium; C- cells in B5 medium; D- cells in D5 medium.

Dati no HDFa fibroblastu šūnu līnijas D5 barotnē netika iegūti, jo pētījuma laikā tika konstatēta kontaminācija šajā šūnu līnijā. Saudzētās šūnas tika utilizētas, bet jaunatsaldētās nepaspēja saaugt, lai iegūtu turpmākos datus. Pēdējie dati, kas iegūti 35. dienā pēc uzsēšanas atšķirīgās barotnēs, attēlo, ka šī ir vienīgā šūnu kultūra, kura veido kompakts, noapaļotas šūnu grupas ar izteiktu kontaktinhibīcijas zudumu. Grupas centrā ir biezs šūnu slānis, kas samazinājās malās. Šūnu forma ir līdzīga A5 barotnē aprakstītajai (11. attēls).

Šūnu līnijā MCF7 fenotipa atšķirības varēja noteikt mazāk nekā HDFa. Visas šūnu populācijas ir ļoti heterogēnas (12. attēls). Tajās ir atrodamas šūnas ar vairākiem kodoliem un kodoliņiem.



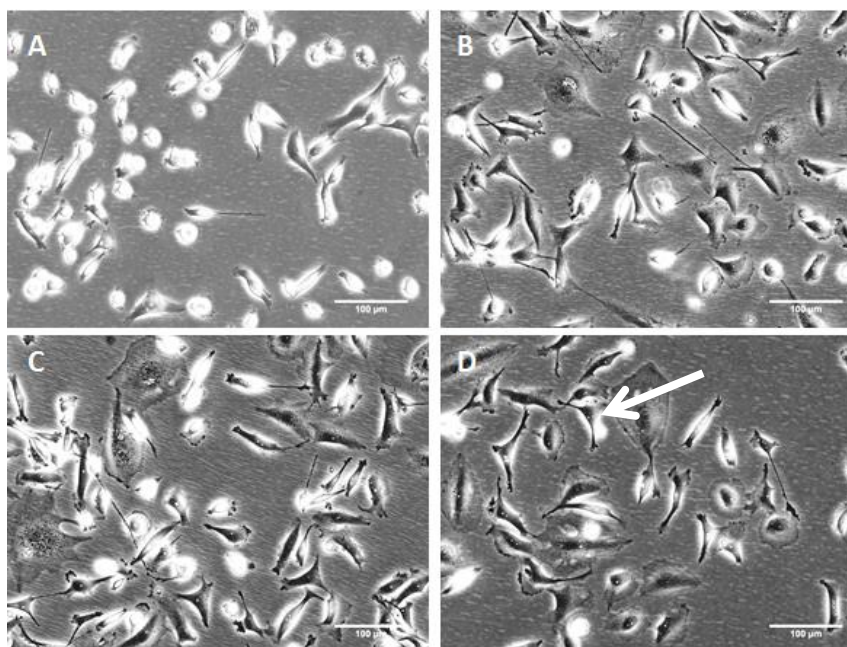
12. attēls. MCF7 šūnu morfoloģija (35. diena pēc uzsēšanas. Trešais pārsējums) A- šūnas A10 barotnē; B- šūnas A5 barotnē; C- šūnas B5 barotnē; D- šūnas D5 barotnē. Ar zilu bultu noapaļota šūna, ar zaļu bultu pumpurveida izaugumi.

Figure 12. Morphology of MCF7 (35. day after seeding. Third passage). A- cells in A10 medium; B- cells in A5 medium; C- cells in B5 medium; D- cells in D5 medium. Blue arrow- round-shaped cell, green arrow bud-like spines of cell.

Tomēr A10 barotnē bija vienīgā, kurā netika atrastas izteikti lielas, noapaļotas šūnas. Ir publikācija, kurā aprakstītas lielas daudzkodolainas šūnas. Tās ir raksturīgas ATCC ražotajai MCF7 šūnu līnijai (Osborne *et al.* 1987). Pārmērīgi lielas šūnas, kuru citoplazmai ir minimāli izaugumi, tika novērotas A5, B5 un D5 barotnēs. B5 barotnē noapaļotās šūnas tika atrastas visbiežāk, bet tās ir mazākas (12.C attēls). A5 barotnē šūnas izmainījās minimāli. B5 barotnei biežāk ir raksturīgas starainas šūnas ar neregulāriem, pumpurotiem izaugumiem (12. C attēls).

D5 barotnei, līdzīgi kā HDFa, šūnas ir ar smailiem, gariem izaugumiem. Lielākā konfluēnce ir barotnē A10. Kā epitēlija šūnas tās veido bruģim līdzīgu struktūru, augot blīvi viena pie otras. Citur netika novēroti tik cieši starpšūnu kontakti.

MDA-MB-231 šūnu līnijai tika novērotas vismazākās izmaiņas atšķirīgu barotņu ietekmē. Iespējams, tas saistīts ar to, ka tām jau ir mezenhimāla/epitēliāla morfoloģija (ATCC 2014a). A10 barotnē saglabājās šai šūnu līnijai raksturīgās nelielās vārpstveida šūnas (13.attēls). To centrālā daļa ir platāka un ieapaļa. Šūnas neveido blīvas grupas, bet tās mēdz pārklāt citu šūnu izaugumus. Arī šai kultūrai barotnēs, kurām bija piedevas, varēja novērot apaļas, ievērojami lielākas šūnas. Iespējams, ka holeras toksīns, līdzīgi kā olnīcu šūnās, padara šūnas plakanākas un palielina adherenci (Rieber *et al.* 1975). Bieži sastopamas starveida šūnas ar trīs izaugumiem.



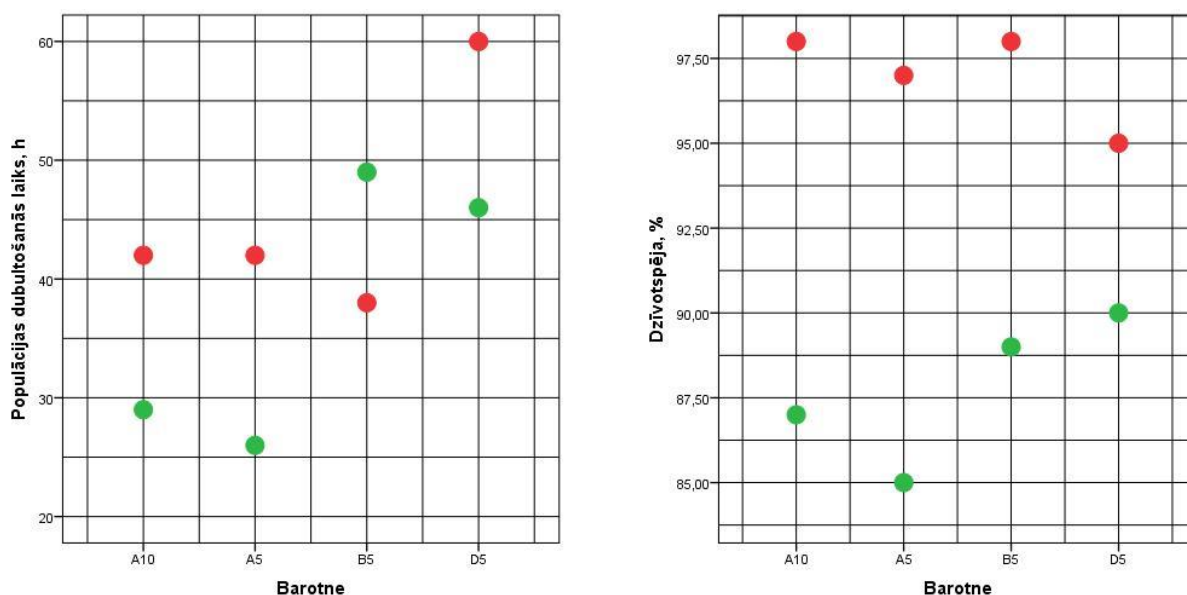
13.attēls. MDA-MB-231 šūnu morfoloģija (35. diena pēc uzsēšanas. Trešais pārsējums). A- šūnas A10 barotnē; B- šūnas A5 barotnē; C- šūnas B5 barotnē; D- šūnas D5 barotnē. Bulta norāda uz starveida šūnu ar trīs izaugumiem.

Figure 13. Morphology of MDA-MB-231 (35. day after seeding. Third passage). A- cells in A10 medium; B- cells in A5 medium; C- cells in B5 medium; D- cells in D5 medium. Arrow points stellate cells with three spines.

3.2. Populācijas dubultošanās laiks un šūnu dzīvotspēja

Svarīgi rādītāji, raksturojot šūnu kultūras, ir populācijas dubultošanās laiks (PDT) un šūnu dzīvotspēja. PDT tika noteikts, izmantojot mājas lapu <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

Krūts vēža šūnu līniju populācijas dubultošanās laiki un dzīvotspēja dažādās barotnēs apkopoti 14. attēlā.



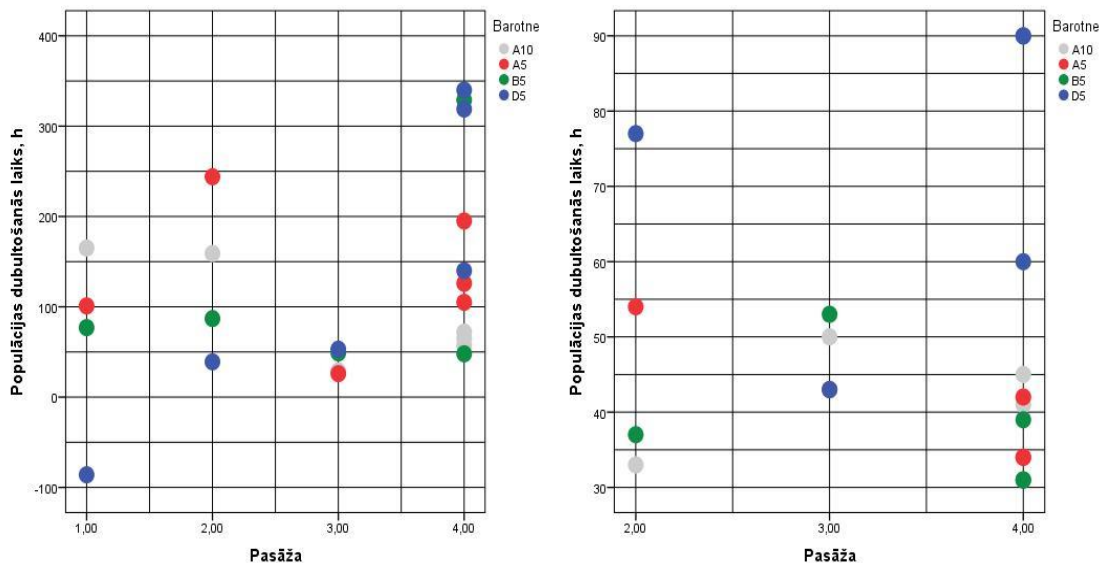
14.attēls. PDT un dzīvotspēja krūts vēža šūnu līnijās atkarībā no barotnes. Ar sarkanu MDA-MB-231, ar zaļu- MCF7.

Figure 14. PDT and viability of breast cancer cell lines grown in different types of media. In red MDA-MB-231, in green MCF7.

MCF7 šūnas vidēji dubultojas reizi 29 stundās A10 barotnē. A5 barotnē MCF7 šūnas aug ātrāk (PDT ap 26 h), savukār B5 un D5 barotnēs šūnu PDT palielinās (48 h un 46 h). MDA-MB-231 šūnu visīsākais PDT ir B5 barotnē. A10 un A5 barotnēs PDT ir gandrīz identisks (42,5 h), savukārt D5 barotnē šo šūnu PDT ir vislielākais (60 h).

MDA-MB-231 šūnām dzīvotspēja visās barotnēs bija labāka nekā MCF-7. Abās šūnu līnijās barotņu A10, A5 un B5 ietekme bija līdzīga. Tikai D5 barotnē MCF7 šūnu dzīvotspēja pieauga (līdz 90%), bet MDA-MB-231 samazinājās (līdz 95%). Procentuāli vismazākā dzīvotspēja ir MCF7 šūnām A5 barotnē (tikai 85%), bet visaugstākā tā ir MDA-MB-231 šūnām barotnēs A10 un B5, kur sasniedz gandrīz 100%.

Salīdzinot PDT izmaiņas katrā šūnu līnijā, MCF7 šūnām būtiskas atšķirības starp pārsējumiem netiek novērotas, bet MDA-MB-231 PDT samazinās, pieaugot pasāžai. MCF7 otrajā un trešajā pasāžā visātrāk dalījās D5 barotnē (40-50h), bet ceturtajā pasāžā visātrāk dalījās A10 un B5 barotnē esošās šūnas (PDT 50h). Pirmajā pasāžā D5 barotnē šūnu skaits nedubultojās, tā kā PDT ir negatīvs. Gandrīz nemainīgs PDT saglabājās B5 barotnē (vidēji 70h), bet A10 barotnē, tas samazinājās (15.attēls).



15.attēls. PDT krūts vēža šūnu līnijās atkarībā no barotnes. Pa kreisi MCF7; pa labi MDA-MB-231.

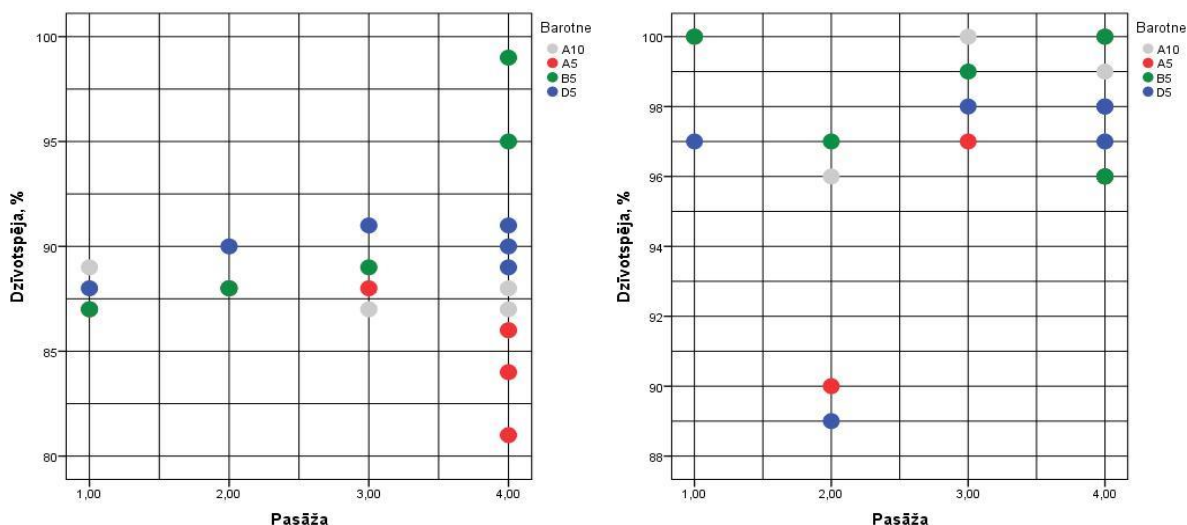
Figure 15. PDT of breast cancer cell lines grown in different types of media. On left MCF7; on right MDA-MB-231

MDA-MB-231 pirmajā pasāžā bija PDT bija daudz lielāks nekā citās pasāžās, tāpēc salīdzinājumam izmanto lielākas pasāžas. B5 un A10 barotnēs šūnu skaits dubultojās aptuveni reizi 35h, PDT saglabājās līdzīgs pirmajā un trešajā pasāžā. D5 barotnē šūnu PDT pārsniedz 75h pirmajā un trešajā pasāžā, bet otrajā pārsējumā samazinās līdz 43h. A5 barotnē augošās šūnas pēc katras pārsēšanas dalījās ātrāk (15.attēls).

MCF7 šūnu dzīvotspēja B5 un D5 barotnēs pakāpeniski pieaug, palielinoties pasāžai. Vislielākā dzīvotspēja šūnām ir ceturtajā pasāžā B5 barotnē, kur tā ir tuvu 100%. Barotnes A5 un A10 dzīvotspēja ir mazāka par 90%. A5 barotnē esošo šūnu dzīvotspēja pakāpeniski samazinās, pieaugot pasāžai (16.attēls). MDA-MB-231 šūnu dzīvotspēja ir lielāka nekā MCF7. Tikai otrajā pasāžā A5 barotnē esošo šūnu dzīvotspēja ir 90%, bet D5 barotnē - mazāka par 90%. 100% dzīvotspēja ir šūnām B5 barotnē pirmajā un trešajā pasāžā, kā arī A10 barotnē trešajā pasāžā (16.attēls).

Visām šūnām PDT bija vislielākais pirmajā pasāžā. To var izskaidrot ar šūnu adaptēšanos jauniem vides apstākļiem. Visas šūnas vislētāk proliferēja D5 barotnē. Šai barotnei sastāvā ir DMEM un F12 attiecībā 1:3. F12 ir barotne, kurā ir plaša piedevu daudzveidība, bet tās ir nelielās koncentrācijās (Freshney 2012). Iespējams, pēc augšanas ar barības vielām koncentrētākā vidē (DMEM:F12), šūnām nepieciešams ilgāks adaptācijas

laiks. Mainot šūnu apstākļus no 10% seruma un barotni, kurai tiek pievienots tikai 5% serums, tika paredzēts, ka šūnām būs nepieciešams laiks adaptācijai.



16.attēls. Dzīvotspēja krūts vēža šūnu līnijās atkarībā no barotnes. Pa kreisi MCF7; pa labi MDA-MB-231.

Figure 16. Viability of breast cancer cell lines grown in different types of media. On left MCF7; on right MDA-MB-231.

Tomēr šūnu dzīvotspēja un PDT A5 un A10 barotnēs ir līdzīga, tātad seruma daudzuma samazināšana šūnas ietekmē minimāli. Dzīvotspēja, kas ir mazāka par 90% tiek uzskatīta par sliktu rādītāju, kas norāda uz nepiemērotiem augšanas apstākļiem kultūrā. Iespējams, konfluences netika pareizi novērtēta un šūnas tika pārsētas pārāk vēlu. Šajā laikā šūnas kultūrā varēja izdalīt signālus, kas veicināja šūnu bojāeju. Līdzīgi skaidrojami lielie PDT rezultāti. Turpmāk konfluences novērtēšanai jāpievērš lielāka uzmanība.

3.3. Imūnfluorescentā iezīmēšana

Imūnfluorescencei izmantotais protokols katrā laboratorijā atšķiras atkarībā no mērķa, ko vēlas sasniegt. Šajā darbā tika izmantots protokols, kas aprakstīts publikācijā (Barbe *et al.* 2008). Ir daudz dažādu iespēju, sākot ar to, kādā šķīdumā šūnas fiksēt un antivielu koncentrācijas izvēlē. Paraugu var fiksēt metanolā, etanolā, acetonā, tādējādi paraugu dehidratējot un likvidējot lipīdus, bet var arī izmantot aldehīdus saturošus fiksatorus, kā tas tika darīts šajā darbā. Paraformaldehīds veido starpmolekulāros tiltus starp brīvajām aminogrupām, kā rezultātā rodas savstarpēji saistītu antigēnu tīkls. Šis fiksēšanas veids labāk saglabā šūnas struktūru. Var gadīties, ka fiksācijas šķīdums ir pārāk spēcīgs un tiek nosepta

antivielas piesaistes vieta- epitops. Tādā gadījumā mēdz veikt antigēna atgūšanas procedūru, izmantojot termisku vai ķīmisku apstrādi. Pirms eksperimenta, tika veikta metodes pārbaude, kuras laikā tika konstatēts, ka antigēna atgūšana nav nepieciešama.

Nākamais solis ir parauga permeabilizēšana, padarot membrānu caurlaidīgāku, tā kā daudzi antigēni atrodas iekššūnas vidē- kodolā, citoplazmā u.c. Šim procesam izmanto 0,1% TritonX-100. Šajā protokolā paraugs tika permeabilizēts trīs reizes pa 5 min. Tomēr imūnfluorescences attēlos var redzēt, ka šūnām ir izmainīta forma, kas atšķiras no tās, kas bija redzama pēc fiksēšanas. Tāpēc turpmākajās iezīmēšanas reizēs tiks izmantota vieglāka permeabilizācija, iespējams, vienreiz vai divreiz permeabilizējot 5min.

Bloķēšanai tika izmantots normālais kazas serums, tā kā sekundārās antivielas ir kazas izcelsmes. Iepriekšējos eksperimentos tika izmantots FBS, bet seruma maiņa rezultātu neietekmēja.

Primāro un sekundāro antivielu atšķaidījumi tika iepriekš noteikti titrēšanas eksperimentā, tādēļ šajā darbā tika izmantotas antivielu koncentrācijas, kas vislabāk ataino proteīnu lokalizāciju un intensitāti.

Lai noteiktu, kur atrodas šūnas kodols, tika izmantots DAPI, kas saistās ar nukleīnskābēm. Pirmajā iekrāsošanas posmā, tika izmantots atšķaidījums 1:50, bet pēc iegūtajiem attēliem bija redzams, ka signāls ir pārāk vājš un DAPI koncentrācija tika palielināta, izmantojot atšķaidījumu 1:30.

Iegūtajos attēlos bija redzams (dati nav attēloti), ka šūnu blīvums ir mazāks, nekā tas bija tikko nofiksētās šūnās. Imūniezīmēšanas protokolā pēc katra soļa ir nepieciešama skalošana, kopumā protokolā šūnas tiek skalotas 22 reizes. Šie daudzie šķīduma maiņas posmi varētu izraisīt šūnu noskalošanos. Lai to novērstu, MCF7 un HDFa šūnas tika izsētas uz platēm, kas pārklātas ar poli-lizīnu. Poliaminoskābes nodrošina šūnu piesaisti virsmai. Daudzām šūnām normāla piesaiste virsmai, augšana un attīstība ir atkarīga no piesaistes faktoriem un ekstracelulārā matricas komponentiem. Dažas šūnas pašas ir spējīgas tos sintezēt, bet citām ir nepieciešams kāds ārējs faktors. Parasti tas nepieciešams gadījumos, kad tiek izmantotas serumu nesaturošas barotnes. Polilizīns nodrošina elektrostātisku mijiedarbību starp negatīvi lādētiem joniem šūnu membrānā un pozitīvi lādētiem virsmas joniem piesaistes faktoros uz kultivēšanas materiāla virsmas. Kad poli-lizīns tiek absorbēts kultivēšanas trauka virsmā, tas palielina pozitīvi lādēto piesaistes vietu apjomu, kas ir pieejami šūnu piesaistei (Sitterley 2008). MDA-MB-231 šūnas tika izsētas uz platēm bez poli-lizīna pārklājuma. Salīdzinot šūnu blīvumus, var secināt, ka poli-lizīns neveicināja spēcīgākus kontaktus šūnas virsmai, tomēr, lai varētu pārliecināties par šādu apgalvojumu, nepieciešams veikt atkārtotu

eksperimentu, kurā uz dažādiem pārklājumiem tiktu uzsēta tā pati šūnu līnija, jo katrai šūnu līnijai ir atšķirīgas adhezīvās īpašības.

3.4. Šūnās producētie proteīni

MDA-MB-231 šūnu līnijā proteīns KRT5/6 netiek producēts (13.tabula). Visās barotnēs signāls ir negatīvs. D5 barotnē ir atsevišķas šūnas, kurā varētu būt neliela šī proteīna klātbūtne, bet šis daudzums ir nenozīmīgs, kā arī D5 barotnes dati neatbilst normālajam sadalījumam. KRT14 šajā šūnu līnijā tiek producēts visvairāk. Vislielākā KRT14 intensitāte ir barotnē A10 (~5222). Pārējās barotnēs šis proteīns tiek producēts mazāk (intensitāte aptuveni 3500). Tā kā MDA-MB-231 ir šūnu līnija ar bazālu fenotipu, KRT14 produkcija atbilst literatūrā aprakstītajam. KRT14 var izmantot bazālo šūnu detekcijai (Charafe-Jauffret *et al.* 2006).

13. tabula.

KRT5/6 un KRT14 vidējā intensitāte šūnu līnijās, kas audzētas atšķirīgās barotnēs.

Table 13.

Mean intensity of KRT5/6 and KRT14 in cell lines cultivated in different cell culture media.

Barotne	KRT5/6 intensitāte MCF7	KRT5/6 intensitāte MDA- MB-231	KRT5/6 intensitāte HDFa	KRT14 intensitāte MCF7	KRT14 intensitāte MDA-MB- 231	KRT14 intensitāte HDFa
A10	343,6	332,4	346,8	3902,8	5221,9	1356,8
A5	371,2	326,3	322,8	3798,3	3786,5	1518,8
B5	346,3	331,6	318,4	2949,5	3444,7	1248,6
D5	344,0	330,3	N	1630,3	3346,7	N

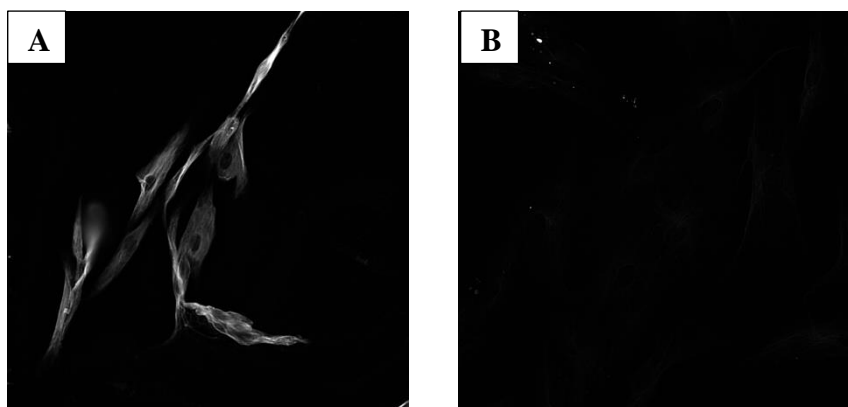
MCF7 neekspressē KRT5/6. Atsevišķas izlecošās vērtības novērojamas B5 barotnē, bet tā kā detektēto šūnu skaits ir tikai 27, šie dati nav statistiski ticami. A10 un A5 barotnēs KRT14 tiek producēts visvairāk (vidējā intensitāte ~3800). Par ceturtdaļu mazāka ekspresija ir barotnē B5, bet vismazāk šis antigēns tika konstatēts D5 barotnē- uz pusi mazāk nekā A10 ar intensitāti ~1600 (13.tabula). MCF7 šūnu līnijā KRT14 proteīnam nevajadzētu būt detektētam tā, kā tas nav luminālas šūnu līnijas marķieris (Taylor-Papadimitriou *et al.* 1989).

Fibroblastu šūnu līnijā tāpat kā pārējās nenotiek KRT5/6 produkcija. KRT14 ir salīdzinoši mazāk nekā pārējās šūnu līnijās. Vislielākā intensitāte ir A5 barotnē (~1519),

vismazākā B5 (vidējā intensitāte aptuveni 1248). A5 barotnē KRT14 atsevišķās šūnās tiek producēts vairāk, maksimālā intensitātes vērtība pārsniedz 8000 (13.tabula).

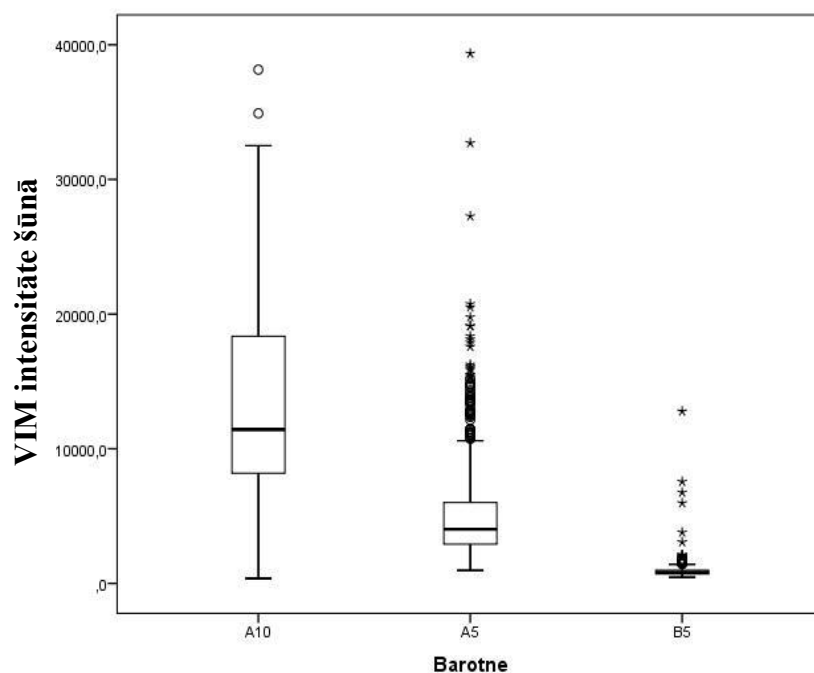
VIM ir marķieris, ko izmanto, lai identificētu fibroblastus (Goodpaster *et al.* 2008). Arī šajā darbā, fibroblasti bija vienīgā šūnu līnija, kurā vimentīns tiek producēts (18.attēls). A10 barotnē tas ir visvairāk (intensitāte 13748), bet B5 barotnē, tas gandrīz nav detektējams, tā intensitāte ~ 909 (17.attēls). Var secināt, ka B5 ir barotne, kura samazina fibroblastiem raksturīgo marķieru ekspresiju paraugā, tāpēc var būt piemērota šūnu kultūrām, kurās stromālo šūnu klātbūtne nav vēlama. MCF7 neproducē VIM arī MDA-MB-231 VIM signāls ir negatīvs.

KRT19 tiek ekspresēts lielā daudzumā MCF šūnu līnijā. Tas ir aptuveni vienādos daudzumos visās barotnēs, bet nedaudz vairāk A5 barotnē (~52233). MDA-MB-231 KRT19 tiek producēts, bet nelielos daudzumos. vismazāk D5 barotnē (5235), nedaudz vairāk A5, kur tā intensitāte ir 5544, bet visvairāk barotnē A10 (8883).



17.attēls. VIM ekspresija HDFa A10 barotnē (A) un B5 barotnē (B).

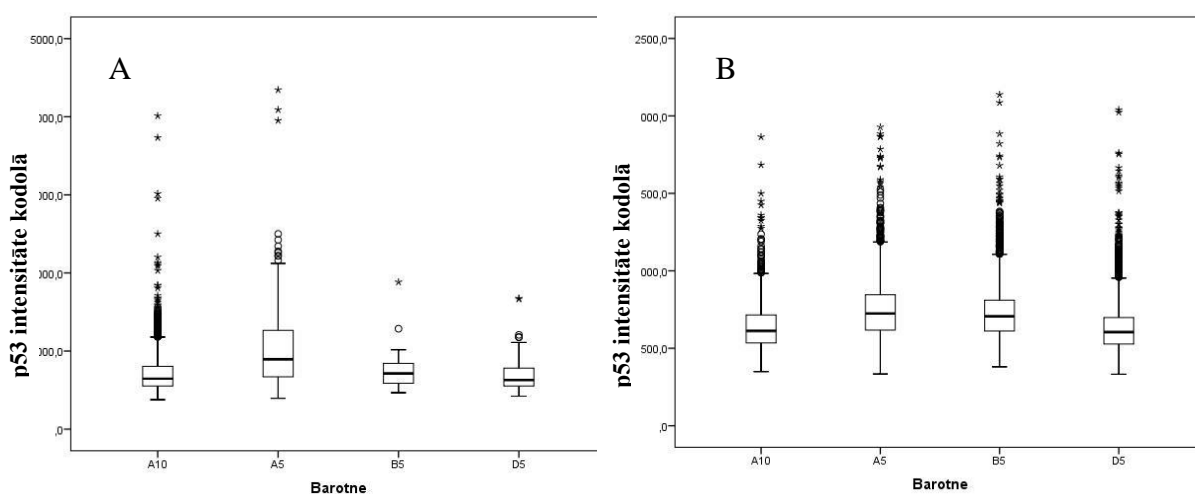
Figure 17. VIM expression in HDFa media A10 (A) and B5 (B).



18. attēls. VIM signāla intensitāte HDFa šūnu līnijā atšķirīgās barotnēs.

Figure 18. Intensity of VIM in HDFa cell line in different cell culture media.

P53 marķiera intensitātes salīdzināšanai tika izmantoti dati, kas iegūti, mērot signāla intensitāti kodolā, tā kā tajā uzkrājas mutantā p53 gēna proteīni (Yang *et al.* 2013). MCF7 visvairāk P53 konstatēts A5 barotnē ar intensitāti 1050, bet pārējās barotnēs tā daudzums ir līdzīgs, svārstoties no 700 līdz 800 (19.A attēls).

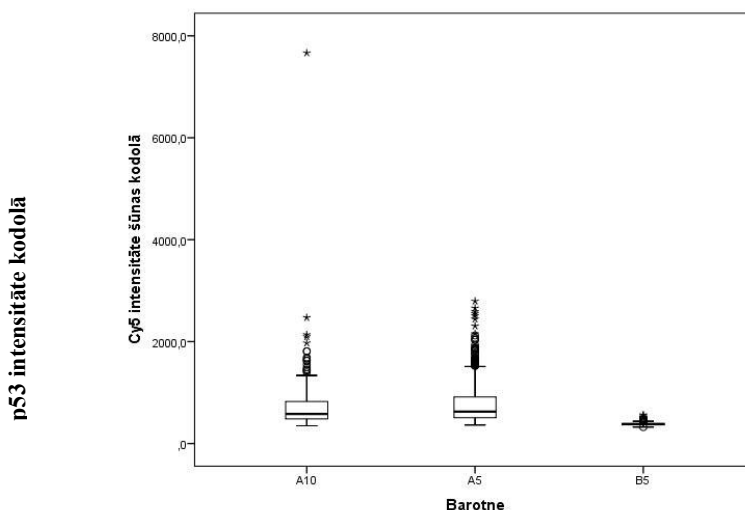


19.attēls. P53 signāla intensitāte MCF7 (A) un MDA-MB-231 (B) šūnu līnijās atšķirīgās barotnēs.

Figure 19. Intensity of p53 in MCF7 (A) and MDA-MB-231 (B) cell lines in different cell culture media.

Arī MDA-MB-231 p53 tiek ekspresēts mazāk (19. B attēls). Signāls ir vāji pozitīvs. A10 un B5 barotnēs tā intensitāte ir nedaudz lielāka par 600. Dati neatbilst normālajam sadalījumam. Visās barotnēs bija daudz vērtību, kas bija augstākas par vidējo intensitāti. Šīs izlecošās vērtības var skaidrot divējādi. Iespējams, ka ir atsevišķas šūnas, kurās signāls ir intensīvāks, bet, pārskatot iegūtos imūnfluorescences attēlus, tika konstatēts, ka daudzos laukumos šūnas pārklājas viena virs otras. Tā rezultātā arī signāls šajās vietās ir spēcīgāks. Šo problēmu varētu novērst, pirms analīzes izskatot katru iegūto attēlu, un atlasīt tikai tos laukus, kuros šūnas ir izkārtotas monoslānī.

Krūts vēža šūnās notiek bieža p53 gēna mutācija, kuras rezultātā proteīns ir stabilāks un to var detektēt ar imūnhistoķīmijas un imūnfluorescences metodēm (Yang *et al.* 2013). Tomēr p53 tika konstatēts arī cilvēka dermālajos fibroblastos, līdzīgos daudzumos A10 un A5 barotnēs (vidēji 750), bet mazāk B5 barotnē (vidējā intensitāte 383) (20.attēls). Iespējams, A10 un A5 barotnēs šūnās bija radušies bojājumi, kuru rezultātā sākās p53 gēna izraisīta apoptoze.



20.attēls. p53 signāla intensitāte HDFa šūnu līnijā atšķirīgās barotnēs.

Figure 20. Intensity of p53 in HDFa cell line in different cell culture media.

MKI67 marķieris liecina par proliferējošo šūnu daudzumu kultūrā. Jo vairāk šis proteīns ir šūnas kodolā, jo lielāks daudzums šūnu, kas proliferē (Scholzen and Gerdes 2000). Salīdzinot šūnu līnijas, vislielākais proliferējošo šūnu daudzums ir MCF7 kultūrā, mazāks MDA-MB-231, bet HDFa līnijā šūnas lielākoties atrodas G₀ fāzē. MCF7 MKI67proteīns visvairāk ir A10 barotnē, bet vismazāk D5. Tas pats novērojams arī A5 MDA-MB-231, bet HDFa, visvairāk šūnas dalās barotnē A5 (14. tabula).

14. tabula.

MKI 67 vidējā intensitāte šūnu līnijās, kas audzētas atšķirīgās barotnēs.

Table 14.

Mean intensity of MKI67 in cell lines cultivated in different cell culture media.

Barotne	MKI67 intensitāte šūnas kodolā MCF7	MKI67 intensitāte šūnas kodolā MDA-MB-231	MKI67 intensitāte šūnas kodolā HDFa
A10	39779,7	16471,8	5633,5
A5	30089,7	16671,6	8116,5
B5	33671,8	14503,0	4005,6
D5	28577,8	12075,8	N

Visās šūnu līnijās EpCam tiek producēts nelielos daudzumos. Nedaudz vairāk ar intensitāti 820 - A5 barotnē, šis proteīns ir MCF7 šūnu līnijā. B5 un D5 barotnēs tā intensitāte ir aptuveni 400. MDA-MB-231 signāls ir negatīvs līdzīgi kā HDFa. Intensitāte ir robežās no 331 līdz 387 (15. tabula).

15.tabula.

EpCam vidējā intensitāte šūnu līnijās, kas audzētas atšķirīgās barotnēs.

Table 15.

Mean intensity of EpCam in cell lines cultivated in different cell culture media.

Barotne	EpCam intensitāte MCF7	EpCam intensitāte MDA-MB-231	EpCam intensitāte HDFa
A10	664,0	387,5	337,2
A5	820,1	368,7	345,1
B5	422,8	366,6	331,5
D5	402,0	361,2	N

MUC 1 ir epitēlija šūnu transmembrānas glikoproteīns, ko parasti šūna producē nelielos daudzumos (Cascio *et al.* 2011). MUC1 producētais daudzums visās šūnu līnijās ir atšķirīgs. Visvairāk MUC1 ir MCF7, bet MDA-MB-231 signāla intensitāte samazinās līdz tuvu negatīvai. MCF7 spēcīgākais signāls detektēts barotnē A5 (2499), bet vājākais D5 barotnē.

HDFa signāls ir negatīvs. Lai gan, salīdzinot skaitļus (robežās no 416 līdz 524), izskatās, ka signāls ir, tomēr tam ir minimāla atšķirība no fona intensitātes (16. tabula).

16.tabula.

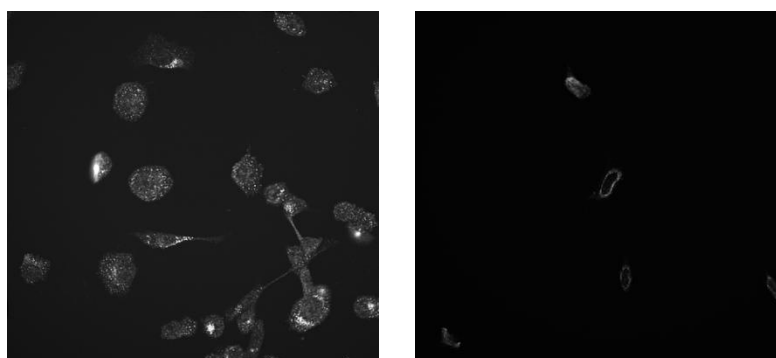
MUC1 vidējā intensitāte šūnu līnijās, kas audzētas atšķirīgās barotnēs.

Table 16.

Mean intensity of MUC1 in cell lines cultivated in different cell culture media.

Barotne	MUC1 intensitāte MCF7	MUC1 intensitāte MDA-MB-231	MUC1 intensitāte HDFa
A10	1673,1	628,6	524,8
A5	2499,1	612,5	497,5
B5	982,4	560,9	416,5
D5	871,2	600,9	N

CD24 un CD44 ir šūnu marķieri, kas raksturo krūts vēža cilmes šūnas. Tomēr CD24 tiek ekspresēts vairāk tajās šūnās, kas ir vairāk diferencējušās. Pēc literatūras datiem CD24 vajadzētu būt producētam tikai MDA-MB-231, bet CD44 tikai MCF7 šūnu līnijā (Sheridan *et al.* 2006). Tomēr iegūtie dati nesakrīt ar literatūrā aprakstīto. Visās šūnu līnijās ir negatīvs CD24 signāls. CD44 signāls ir vāji pozitīvs MDA-MB-231 un HDFa (intensitāte robežās no 623 līdz 899). HDFa A10 barotnē signāls ir pozitīvs A10 barotnē, kas liecina, ka šajā barotnē metabolisma procesi (proliferācija, diferenciācija, kustīgums) norit visaktīvāk (Jaggupilli and Elkord 2012). Intensitātes atšķirību var noteikt arī vizuāli (21. attēls). MCF7 ir izteikta *CD44* ekspresija. Visvairāk tas ir A5 barotnē (vidējā intensitāte 2501), bet vismazāk D5 barotnē (vidējā intensitāte 1335) (17.tabula).



21.attēls. CD44 signāla atšķirības MCF7 A5 barotnē (pa kreisi) un D5 barotnē (pa labi).

Figure 21. Difference of signal intensity in MCF7 cell line in media A5 (on left) and D5 (on right).

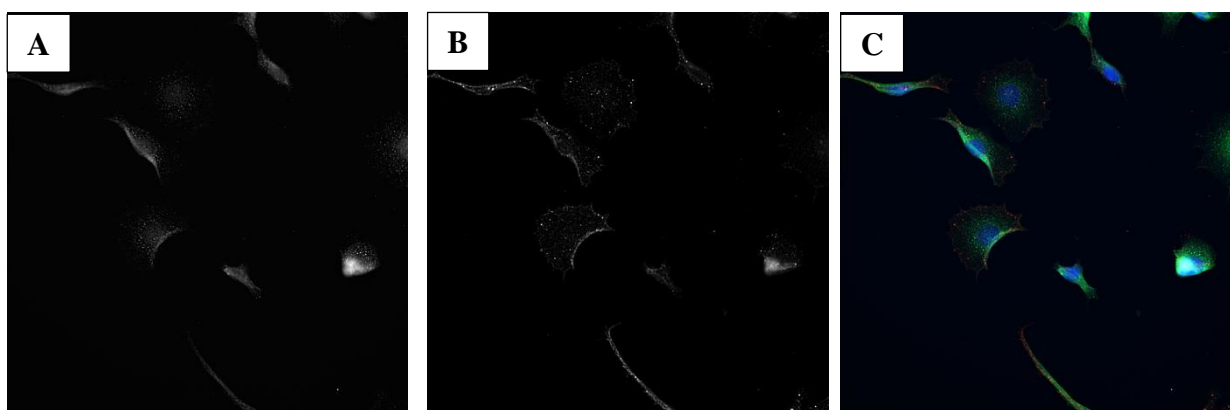
CD24 un CD44 vidējā intensitāte šūnu līnijās, kas audzētas atšķirīgās barotnēs.

Table 17.

Mean intensity of CD24 and CD44 in cell lines cultivated in different cell culture media.

Barotne	CD24 intensitāte MCF7	CD24 intensitāte MDA-MB-231	CD24 intensitāte HDFa	CD44 intensitāte MCF7	CD44 intensitāte MDA-MB- 231	CD44 intensitāte HDFa
A10	354,8	349,5	357,0	1566,8	861,0	1342,0
A5	353,4	348,1	357,5	2501,5	625,4	899,0
B5	365,5	347,7	338,3	2383,5	681,9	623,1
D5	346,1	345,9	N	1335,6	629,3	N

ER un PGR ir marķieri, ko visbiežāk izmanto klīniskajā praksē, ar imūnhistoķīmijas palīdzību nosakot receptoru statusu karcinomās (Carels *et al.* 2016). Pēc literatūrā pieejamās informācijas ER ir MCF7 šūnu līnijā, bet nav MDA-MB-231 (Kao *et al.* 2009). Estrogēna receptori atrodas šūnas kodolā, bet to signāls tika detektēts arī citoplazmā (22.attēls). Signāla intensitāte ir spēcīgāka kodolā. Dažos gadījumos tā atšķiras pat par pusi (19. tabula). Visvairāk ER ir barotnē A5. B5 un A10 barotnēs intensitāte būtiski neatšķiras, bet vismazākā tā ir D5 barotnē.



22. attēls. MCF7 A5 barotnē. A-ER, B-PGR, C-apvienots ER, PGR and TUBA4A.

Figure 22. attēls. MCF7 in media A5. A-ER, B-PGR, C-merged ER, PGR and TUBA4A.

MDA-MB-231 nenovēro tik krasas intensitātes atšķirības starp citoplazmu un kodolu. Šajā šūnu līnijā visvairāk ER tika producēts A10 barotnē, D5 barotnes intensitāte bija līdzīga, bet vismazākais daudzums ER bija A5 barotnē. Spriežot pēc rezultātiem, kultivēšanas procesā šūnas ir saņēmušas kādus ārējās vides signālus, kā rezultātā bazālā šūnu līnija, kurai

nav hormonatkarīgo receptoru ir mainījusi savu fenotipu. Viens no iemesliem varētu būt FBS, kura sastāvs var atšķirties starp dažādām sērijām (20.tabula).

19.tabula.

ER vidējā intensitāte MCF7 šūnu citoplazmā un kodolā.

Table 19.

Mean intensity of ER in MCF7 cytoplasm and nucleus.

Barotne	ER intensitāte visā šūnā	Standartnovirze	95% ticamības intervāls	ER intensitāte šūnas kodolā	Standartnovirze	95% ticamības intervāls
A10	2543,4	1244,0	2488,73-2598,1	3444,0	1414,2	3381,8-3506,2
A5	3253,5	2098,8	3081,8-3425,3	4490,1	2336,3	4298,9-4681,3
B5	1681,2	1096,3	1117,5-2244,9	3055,4	1813,2	2123,1-3987,7
D5	1044,0	583,3	940,3-1147,7	2020,1	854,9	1868,1-2172,1

20. tabula,

ER vidējā intensitāte MDA-MB-231 šūnu citoplazmā un kodolā.

Table 20.

Mean intensity of ER in MDA-MB-231 cytoplasm and nucleus.

Barotne	ER intensitāte visā šūnā	Standartnovirze	95% ticamības intervāls	ER intensitāte šūnas kodolā	Standartnovirze	95% ticamības intervāls
A10	1609,3	398,9	1587,5-1631,2	1858,6	493,8	1831,6-1885,6
A5	1142,7	270,6	1134,2-1151,2	1503,8	346,4	1492,9-1514,7
B5	1450,0	353,2	1439,9-1460,2	1910,9	445,9	1898,1-1923,6
D5	1342,5	497,8	1326,5-1358,6	1795,4	659,8	1774,1-1816,6

Iepriekšējo minējumu apstiprina ER ekspresija cilvēka dermālajos fibroblastos. Šī šūnu līnija ir izdalīta no cilvēka ādas, kurā normālos apstākļos hormonatkarīgais receptors netiek producēts. A5 barotnē ER intensitāte ir vislielākā. Cioplazmā signāls ir vāji pozitīvs vai negatīvs (21. tabula).

21.tabula.

ER vidējā intensitāte HDFa šūnu citoplazmā un kodolā.

Table 21.

Mean intensity of ER in HDFa cytoplasm and nucleus.

Barotne	ER intensitāte visā šūnā	Standartnovirze	95% ticamības intervāls	ER intensitāte šūnas kodolā	Standartnovirze	95% ticamības intervāls
A10	851,2	530,5	778,8- 923,5	1317,4	757,9	1214,1- 1420,8
A5	1099,3	578,0	1059,1- 1139,4	1893,8	899,6	1831,2- 1956,3
B5	690,3	151,4	679,7- 700,8	1008,3	301,4	987,4- 1029,3

Pēc iegūtajiem rezultātiem progesterona receptors ir vāji pozitīvs MDA-MB-231 un HDFa. Visvairāk tas tiek producēts MCF7, kas atbilst literatūrā norādītajiem datiem (Kao *et al.* 2009). MCF7 vislielākā PGR intensitāte ir barotnē A5 (aptuveni 1849) (22.B attēls), bet vismazākā D5 barotnē (vidējā intensitāte 914) (22.tabula). Tas varētu norādīt, ka barotnes sastāvs B5 barotnē novirza šūnu fenotipa izmaiņas uz vairāk bazālu.

22. tabula.

PGR vidējā intensitāte šūnu līnijās, kas audzētas atšķirīgās barotnēs.

Table 22.

Mean intensity of PGR in cell lines cultivated in different cell culture media.

Barotne	PGR intensitāte šūnas kodolā MCF7	PGR intensitāte šūnas kodolā MDA-MB-231	PGR intensitāte šūnas kodolā HDFa
A10	1427,1	587,0	757,8
A5	1849,4	539,3	917,7
B5	1118,7	505,1	559,2
D5	914,2	471,5	N

Proteīnus MUC1, EpCam, PGR, ER producē epitēlija šūnas. D5 barotnē to signāla intensitātes ir vismazākās. Var secināt, ka D5 barotne nodrošina šūnu dediferenciāciju. Šūnas, kam raksturīgs lumināls fenotips, kļūst bazālas.

B5 barotne ir nepiemērota fibroblastu kultivēšanai, jo tie zaudē VIM produkciju, kas ir marķieris, kas raksturo šīs šūnas.

MDA-MB-231 ir bazāla šūnu līnija, kurā netiek producēti virsmas receptori. Tomēr ER signāla intensitāte MDA-MB-231 šūnu līnijā bija ļoti augsta (aptuveni 1800). Izmaiņas proteīnu sintēzē notikušas jau pirms atšķirīgo barotņu pievienošanas.

SECINĀJUMI

1. Krūts vēža šūnu līniju (MCF7 un MDA-MB-231) visātrākā augšana bija A10 un A5 barotnēs.
2. Visaugstākā šūnu dzīvotspēja bija A10 un B5 barotnēs, savukārt viszemākā - D5 barotnē.
3. Barotnes, kurās tika pievienoti papildus augšanas faktori un hormoni, ietekmēja šūnu fenotipu un proteīnu ekspresiju:
 - a. D5 barotne dediferencē epitēlija šūnas, mainot lumināla tipa šūnu fenotipu uz bazāla tipa;
 - b. B5 barotni var izmantot, lai samazinātu stromas šūnu daudzumu kultūrā;
 - c. Vispiemērotākā barotne epitēlija šūnu audzēšanai ir A5, jo tā neizmainīja šūnām raksturīgo proteīnu produkciju.

PATEICĪBAS

Darba autore izsaka pateicību darba vadītājam Dipl. pharm. Valdim Pirsko, zinātniskajai grupai un tās vadītājai Dr. biol. Inesei Čakstiņai, kā arī RSU Onkoloģijas institūta Molekulārās ģenētikas laboratorijas kolektīvam. Paldies Dr. biol. prof. Aijai Linē un Ērikam Jakobsonam par saņemtajām šūnu līnijām. Paldies ģimenei par sapratni un kolēģei Unai Čonkai par atbalstu šī darba tapšanā.

Darbs tika izstrādāts Valsts pētījumu programmas "Biomedicīna sabiedrības veselībai" 5.projekta „Personalizēta vēža diagnostika un terapijas efektivitātes noteikšana ietvaros”.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abd El-Rehim D., Pinder S., Paish C., Bell J., Blamey R.W., Robertson J., Nicholson R., Ellis I. 2004. Expression of Luminal and Basal Cytokeratins in Human Breast Carcinoma. *Journal of Pathology* 203(2): 661–671 pp.
2. Ackland M. L., Newgreen D.F., Fridman M., Waltham M.C., Arvanitis A., Minichiello J., Price J.T., Thompson E.W. 2003. Epidermal Growth Factor-Induced Epithelio-Mesenchymal Transition in Human Breast Carcinoma Cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 83(3): 435–448 pp.
3. Adem C., Reynolds C., Ingle J.N., Nascimento G. 2004. Primary Breast Sarcoma: Clinicopathologic Series from the Mayo Clinic and Review of the Literature. *British journal of cancer* 91(2): 237–241 pp.
4. Adriance M. C., Jamie L. I., Petersen O.W., Bissell M.J. 2005. Myoepithelial Cells: Good Fences Make Good Neighbors. *Breast cancer research : BCR* 7(5): 190–197 pp.
5. Anonymus 2015a. Types of Breast Cancers. Histologic examples of in situ and invasive carcinomas of the breast. <http://pathology.jhu.edu/breast/types.php>.
6. Anonymus 2015b. Overview of Histologic Grade: Nottingham Histologic Score. <http://pathology.jhu.edu/breast/grade.php>
7. Anonymus 2015c. IHC Tests. ImmunoHistoChemistry. <http://www.breastcancer.org/symptoms/testing/types/ihc>
8. ATCC. 2014a. MDA-MB-231. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx?geo_country=lv#culturemethod
9. ATCC 2014b. MCF7. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx>
10. BarbeL., Lundberg E., Oksvold P, Stenius A., Lewin E., Bjorling E., Asplund A., Ponten F., Brismar H., Uhle M., Andersson-Svahn H. 2008. Toward a Confocal Subcellular Atlas of the Human Proteome. *Mol Cell Proteomics* 7(3): 499–508.
11. Bassett J., Williams G., 2016. Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance. *Endocrine reviews* 37(2): 135–187 pp.
12. Battaglia S., Akchiche N., Noel N., Alberto J., Jeannesson E., Barrios C., Fong D., Daval J., Gueant J. 2009. Vitamin B12 Deficiency Reduces Proliferation and Promotes Differentiation of Neuroblastoma Cells and up-Regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(51): 21930–21935 pp.
13. Beck R., Pedrosa R.C., Dejeans N., Glorieux C., Levêque P., Gallez B., Taper H., Eeckhoudt S., Knoop L., Calderon P.B., Verrax J. 2011. Ascorbate/menadione-Induced Oxidative Stress Kills Cancer Cells That Express Normal or Mutated Forms of the

- Oncogenic Protein Bcr-Abl. An in Vitro and in Vivo Mechanistic Study. *Investigational New Drugs* 29(5): 891–900 pp.
14. Bertucci F., Finetti P., Birnbaum D. 2012. Basal Breast Cancer: A Complex and Deadly Molecular Subtype. *Current Molecular Medicine* 12(1): 96–110 pp.
 15. Betley S, Peak M., Agius L. 1993. Triiodo-L-Thyronine Stimulates Glycogen Synthesis in Rat Hepatocyte Cultures. *Molecular and cellular biochemistry* 120(2): 151–158 pp.
 16. Carels, Nicolas, Lizânia B. S., Tilli T.M, and Tuszynski J.A. 2016. Toward Precision Medicine of Breast Cancer. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 13(7): 1-46 pp.
 17. Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Monville F. Finetti P., Adelaide J., Cervera N., Fekairi S., Xerri L., Jacquemier J., Birnbaum D., Bertucci F. 2006. Gene Expression Profiling of Breast Cell Lines Identifies Potential New Basal Markers.”*Oncogene* 25(15): 2273–2284.
 18. Chekhun S., Bezdenezhnykh N, Shvets J, and Lukianova N. 2013. Expression of Biomarkers Related to Cell Adhesion, Metastasis and Invasion of Breast Cancer Cell Lines of Different Molecular Subtype. *Experimental Oncology* 35(3): 174–179 pp.
 19. Chen J, Russo J. 2010. ER α -Negative and Triple Negative Breast Cancer: Molecular Features and Potential Therapeutic Approaches. *Biochim Biophys Acta* 1796(2): 162–175 pp.
 20. Clarke, Robert B., Anderson E., Howell A. 2004. Steroid Receptors in Human Breast Cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15(7): 316–323 pp.
 21. Clevers H., Eaves Connie, Gilbertson R., Risbridger G., Visvader J. 2011. The emerging biology of cancer stem cells. *Nature*:
<http://www.nature.com/nrc/posters/cancerstemcells>
 22. Ethier S. P., Mahacek M.L., Gullick W. 1993. Differential Isolation of Normal Luminal Mammary Epithelial Cells and Breast Cancer Cells from Primary and Metastatic Sites Using Selective Media. *Cancer Research* 53(3): 627–635 pp.
 23. Ethier S.P., Ammerman C.A, Dziubinski M.L. 2000. Isolation and Culture of Human Breast Cancer Cells from Primay Tumors and Metastases. *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*: 195–208 pp.
 24. Fitzpatrick S L, LaChance M.P, Schultz G.S. 1984. Characterization of Epidermal Growth Factor Receptor and Action on Human Breast Cancer Cells in Culture. *Cancer Res* 44(8): 3442–3447 pp.
 25. Freshney R. I. 2010. *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique specialized applications*. 6th ed., New Jersey: John Wiley and Sons, 772 pp.
 26. Goodpaster T., Legesse-Miller A., Hamed M.R., Aisner S.c., Randolph- Habecker J.,

- Coller H.A. 2008. An Immunohistochemical Method for Identifying Fibroblasts in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 56(4): 347–358.
27. Greene J.M., Feugang J.M., Pfeiffer K.E., Bowers S.D., Ryan P.L. 2013. L-Arginine Enhances Cell Proliferation and Reduces Apoptosis in Human Endometrial RL95-2 Cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 11(15):1-11 pp.
 28. Haeffner E W, Hoffmann C.J., Stoehr M., Scherf H. 1984. Cholesterol-Induced Growth Stimulation, Cell Aggregation, and Membrane Properties of Ascites Tumor Cells in Culture. *Cancer research* 44(6): 2668–2676 pp.
 29. Harris J.R., Lippman M.E., Morow M., Osborne C.K. 2014. *Diseases of breast. Fifth edition*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health. 1219 pp.
 30. Jaggupilli, Appalaraju, Elkord E. 2012. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology*. 1-11 pp.
 31. Jatoi I., Kauffmann M. 2010. *Management of Breast Diseases*, Berlin, Springer Berlin Heidelberg, 665 pp.
 32. Kao J., Salari K., Bocanegra M., Choi Y., Girard L., Gandhi J., Kwei K.A., Hernandez-Boussard T., Wang P., Gazdar A.F., Minna J.D., Pollack J.R. 2009. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLoS ONE* 4(7). 1-16 pp.
 33. Korsching E., Packeisen J., Liedtke C., Hungermann D., Wulfing P., van Diest P.J., Brandt B, Boecker W, Buerger H. 2005. The Origin of Vimentin Expression in Invasive Breast Cancer: Epithelial- Mesenchymal Transition, Myoepithelial Histogenesis or Histogenesis from Progenitor Cells with Bilinear Differentiation Potential? *Journal of Pathology* 206(4): 451–457 pp.
 34. Krishnamurti U., Silverman J.F. 2014. HER2 in Breast Cancer: A Review and Update. *Advances in anatomic pathology* 21(2): 100–107 pp.
 35. Krūmiņa A., Baumanis V. 2015. *Eikariotu šūnu bioloģija: citoloģiskie, molekulāri bioloģiskie un ģenētiskie aspekti*, Rīga: Rīgas Stradiņa universitāte, 560 lpp.
 36. Lahsae S., Corkery D.P., Anthes L.E., Holly A., Dellaire G. 2016. Estrogen Receptor Alpha (ESR1)-Signaling Regulates the Expression of the Taxane-Response Biomarker PRP4K. *Experimental Cell Research* 340(1): 125–131 pp.
 37. Lange C. A, Yee D. 2014. Progesterone and Breast Cancer. *Womens Health* 4(2): 151–162 pp.

38. Makris E.A., MacBar RF., Responde DJ, Hu JC, Athanasiu KA. 2013. A Copper Sulfate and Hydroxylysine Treatment Regimen for Enhancing Collagen Cross-Linking and Biomechanical Properties in Engineered Neocartilage. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27(6): 2421–2430 pp.
39. Malhotra, Gautam K., Xiangshan Z., Band H, Band V. 2010. Histological, Molecular and Functional Subtypes of Breast Cancers.”*Cancer Biology and Therapy* 10(10): 955–960 pp.
40. Markovs J., 2007. *Medicīniskā histoloģija III*, Rīga: izdevniecība EVE, 209 lpp.
41. Mather J.P., Roberts P.E., 2007. Introduction to Cell and Tissue Culture: theory and technique. *Springer Science and Business Media*.241 pp.
42. Mawson A., Lai A., Carroll JS, Sergio CM, Mitchell CJ, Sarcevic B 2005. Estrogen and insulin/IGF-1 Cooperatively Stimulate Cell Cycle Progression in MCF-7 Breast Cancer Cells through Differential Regulation of c-Myc and Cyclin D1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 229(1-2): 161–173 pp.
43. Montgomery N., Hill A., McFarlane S., Neisen J., O'Grady A., Conlon S., Jirstrom K., Kay EW., Waugh DJ. 2012. CD44 Enhances Invasion of Basal-like Breast Cancer Cells by Upregulating Serine Protease and Collagen-Degrading Enzymatic Expression and Activity. *Breast cancer research : BCR* 14(3): 1-19 pp.
44. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. TWEEN 80. CID=5281955, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281955>
45. Ogba N., Manning N.G., Bliesner B.S., Ambler K.S., Haughian J.M., Pinto P.M., Jedlicka P., Joensuu K., Heikkilä P., Horwitz K.B. 2014. “Luminal Breast Cancer Metastases and Tumor Arousal from Dormancy Are Promoted by Direct Actions of Estradiol and Progesterone on the Malignant Cells.” *Breast Cancer Research* 16(6): 1-14 pp.
46. Ohashi R., Kawahara K., Fujii T., Takei H., Naito Z. 2016. Higher Expression of EpCAM Is Associated with Poor Clinical and Pathological Responses in Breast Cancer Patients Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy. *Pathology International* 66(4): 210–217 pp.
47. Okada N, Kitano Y, Ichihara K. 1982. Effects of Cholera Toxin on Proliferation of Cultured Human Keratinocytes in Relation to Intracellular Cyclic AMP Levels. *The Journal of investigative dermatology* 79(1): 42–47 pp.
48. Osborne C K., Hamilton B., Titus G., Livingston R.B. 1980. Epidermal Growth Factor

- Stimulation of Human Breast Cancer Cells in Culture. *Cancer Research.*: 2361–2366 pp.
49. Osborne C.K. , Hobbs K.I., Trent J.M. 1987. Biological Differences among MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines from Different Laboratories. *Breast cancer research and treatment* 9(2): 111–121 pp.
 50. Pandey P.R., Saidou J, Watabe K. 2010. Role of Myoepithelial Cells in Breast Tumor Progression. *Frontiers in bioscience.* (15): 226–236 pp.
 51. Prang N., Preithner S., Brischwein K., Göster P., Wöppel A., Müller J., Steiger C., Peters M., Baeuerle PA., da Silva A.J. 2005. Cellular and Complement-Dependent Cytotoxicity of Ep-CAM-Specific Monoclonal Antibody MT201 against Breast Cancer Cell Lines. *British Journal of Cancer* 92(2): 342–349 pp.
 52. ProteinAtlas, 2016. *ESR1*. <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000091831-ESR1/tissue>
 53. Rieber M, Bacalao J., Alonso G. 1975. Cholera Toxin Effects on Cell Growth Accompanied by Selective Alterations in Metabolite Uptake and Modification of Cell Surface Proteins Cholera Toxin Effects on Cell Growth Accompanied by Selective Alterations in Metabolite Uptake and Modification of Cel. 35(11) 3009–3013 pp.
 54. Sadlonova A., Novak Z., Johnson M.R., Bowe D.B., Gault S.R., Page G.P., Thottassery J.V., Welch D.R., Frost A.R. 2005. Breast Fibroblasts Modulate Epithelial Cell Proliferation in Three-Dimensional in Vitro Co-Culture. *Breast cancer research : BCR* 7(1): 46–59 pp.
 55. Salamanca CM., Maines- Bandiera S.L., Leung P.C., Hu Y.L., Auersperg N. 2004. Effects of Epidermal Growth Factor/hydrocortisone on the Growth and Differentiation of Human Ovarian Surface Epithelium. *J Soc Gynecol Investig* 11(4): 241–251 pp.
 56. Samuels H.H., Tsai J.S. 1973. Thyroid Hormone Action in Cell Culture: Demonstration of Nuclear Receptors in Intact Cells and Isolated Nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(12): 3488–3492 pp.
 57. Santagata S., Thakkar A., Ergonul A., Wang B., Woo T., Hu T., Harrel J.C., McNamara G., Schwede M., Culhane A.C., Kindelberg D., Rodig S., Richardson A., SchnittS.J., Tamimi R.M., Ince T.A. 2014. Taxonomy of Breast Cancer Based on Normal Cell Phenotype Predicts Outcome. *The Journal of clinical investigation* 124(2): 859–870 pp.
 58. Sar P., Peter R., Rath B., Mohapatra A.D., Mishra S.K. 2011. 3,3',5' Triiodo L Thyronine Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 cells, Repressing SMP30 Expression through Negative Thyroid Response Elements.” *PLoS ONE* 6(6).
 59. Schnitt S. J. 2010. Classification and Prognosis of Invasive Breast Cancer: From Morphology to Molecular Taxonomy. *Modern pathology : an official journal of the*

United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 23 (2): 60–64 pp.

60. Scholzen T., Gerdes J. 2000. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182(3): 311–322.
61. Senese R., Cioffi F., deLange P., Goglia F., Lanni A. 2014. Thyroid: Biological Actions of ‘Nonclassical’ Thyroid Hormones. *Journal of Endocrinology* 221(2). 1-12 pp.
62. Lwin Z., Gue C., Salim A., Yip G.W., Chew F., Nan J., Thike A.A., Tan P., Bay B. 2015. Clinicopathological Significance of Calreticulin in Breast Invasive Ductal Carcinoma. *Histopathology* 67(5): 709–718 pp.
63. Sheridan C., Kishimoto H., Fuchs R.K., Mehrota S., Bhat-Nakshatri P., Turner C.H., Goulet R.Jr., Badve S., Nakshatri H. 2006. CD44+/CD24- Breast Cancer Cells Exhibit Enhanced Invasive Properties: An Early Step Necessary for Metastasis. *Breast cancer research : BCR* 8(5): 1-13 pp.
64. Sitterley G.. 2008. Poly-Lysine. *BioFiles, Sigma-Aldrich* 3.8(12).
65. Sigma 2016a. Transferrins in Cell Culture. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/transferrin.html>
66. Sigma 2016b. Vitamin B6, Pyridoxal and Pyridoxine, in Cell Culture. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/pyridoxal.html>
67. Sigma 2016c. Folic acid in cell culture. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/folic-acid.html>
68. Sigma 2016d. Iron in cell culture. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/iron.html>
69. Sleeman K.E., Kendirch H., Robertson D., Isacke C.M., Ashworth A., Smalley M.J. 2007. Dissociation of Estrogen Receptor Expression and in Vivo Stem Cell Activity in the Mammary Gland. *The Journal of cell biology* 176(1): 19–26 pp.
70. Speirs V., Skliris G.P., Burdall S.E., Carder P.J. 2002. Distinct Expression Patterns of ER Alpha and ER Beta in Normal Human Mammary Gland. *Journal of clinical pathology* 55(5): 371–374 pp.
71. Stampfer M.R. 1982. Cholera Toxin Stimulation of Human Mammary Epithelial Cells in Culture. *In vitro* 18(6). 531-537 pp.
72. Subik K., Lee J., Baxter L., Strezepk T., Costello D., Crowley P., Xing L., Hung M., Bonfiglio T., Hicks D.G., Tang P. 2010. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 4(1): 35–41 pp
73. Taylor-Papadimitriou J., Stampfer M., Bartek J., Lewis A., Bosgell M., Lane E.B.,

- Leigh I.M. 1989. Keratin Expression in Human Mammary Epithelial Cells Cultured from Normal and Malignant Tissue: Relation to in Vivo Phenotypes and Influence of Medium. *Journal of cell science* 94 (Pt 3): 403–413.
74. Tornillo G., Smalley M. 2015. ERrrr...Where are the Progenitors? Hormone Receptors and Mammary Cell Hetrogenity. *J Mammary Gland biol Neoplasia*. (20). 63-73 pp.
75. UniProt, 2016. *ESR1*. <http://www.uniprot.org/uniprot/P03372>
76. Visvader J.E., Stingl J. 2014. Mammary Stem Cells and the Differentiation Hierarchy : Current Status and Perspectives. 28. 1143–1158 pp
77. Went P.T., Lugli A., Meier S., Bundi M., Mirlacher M., Sauter G., Dirnhofer S. 2004. Frequent EpCam Protein Expression in Human Carcinomas. *Human Pathology* 35(1): 122–128 pp.
78. Wu R., Wolfe R.A., Sato G.H. 1981. Distinctive Effects of Hydrocortisone on the Modulation of EGF Binding and Cell Growth in HeLa Cells Grown in Defined Medium. *Journal of cellular physiology* 108(1): 83–90 pp.
79. Yang P., Du C.W., Kwan M., Liang S.X., Zhang G.J. 2013. The Impact of p53 in Predicting Clinical Outcome of Breast Cancer Patients with Visceral Metastasis. *Scientific reports* 3(2). 1-6 pp.
80. Yang Z, Xiong H. 2012. Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells. *Biomedical Tissue Culture* Chapter 1: 3–18 pp.

Pielikumi

1.pielikums. Barotnes sastāvdaļas, kas norādītas ražotāju mājas lapās

Appendix 1. Cell culture media components indicated by manufacturers

Barotne	M199 (SIGMA)	DMEM F12 (SIGMA)	DMEM F12 (GIBCO)	F12 (GIBCO)
Koncentrācija	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Neorganiskie sāļi				
Bezūdens CaCl ₂	0	116,6	0	33.22
CaCl ₂ • 2H ₂ O	200	0	154,50	0
CuSO ₄ -5H ₂ O	0	0,0013	0,0013	0.0025
FeSO ₄ 7H ₂ O	0	0,417	0,417	0
FeSO ₄ -7H ₂ O	0	0	0	0.834
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	0,72	0,05	0,05	0
Bezūdens MgSO ₄	97,69	48,84	48,84	0
Bezūdens MgCl	0	28,64	0	57.22
MgCl ₂ • 6H ₂ O	0	0	61,20	0
KCl	400	311,8	311,80	223.6
Bezūdens C ₂ H ₃ NaO ₂	50	0	0	0
NaHCO ₃	2200	1200	1200,00	1176.0
NaCl	6800	6995,5	6996,00	7599.0
Bezūdens Na ₂ HPO ₄	0	71,02	71,02	142.0
Bezūdens NaH ₂ PO ₄	122	0	54,30	0
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	0	62,5	0	0
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0	0,432	0,432	0.863
Aminoskābes				
L-alanīns	25	4,45	4,50	8.9
L-alanil-L-glutamīns	0	0	0	217.0
L-arginīns • HCl	70	147,5	147,50	211.0
L-asparagīns-H ₂ O	0	7,5	7,50	15.01
L-asparagīnskābe	30	6,65	6,65	13.3
L-cisteīns • 2HCl	0,11	31,29	31,29	0
L-cisteīns • HCl • H ₂ O	26	17,56	17,56	35.12
L-glutamīnskābe	66,8	7,35	7,35	14.7
L-glutamīns	100	365	350,00	0
Glicīns	50	18,75	18,75	7.5
L-histidīns • HCl • H ₂ O	21,88	31,48	31,48	21.0
L-hidroksiprolīns	10	0	0	0
L-izoleicīns	20	54,47	54,47	4.0
L-leicīns	60	59,05	59,05	13.1
L-lizīns • HCl	70	91,25	91,25	36.5
L-metionīns	15	17,24	17,24	4.5
L-fenilalanīns	25	35,48	35,48	5.0

L-prolīns	40	17,25	17,25	34.5
L-serīns	25	26,25	26,25	10.5
L-treonīns	30	53,45	53,45	11.9
L-triptofāns	10	9,02	9,02	2.04
L-tirozīns • 2Na • 2H ₂ O	57,66	55,79	55,79	7.81
L-valīns	25	52,85	52,85	11.7
Vitamīns				
Askorbīnskābe • Na	0,0566	0	0	0
Biotīns	0,01	0,0035	0,0035	0.0073
Kalciferols	0,1	0	0	0
Holīna hlorīds	0,5	8,98	8,98	14.0
Folijskābe	0,01	2,65	2,66	1.3
Menadions (nātrija bisulfīts)	0,016	0	0	0
mio-inositols	0,05	12,6	12,6	18
Niacīnamīns	0,025	2,02	2,02	0.036
Nikotinīnskābe	0,025	0	0	0
p-Aminobenzoiskābe	0,05	0	0	0
D-kalcija pentotenāts	0,01	2,24	2,24	0.5
Piridoksāls • HCl	0,025	0	0	0
Piridoksīns • HCl	0,025	2	2,031	0.06
Retinola acetāts	0,14	0	0	0
Riboflavīns	0,01	0,219	0,219	0.037
DL-Tokoferola fosfāts	0,01	0	0	0
Tiamīns	0,01	2,17	2,17	0.3
B12 vitamīns	0	0,68	0,68	1.4
Citi				
Adenīna sulfāts	10	0	0	0
Adenoziņa trifosfāts • 2Na	1	0	0	0
Adenoziņa monofosfāts • Na	0,2385	0	0	0
Holesterīns	0,2	0	0	0
Dezoksiriboze	0,5	0	0	0
Glikoze	1000	3151	3150	1802.0
DL-tioktīnskābe	0	0	0,105	0
Glutations	0,05	0	0	0
Guanīns • HCl	0,3	0	0	0
HEPES	0	3574,5	3574,5	0
Hipoksantīns	0,3	0	2,44	0
Hipoksantīns Na	0	2,39	0	4,77
Linolskābe	0	0,042	0,042	0.084
Liposkābe	0	0,105	0	0.21

1.3.
pielikums

Fenolsarkanais	0	8,1	0	1,2
Fenolsarkanais • Na	21,3	0	8,63	0
Putrescīns 2HCl	0	0,081	0,081	0,161
Polisorbāts 80 (TWEEN 80)	20	0	0	0
Riboze	0,5	0	0	0
Nātrija piruvāts	0	55	55	110,0
Timidīns	0	0,365	0,365	0,7
Timīns	0,3	0	0	0
Uracils	0,3	0	0	0
Ksantīns • Na	0,344	0	0	0

2. Pielikums. Barotņu piedevu koncentrācija atsevišķiem savienojumu komponentiem

Appendix 2. Concentrations of separate components of compounds of cell culture media

Barotne	M199 (SIGMA)	DMEM F12 (SIGMA)	DMEM F12 (GIBCO)	F12 (GIBCO)
Koncentrācija	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Joni				
Kalcijs (Ca)	54,4	42,30	42,4	12,08
Varš (Cu)	-	0,00033	0,00033	0,00064
Dzelzs (Fe)	0,0998	0,0909	0,0909	0,168
Magnijs (Mg)	19,54	17,04	17,08	14,61
Kālijs (K)	210,8	164,3	164,3	117,8
Nātrijs (Na)	3417,73	3135,6	3135,52	3380,14
Cinks (Zn)	0	0,098	0,098	0,20
Aminoskābes				
L-alanīns	25	4,50	4,45	98,82
L-glutamīns	100	350,00	365	127,18
L-arginīns	57,88	121,97	121,97	174,48
L-asparagīns	-	7,50	7,5	15,01
L-asparagīnskābe	30	6,65	6,65	13,3
L-cisteīns	18,01	31,64	31,64	24,23
L-glutamīnskābe	66,8	7,35	7,35	14,7
Glicīns	50	18,75	18,75	7,5
L-histidīns	16,2	23,30	23,30	15,54
L-hidroksiprolīns	10	0	0	0
L-izoleicīns	20	54,47	54,47	4,0
L-leicīns	60	59,05	59,05	13,1
L-lizīns	56,02	73,03	73,03	29,21
L-metionīns	15	17,24	17,24	4,5
L-fenilalanīns	25	35,48	35,48	5,0
L-prolīns	40	17,25	17,25	34,5
L-serīns	25	26,25	26,25	10,5
L-treonīns	30	53,45	53,45	11,9
L-triptofāns	10	9,02	9,02	2,04
L-tirozīns	39,7	38,41	38,41	5,38
L-valīns	25	52,85	52,85	11,7
Vitamīni				
Askorbīnskābe	0,05	0	0	0
Biotīns	0,01	0,0035	0,0035	0,0073
Kalciferols	0,1	0	0	0
Holīna hlorīds	0,5	8,98	8,98	14,0
Folijskābe	0,01	2,66	2,65	1,3

2.1.
pielikums

Menadions (nātrija bisulfīts)	0,016	-	-	-
mio-inositolis	0,05	12,6	12,6	18
Niacīnamīns	0,025	2,02	2,02	0.036
Nikotinīnskābe	0,025	0	0	0
p-Aminobenzoiskābe	0,05	0	0	0
D-kalcija pentotenāts	0,01	2,24	2,24	0.5
Piridoksāls	0,02	0	0	0
Piridoksīns	0,021	1,670	1,65	0,049
Retinola acetāts	0,14	0	0	0
Riboflavīns	0,01	0,219	0,219	0.037
DL-Tokoferola fosfāts	0,0096	0	0	0
Tiamīns	0,0088	1,91	1,91	0,26
B12 vitamīns	0	0,68	0,68	1.4
Citi				
Adenīna sulfāts	10	0	0	0
Adenozīna trifosfāts	0,92	0	0	0
Adenozīna monofosfāts	0,22	0	0	0
Holesterīns	0,2	0	0	0
Dezoksiriboze	0,5	0	0	0
Glikoze	1000	3150	3151	1802.0
DL-tioktīnskābe	0	0,105	0	0
Glutations	0,05	0	0	0
Guanīns	0,24	0	0	0
HEPES	0	3574,5	3574,5	0
Hipoksantīns	0,3	2,44	2,04	4,08
Linolskābe	0	0,042	0,042	0.084
Liposkābe	0	0	0,105	0.21
Fenolsarkanais	20	8,1	8,1	1.2
Putrescīns	0	0,044	0,045	0,088
Polisorbāts 80 (TWEEN 80)	20	0	0	0
Riboze	0,5	0	0	0
Nātrija piruvāts	0	55	55	110.0
Timidīns	0	0,365	0,365	0,7
Timīns	0,3	0	0	0
Uracils	0,3	0	0	0
Ksantīns	0,3	0	0	0

Bakalaura darbs „Atšķirīgu barotņu ietekme uz krūts vēža šūnu līniju fenotipiskām pazīmēm” izstrādāts RSU Onkoloģijas institūta Molekulārās ģenētikas laboratorijā.

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

Autors: Rasma Dortāne 09.06.2015.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dipl. pharm. Valdis Pirsko 09.06.2015.

Recenzente: MSc.biol. Elīna Zandberga 09.06.2015.

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 09.06.2015.

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē 13.06.2015.

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs: