

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

ANAEROBĀS MIKROBIOTAS KULTIVĒŠANA UN  
ANALĪZE, PIELIETOJOT ZARNAS UZ ČIPA BEZ PDMS  
POLIMĒRA

Bakalaura darbs

Autors: Valērija Movčana  
Stud. apl. Nr. vm19036  
Darba vadītājs: Dr. biol Artūrs Ābols

RĪGA 2022

## Kopsavilkums

Ir pierādīts, ka zarnu mikrobiota korelē ar vēža attīstību, kas iespējams notiek pateicoties baktēriju ārpusšūnu vezikulām (BEV). Taču šobrīd cilvēka mikrobiotas komunikācijas mehānismu izpēta ar saimniekorganisma šūnām ir komplicēta. Kā viena no perspektīvākām *in vitro* testa sistēmām šo metožu petīšanai ir zarnas uz čipa (GOC) modeļsistēmas. Līdz ar to šī darba mērķis ir izveidot GOC modeli, kas ļautu kultivēt anaerobu cilvēka zarnu mikrobiotu izdalītu no fēču parauga. Darba laikā tika izveidots inovatīvs GOC modelis, lai kultivētu un analizētu cilvēka anaerobu mikrobiotu un to BEV. Pēc rezultātiem tika secināts, ka ir izdevies izdalīt anaerobu mikrobiotu un ka jaunizveidotie GOC ir pielietojami anaerobas mikrobiotas BEV pētījumiem.

Atslēgas vārdi: zarnas uz čipa, zarnu mikrobiota, baktēriju ārpusšūnu vezikulas, kancerogēnēze

## Summary

Intestinal microbiota has been shown to correlate with cancer development, possibly due to bacterial extracellular vesicles (BEV). However, the study of the mechanism of human microbiota communication with host cells is currently complicated. One of the promising *in vitro* test systems for researching these methods is the gut on chip (GOC) model system. Therefore, the aim of this work is to develop a GOC model that would allow the cultivation of anaerobic human intestinal microbiota isolated from a faecal sample. During the work, an innovative GOC model was developed to cultivate and analyze human anaerobic microbiota and their BEV. The results showed that the anaerobic microbiota was isolated and that the newly developed GOC were applicable to the BEV studies of the anaerobic microbiota.

Keywords: gut on chip, intestinal microbiota, bacterial extracellular vesicles, cancerogenesis

## Satura rādītājs

Kopsavilkums.....	2
Summary .....	3
Ievads .....	6
1. Literatūras apskats.....	7
1.1 Cilvēka zarnu un zarnu mikrobiotas funkcijas .....	7
1.2 Mikrobioma ietekme uz vēža attīstību .....	10
1.3 Orgānu uz čipa tehnoloģija .....	13
2. Materiāli un metodes.....	17
2.1 Materiāli, reaģenti un iekārtas .....	17
2.1.1 Izmantotās šūnu kultūras .....	17
2.1.2 Materiāli .....	17
2.1.4 Reaģenti.....	21
2.1.5 Šūnu kultūru barotnes.....	22
2.2 Metodes .....	25
2.2.1 Darba drošības tehnika .....	25
2.2.2 Šūnu kultūru uzsākšana .....	25
2.2.3 Šūnu kultūras barotnes maiņa.....	26
2.2.4 Šūnu kultūras pasāžas maiņa .....	26
2.2.5 Šūnu skaitīšana ar <i>Gorjajeva</i> kameru.....	28
2.2.6 Šūnu kultūru iesaldēšana .....	28
2.2.7 Orgānu čipa sagatavošana darbam .....	29
2.2.8 Orgānu uz čipa sistēmas saslēgums.....	30
2.2.9 Orgānu čipa funkcionalizēšana ar ārpusšūnu matricu (ECM – <i>extracellular matrix</i> ).....	31
2.2.10 Orgānu čipa funkcionalizēšana ar šūnu kultūrām.....	32
2.2.11 Orgānu čipa barotnes maiņa .....	32
2.2.12 Barjeras integritātes novērtēšana ar <i>Cascade blue</i> testu.....	33
2.2.13 Orgānu čipa fiksēšana un krāsošana ar antivielām un DAPI .....	34
2.2.14 Zarnu anaerobās mikrobiotas izdalīšana no fēču paraugiem.....	35
2.2.15 Mikrobiotas uzsēšana uz orgānu čipa.....	35
2.2.16 Dzīvo/mirušo baktēriju iezīmēšana .....	36
2.2.17 Izmēru izslēgšanas hromatogrāfija.....	37
2.2.18 Izdalīto frakciju raksturošana ar ZetaSizer.....	38
2.2.19 Izdalīto EV frakciju koncentrēšana .....	39
2.2.20 EV kvantificēšana ar nanodaļiņu izsekošanas iekārtu (NTA).....	39
3. Rezultāti .....	41
3.1 Zarnas uz čipa (GOC) modeļsistēmas izveide .....	41
3.2 Dzīvas anaerobas mikrobiotas izdalīšana un kultivēšana GOC .....	46

3.3 Dzīvas, anaerobas mikrobiotas kultivēšana GOC .....	51
3.4 EV izdalīšana un analīze no OSTE/COC GOC.....	54
4.Diskusija.....	57
5. Secinājumi.....	63
6.Pateicības .....	64
Literatūras saraksts.....	65

## Ievads

Zarnu mikrobiotai un tās produktiem ir kritiska ietekme uz cilvēka veselību, tā spēj ietekmēt dažādus cilvēka organisma fizioloģiskos procesus un disbioze (izmaiņas mikrobiotas sastāvā) korelē ar dažādu slimību, kā, piemēram, Alcheimera slimību, diabēta, reimatiskā artrīta un ļaundabīgu audzēju patoģenēzi (Cong & Zhang, 2018).

Ir veikti pētījumi, kuri pierāda, ka cilvēku asinīs ir atrodamas zarnu mikrobiotas RNS (Qian et al., 2018) un BEV (Bacterial extracellular vesicles) (Tulkens et al., 2020) un ka zarnu mikrobiotas izdalītajām BEV ir loma vēža patoģenēzē un progresēšanā (Lee, 2019). Taču cilvēka zarnu mikrobiota ir sarežģīti pētāms objekts, jo to nevar pētīt tradicionālajās *in vitro* modeļsistēmās tādēļ, ka 2D monoslāņu šūnu kultūras nespēj attēlot fizioloģiskos procesus, zarnu traktam raksturīgo morfoloģiju un struktūras, kā arī sistēmas ir statiskas un šūnu kultūra ātri aizaugtu ar baktērijām, kas noved pie šūnu nāves. Kamēr dzīvnieku modeļu pielietošana cilvēka mikrobiotas pētīšanai ir ļoti dārga un tehniski komplicēta (Qirui Wu u.c, 2020). Kā viena no perspektīvākajām metodēm cilvēka zarnu mikrobiotas pētniecībai ir zarnas uz čipa (GOC) modeļsistēmas, taču tā vēl nav pielietota tieši cilvēka anaerobās zarnu mikrobiotas izdalīto BEV pētīšanai (Tulkens et al., 2020).

Līdz ar ko, projekta ietvaros, kura laikā tika veikts šis darbs tiek izvirzīta hipotēze - mikrobiotas komunikācija ar saimniekorganisma šūnām notiek ar mikrobiotas sekretētajām BEV un ka tas ir kontrolēts process. BEV satura pētīšana ļautu atbildēt uz jautājumiem par mikrobiotas un saimniekorganisma savstarpējo iedarbību un to iespējamo potenciālu terapijā vai diagnostikā.

Tāpēc šī darba mērķis, lai izpētītu izvirzīto hipotēzi ir izveidot zarnas uz čipa modeli, kas ļautu kultivēt anaerobu cilvēka zarnu mikrobiotu izdalītu no fēču parauga.

Darba uzdevumi:

1. Zarnas uz čipa (GOC) *in vitro* modeļsistēmas izveide
2. GOC funkcionalizēšana ar Caco-2 un HUVEC stabilajām šūnu līnijām
3. Anaerobas mikrobiotas izdalīšanai no kuņģa vēža pacientu un veselu donoru fēču paraugiem
4. Anaerobas mikrobiotas kultivēšana, pielietojot GOC

Darba rezultātus autors prezentēja konferencē :

Anaerobās mikrobiotas kultivēšana, izmantojot zarnas uz čipa no COC/OSTE hibrīdpolimēra. Valērija Movčana, Roberts Rimša, Artis Galvanovskis, Jānis Plūme, Kārlis Grindulis, Arnita Spule, Fēlikss Rūmnieks, Vadīms Parfējevs, Gatis Mozoļevskis, Artūrs Ābols.

Starptautiskā LU 80. konference, molekulārās bioloģijas sekcija, Rīga, Latvija, 18.02.2022

# 1. Literatūras apskats

## 1.1 Cilvēka zarnu un zarnu mikrobiotas funkcijas

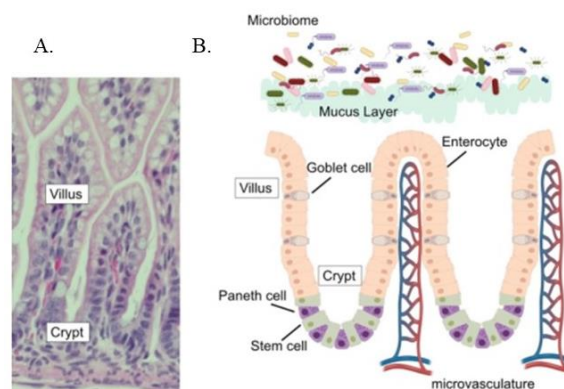
Cilvēka zarnu trakta garums var sasniegt pat 15 metrus un tas ietver cilvēka zarnu mikrobiomu, kas ir mikroorganismu gēnu kopums, kurš satur vairāk nekā 9 miljonus gēnu no aptuveni 100 triljoniem šūnu - gan prokariotiem, gan eikariotiem, gan vīrusiem (Cong and Zhang 2018). Cilvēka zarnu trakts ir viens no galvenajiem metabolisma jeb vielmaiņas regulatoriem, veicot tādas svarīgas funkcijas kā glikozes un lipīdu metabolismu, sintezējot vai degradējot dažādas taukskābes, triglicerīdus, kā arī holesterolu (Schoeler and Caesar 2019). Zarnu trakts piedalās arī vitamīnu uzņemšanā. Piemēram, cilvēka organisms nevar sintezēt tādus vitamīnus kā vitamīnu K un E. Šo vitamīnu uzņemšana notiek pateicoties uzņemtā ēdiena absorbcijai zarnās (Yamanashi et al. 2017).

Pats zarnu trakts sastāv no vairākām zarnu daļām. Tievā zarna iedalās līkumainajā, tukšajā un divpadsmitpirkstu zarnā (Collins, Nguyen, and Badireddy 2021), savukārt resnā zarna iedalās tuvajā, tālajā, S zarnā, taisnajā zarnā un resnās zarnas sākumā atrodas arī aklā zarna jeb apendikss (Kahai and lobo 2019).

Uzturvielu šķelšana un absorbcija ir tievās zarnas galvenā funkcija. Šķelšana un absorbcija sākas divpadsmitpirkstu zarnā (*duodenum*), cukuru, aminoskābju un taukskābju uzsūkšana turpinās tukšajā zarnā (*jejunum*), savukārt uzturvielas, kuras nav uzsūkušās divpadsmitpirkstu zarnā vai tukšajā zarnā, kā piemēram, B12 vitamīns, tiek uzsūktas līkumainajā zarnā (*ileum*) (Collins, Nguyen, and Badireddy 2021). Resnās zarnas primārās funkcijas ir ūdens un elektrolītu absorbēšana, kā arī fēču formēšanās un virzīšanās procesu koordinēšana (Azzouz LL et al., 2021).

Viena no svarīgākajām zarnu epitēlija veidotajām struktūrām ir bārkstiņu struktūras. Bārkstiņu un mikrobārkstiņu struktūras ir unikālas struktūras, lai nodrošinātu virsmas laukuma palielināšanos zarnās (Kwon et al., 2020). Vēl viena svarīga zarnu epitēlija veidota struktūra ir kripti. Zarnu epitēlijs ir sakārtots bārkstiņu un kriptu struktūru veidojošās vienībās (1A un 1B attēls). Kriptu veidojošās šūnas ir nepārtraukti dalošas cilmes šūnas, kas nodrošina zarnu epitēliju veidojošo šūnu tipu diferencēšanos (Bonis et al., 2021). Kriptu, bārkstiņu un mikrobārkstiņu struktūras ir vitāli svarīgas zarnu funkcionalitātei.

Zarnu epitēlijs satur vairāku tipu šūnas, kuras iedala absorbējošās un sekretējošās šūnās (1B attēls).



1.attēls. A – Zarnu bārskstiņu immunohistoloģija ar hematoksilīna un eozīna (H&E) iezīmi. B – Shematiska kripta, bārstiņu struktūras un to veidojošo šūnu attēlošana (Lueschow and McElroy 2020).

Figure 1. A – Immunohistology of intestinal vilus and cript H&E stained. B – Schematic repreration of vilus, crypt structures and epithelial cell types (Lueschow and McElroy 2020).

Sekretējošai šūnu grupai pieder Paneta šūnas, enteroendokrīnās šūnas un kausiņu šūnas (*Goblet cells*) (Noah, Donahue, and Shroyer 2011). Paneta šūnas sekretē anti- mikroorganismu peptīdus, kā, piemēram, lizocīms, kas ir viens no proteīniem, kas sastopams Paneta šūnu sekretētajās granulās. Šīs granulas tiek izvadītas zarnu lūmenā un tālāk šīs molekulas var difundēt uz gļotādas slāni, kurš pārklāj gļotādas epitēliju. Tālāk tiek veicināta gļotādas anti- mikroorganismu barjera, tādējādi Paneta šūnu funkcija ir ne tikai sekrēcija, bet arī mikrobiotas līdzsvara un kompozīcijas regulācija, kā arī aizsargfunkcija pret iespējamo patogēnu iekļūšanu zarnu trakta vidē (Lueschow and McElroy 2020). Kausiņu šūnu funkcija ir līdzīga iepriekš minēto Paneta šūnu funkcijām - sekrēcija un aizsargfunkcija, taču jāņem vērā, ka kausiņu šūnu aizsargfunkcija tiek īstenota, pateicoties izdalītajām gļotām un sekretētajam mucīna glikoproteīnam MUC2 (Gribble and Reimann 2016), kas ir kausiņu šūnu visvairāk sekretētais mucīna tips, taču tiek espresēti arī citi, kā MUC1, MUC3, MUC5AC, MUC17(Y. S. Kim & Ho, 2010; Pelaseyed et al., 2014). Enteroendokrīnās šūnas atrodas kuņģa-zarnu traktā sākot no kuņģa līdz pat taisnajai zarnai, šīs sekrēcijas šūnas atbild par signālmolekulu sekrēciju. Tās spēj atbrīvot hormonus, piemēram serotonīnu, kurš spēj kontrolēt uzņemtā ēdiena daudzumu un kontrolēt insulīna izdalīšanos (Gribble and Reimann 2016). Sekretējošās šūnas veic sekrēciju atkarībā no atrašanās vietas kriptu struktūrās, šis faktors nosaka arī cilmes šūnu diferenciācijas brīdi, virzoties uz augšu pa bārskstiņu struktūru (Umar 2010). Cilmes šūnas ir svarīgas bārskstiņu struktūru atjaunošanai un bez kripta struktūras tas nebūtu iespējams, jo tieši kripta iekšienē cilmes šūnas nepārtraukti dalās un rada jaunas cilmes šūnas, ko nosaka noteikta šūnu atrašanās vieta 3D struktūrā kopā ar Paneta šūnām, kas tālāk kļūst par zarnu epitēliju veidošajām šūnām, piemēram, enterocītiem, enteroendokrīnajām vai kausiņu šūnām virzoties uz augšu pa bārskstiņu

struktūru, kamēr Paneta šūnas diferencējas jau kripta bāzē (Shaker & Rubin, 2010). Kā absorbējošais šūnu tips ir enterocīti līdz ar to tā funkcija ir barības vielu absorbcija zarnu traktā, kas arī ir viena no svarīgajām funkcijām, ko veic cilvēka zarnu trakts. Protams, lai šī absorbcija spētu notikt svarīgi ir enterocītu kataboliskie enzīmi (laktāze u.c), kas ir svarīgi molekulu sadalīšanā, lai tās tiktu absorbētas. Enterocītu izdalītie kataboliskie enzīmi šķēļ vienkāršos cukurus, peptīdus, lipīdus un citas vielas (Noah, Donahue, and Shroyer 2011).

Bārkstiņu struktūras ir svarīgas, jo tās ne tikai būtiski palielina zarnu virsmas laukumu absorbcijai, bet starp tām esošo gļotu slāni apdzīvo zarnu mikrobiota (Gehart and Clevers 2019). Mikrobiota palīdz veikt tādas vitāli svarīgas funkcijas kā nesagreojamu pārtikas sastāvdaļu sadalīšanu metabolītos, cilvēka zarnu sistēmai absorbējamā veidā (Heintz-Buschart and Wilmes 2018). Bārkstiņu struktūras ir raksturīgas tieši tievajai zarnai, resnajā zarnā tādu nav, taču resnajā zarnā veidojas mikrobārkstiņu struktūras un galvenokārt kripi, kur tiek sintezēti mucīni un veidojas mikrobiotai piemēroti apstākļi un gļotu slānis (Robert J. Washabau and Michael J. Day, 2013)

95% cilvēka mikrobiotas atrodas zarnās un lielākā daļa kopējās zarnu trakta mikrobiotas kolonizē tieši resno zarnu, taču mikrobiota variē atkarībā no zarnas vietas (Kastl et al. 2020). Resnā zarna satur aptuveni  $10^{12}$  šūnu uz gramu zarnu satura, kamēr tievā tikai  $10^3$  līdz  $10^8$  šūnu uz gramu zarnu satura (Scheithauer et al., 2016).

Arī mikrobiotas fermentācijas produkti, piemēram īso ķēžu taukskābes, ir ļoti būtiski substrāti zarnu šūnām un ar tiem saista T-šūnu diferenciaciju (Heintz-Buschart and Wilmes 2018). Lielākā daļa T-šūnu atrodas audos, kurus kolonizē mikroorganismi, tās atrodamas gan zarnu epitēlijā, plaušu epitēlijā, kā arī ādas epidermā (Dumauthioz, Labiano, and Romero 2018). Zarnās atrodamās T-šūnas satur T-šūnu receptorus, kas spēj reaģēt uz mikroorganismu antigēniem, kas veicina zarnu homeostāzi un novērš sistēmisku iekaisumu veidošanos (Heintz-Buschart and Wilmes 2018).

Zarnu mikrobiota var atšķirties atkarībā no etniskās piederības, ģeogrāfiskā novietojuma, kā arī cilvēka dzīvesveida un vecuma. Kā arī mikrobiota mainās grūtniecības laikā un zīdaiņiem augot (Cong and Zhang 2018). Veselīga cilvēka zarnu mikrobiota sevī ietver mikroorganismu ģintis kā *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *the Verrucomicrobia Akkermansia* un *Methanobrevibacter smithii*, līdz ar to citas dažādas mikroorganismu sugas mikrobiotā var izraisīt un ietekmēt konkrētas veselības problēmas. Piemēram, pārāk liels *Clostridia* daudzums var liecināt par resnās zarnas vēzi (Dominguez-Bello et al. 2019).

Veselīgā tievo un resno zarnu gļotādā, lūmenā zarnu epitēlijs ir pakļauts “fizioloģiskajai hipoksijai” jeb stāvoklim, kur  $PO_2 < 10$  mmHg. Bārkstiņu struktūru pamatne tievajās zarnās ir piesātināta ar skābekli, savukārt bārkstiņu struktūru apikālā daļa ir hipoksiska. Skābeklis no artērijām izkliedējas gar blakus esošās vēnulas asi, radot pakāpenisku skābekļa līmeņa samazināšanos un nodrošinot skābekļa gradienta samazināšanos virzienā uz resno zarnu, līdz ar to resno zarnu apdzīvo triljoniem stingri anaerobo mikroorganismu (Zheng et al., 2015). Šīs skābekļa atšķirības nodrošina mikrobiotas daudzveidību dažādās zarnu daļās atkarībā no to skābekļa tolerances. Kā arī hipoksiskā vide lūmenā ir kritiski nepieciešama normālai zarnu funkciju darbībai, piemēram, uzturvielu uzsūkšanās procesam. Hipoksiju zarnās regulē HIF transkripcijas faktori, kurus kodē aptuveni 500 gēnu ekspresija, kas nodrošina, piemēram, gļotu veidošanos un antimikrobiālu proteīnu sintēzi (Konjar et al., 2021).

Mikroorganismu dažādība un tās līdzsvars ir kristiski svarīga veselas cilvēka mikrobiotas pazīme. Disbioze ir izjaukts mikrobiotas līdzsvars. Bieži tās ir mikrobiotas daudzveidības izmaiņas un oportūnistisko patogēnu skaita palielināšanās (Thursby and Juge 2017). Oportūnistiski patogēni var pielāgoties pacienta veselības stāvoklim jeb tie ir mikroorganismi, kuri var kļūt par oportūnistiskiem patogēniem, piemēram, ja cilvēka organisms ir novājināts, slimību gadījumos, infekciju, pēc antibiotiku terapijas vai imūndeficīta gadījumā. Tie var parādīties, piemēram, no cilvēka organismam raksturīgiem mikroorganismiem kā, piemēram, *Streptococcus* (Brown, Cornforth, and Mideo 2012).

Mikrobiotas disbioze un tās pārņemšana ar oportūnistiskajiem patogēniem, piemēram, *Enterococcus* ģints mikroorganismiem bieži ir sastopama hroniska pankreatīta gadījumā. Pankreatīta gadījumā oportūnistiskie patogēni savairojas tieši brīdī, kad tas palicis hronisks un organisms ir novājināts. Tā kā šie oportūnistiskie patogēni mikrobiotā ir vairākumā un ir zarnu disbioze, tie netraucēti var nokļūt citās zarnu trakta vietās un turpināt vairoties, kas tālāk var novest pie citu slimību veidošanās (Frost et al. 2020).

## 1.2 Mikrobioma ietekme uz vēža attīstību

Disbioze ir iesaistīta arī dažādu audzēju, kā kuņģa, zarnu, krūts, aizkuņģa dziedzera attīstībā un korelē ar tā malignitāti (Sheflin, Whitney, and Weir 2014).

Izmainīta zarnu mikrobiota ir iesaistīta galvenajos kancerogēnēzes posmos, audzēju veicinošā iekaisumā, izmainītā imūnreakciju atbildē, angiogēnēzē, audzēja augšanā un attīstībā, kā arī kancerogēnu metabolītu veidošanā. Zarnu disbioze veicina arī patogēno mikroorganismu sugu invāziju un augšanu, līdz ar to traucē gļotādas barjeras homeostāzi (Nasr et al., 2020).

Pacientiem ar resnās zarnas vēzi bieži ir konstatēta mazāka mikroorganismu daudzveidība un *Clostridia* ģints mikroorganismu pārpilnība, kas līdz ar to tiek identificēts kā viens no iespējamajiem cēloņiem šī vēža attīstībā (Cong and Zhang 2018). Mikrobiotas korelācijā ar resnās zarnas vēzi svarīgs ir arī *Streptococcus* mikroorganismu palielināts daudzums mikrobiotā, kas nozīmē risku saslimt ar resnās zarnas vēzi, piemēram, *Streptococcus bovis* infekcijas gadījumā (Cong and Zhang 2018). Kā arī pētījumā ar pacientiem, kuriem ir konstatēts resnās zarnas vēzis ir redzama šī sakarība, jo iegūtajos audzēja audos *Streptococcus gallolyticus* skaits ir lielāks nekā normālā zarnu epitēlija gļotādā. Šobrīd nav zināms kā šī korelācija tieši ietekmē resnās zarnas vēža veidošanos (Alhina, Walton, and Commane 2019).

Kamēr zarnu disbioze un gastrointestinālo vēžu veidošanās korelācijas var būt skaidrojamas ar tiešu mikroorganismu mijiedarbību starp saimniekorganismu šūnām, tad citu audzēju veidošanās procesā iespējami ir iesaistīti citi procesi. Kā viens no tiem varētu būt zarnu-smadzeņu ass jeb *Gut-brain axis* komunikācija, kas notiek, pateicoties baktēriju atvasinātajiem starpproduktiem, tādiem kā īso ķēžu taukskābes, sekundārās žultskābes un triptofāna metabolīti. Tie var izplatīties šķērsojot zarnu barjeru, nokļūstot kopējā cirkulācijā. Ir iespējama arī asins-smadzeņu barjeras šķēršošana. Ja ir konstatēta asins-smadzeņu barjeras disfunkcija tie spēj iekļūt smadzeņu audos, kas izraisa neiroloģiskus bojājumus un var veicināt neurodeģeneratīvu slimību kā Alzheimeras slimības veidošanos, jo šīs barjeras galvenā funkcija ir novērst neirotoksisku komponentu un patogēnu iekļūšanu smadzenēs, kā arī regulēt molekulu iekļūšanu centrālajā nervu sistēmā, uzturot kontrolētu neironu vides ķīmisko sastāvu (Nation et al. 2019).

Zarnu-smadzeņu ass nav vienīgā ar ko saista mikrobiotas un slimību veidošanās korelāciju. Mikrobiotas ietekmē uz vēža attīstību svarīga ir arī *Gut-cancer axis*. *Gut-cancer axis* saziņas ceļā svarīgi ir zarnu mikrobiotā esošie mikroorganismi, kas veicina kancerogēni, izmantojot toksiskus metabolītus. Kancerogēnie baktēriju metabolīti var rasties no nesadalīta uzņemtā ēdiena vai no tieši ražotiem toksīniem, kā dažādi lipopolisaharīdi vai aknu-žults metabolīti. Uzturam ir liela ietekme uz kancerogēnu veidošanos un to tālāko ietekmi. Piemēram, žultskābes, kuras nav tikušas absorbētas kaitē baktēriju šūnu sienīgai un aizsargājoties baktērijas pārveido šīs žultskābes, piemēram holskābi par dezoksiholskābi, ko tieši asociē ar kancerogēni (Javed et al. 2020).

Zarnu mikrobiotas disbioze ir cieši saistīta arī ar kuņģa vēža patogēni. Kuņģa vēža pacientiem novērota mikrobiotas disbioze un palielināts *Peptostreptococcus stomatitis*, *Streptococcus anginosus* u.c mikroorganismu skaits, lai gan nevar zināt, kuri konkrētie baktēriju celmi ir iesaistīti kancerogēnēzē, jo ir atsevišķi baktēriju celmi, kuri var būt pārejoši

un nav ilgstoši sastopami zarnu mikrobiotas sastāvā (Liu et al., 2021).

Šobrīd tiek pētīta arī estrogēna korelācija ar krūts vēža attīstību un mikrobioma ietekme uz estrogēna metabolismu. Ir zināms, ka hormona estrogēna līmenis korelē ar krūts vēža veidošanos un attīstību. Vienā no pētījumiem pacientiem, kuri saņēma ampicilīnu ievērojami palielinājās konjugēto estrogēnu daudzums fēcēs. Tas izceļ zarnu mikrobiotas ietekmi uz estrogēna metabolismu, kas liecina, ka modificējot cilvēka zarnu mikrobiotu var ietekmēt arī krūts vēža patoģenēzi (J. Chen et al. 2019)

Kā papildus viens no mehānismiem un organoīdiem, kas ir iesaistīts strapšūnu komunikācijā un kaceroģenēzē, tai skaitā starp mikrobiotu un saimniekorganisma šūnām ir ārpusšūnu vezikulas (EV). Ārpusšūnu vezikulas (EV) izdala visi trīs dzīvības domēni — eikarioti, baktērijas un arheji (Yang et al. 2018).

Tā kā arvien vairāk tiek pētīta mikrobiotas funkcionālā nozīme slimību progresēšanā svarīgi ir pievērst uzmanību arī mikrobiotas sekretētajām EVs. Baktērijas izdala ārpusšūnu vezikulas jeb BEV — sfēriskas membrānas apvalka daļiņas, kuru izmērs ir no 20 līdz 400 nm, kas izplata daļu no sākotnējās baktērijas bioloģiskā satura ekstracelulārajā vidē. BEV pārvadā dažādas molekulas, tostarp ar membrānām saistītus un periplazmas proteīnus, fermentus (piemēram, autolizīnus), toksīnus, polisaharīdus, nukleīnskābes (DNS un RNS) un peptidoglikānus (Toyofuku et al., 2019).

BEV nevar atdalīt no eikariotu izdalītajām EV, jo tās pārklājas izmēros, kā arī BEV ir pārāk heterogēnas sastāvā, jo nāk no dažādiem bioģenēzes ceļiem, baktēriju celmiem un augšanas apstākļiem (Toyofuku et al., 2019).

BEV, ko izdala baktērijas zarnu lūmenā, var šķērsot epitēlija barjeru un spēj mijiedarboties ar dažādām imūno šūnu populācijām (dendrītiskajām šūnām, neitrofilēm un makrofāģiem), kā arī potenciāli izplatīties plašāk ķermenī ar sistēmisko vai limfātisko cirkulāciju, lai sasniegtu attālus audus un orgānus vai pat smadzenes (Chronopoulos & Kalluri, 2020).

Literatūrā šobrīd daudz informācijas par šiem mehānismiem nav pieejamas, kas būtu skaidrojams ar šo procesu apgrūtināto pētīšanu. Pašreizējie *in vitro* modeļi nav piemēroti zarnu fizioloģijas, zarnu mikrobiotas un BEV pētīšanai, jo tie nespēj attēlot zarnu patieso morfoloģiju, piemēram, bārktīņu struktūru un kriptu veidošanos, kas ir vieta, kur kolonizē zarnu mikrobiota. Līdzšinējās modeļsistēmas ir statiskas, kas ne tikai ierobežo zarnu 3D morfoloģijas veidošanos, bet arī neļauj kultivēt zarnu mikrobiotu, jo sistēmas aizaugtu ar baktērijām, kas novestu pie šūnu nāves dažu stundu laikā. Jāmin, ka ļoti svarīga šajā kontekstā ir zarnu-asins barjeras veidošanās, kas ir viens no potenciālajiem mehānismiem kā ārpusšūnu vezikulas nonāk cirkulācijā un iesaistas onkoģenēzes procesos. Līdzšinējie modeļi nespēj atdarināt zarnu-asins barjeru, kas izvirzītās

hipotēzes pētīšanā ir ļoti svarīgi, lai redzētu kā mikrobiotas BEVs nokļūst kopējā cirkulācijā. Runājot par citām modeļsistēmām un dzīvnieku modeļiem, jāmin fakts, ka mūsdienās vairāk uzmanību vērš uz 3Rs (*replacement, reduction, refinement*) eksperimentu principiem kā pēc iespējas samazināt dzīvnieku izmantošanu eksperimentos. Trīs principi ir (1) aizvietošana jeb apzinīga augstāko dzīvnieku aizstāšana ar citu eksperimenta modeļsistēmu, (2) samazināšana – dzīvnieku skaita samazināšana informācijas iegūšanas nolūkos, (3) pilnveidošana – nehumānu procedūru smaguma samazinājums dzīvniekiem, kuri joprojām tiek izmantoti eksperimentos (Hubrecht and Carter 2019).

Šī brīža pielietojamo modeļu ierobežojumi un trūkumi aprakstīti 1.tabulā. Tabulā minēto iemeslu dēļ, būtu nepieciešams pētīt šos procesus alternatīvās *in vitro* modeļu sistēmās.

1.tabula Līdzšinējo *in vitro* modeļu trūkumi un ierobežojumi.

Table 1 Disadvantages and limitations of *in vitro* models.

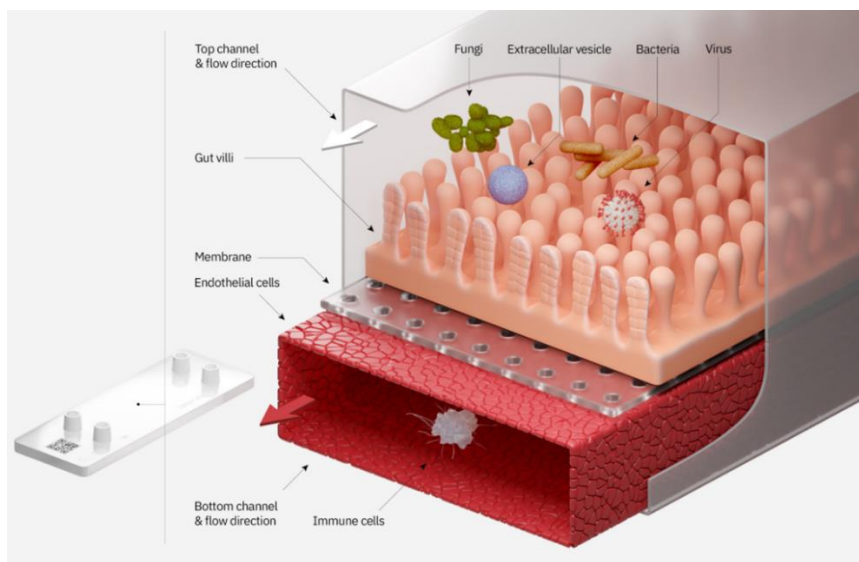
Modeļi	Trūkumi un ierobežojumi
Šūnu līnijas (Caco-2, HUVEC)	2D šūnu līniju kultūras ir statiskas un neattaino <i>in vivo</i> procesus, Augšana šūnu matracī neparāda šūnu patieso morfoloģiju un šūnu fizioloģisko mijiedarbību,  (Al-Lamki, Bradley, and Pober 2017)
Dzīvnieku modeļi	Dārgas izmaksas, 3Rs principi, Filoģenētiskas sugu atšķirības, bieži rezultāti ir neprezentatīvi, jo neattaino cilvēka fizioloģiju.  (Qirui Wu u.c.,2020)
Ex vivo kultūras	Ļoti īss kultivēšanas laiks, līdz 5 dienām Dārgs un grūti iegūstams paraugs, jo nāk no operācijas materiāliem Liela variabilitāte starp paraugiem  (Pearce et al. 2018)
Organoīdi	Trūkst sekundāro audu, kas būtu nozīmīgi šūnu komunikācijā, līdz ar to nevar veidot zarnu-asins barjeru, jo nav epitēlija/endotēlija komunikācija Tiek audzēti statiskā vidē, Grūti izveidot uz āru vērstu epitēlija apikālo virsmu, kamēr uz iekšu vērstai ir grūti piekļūt (Al-Lamki, Bradley, and Pober 2017). Epitēlijs tiek kultivēts bez savas dabīgās mikrovides (May et al., 2017)

### 1.3 Orgānu uz čipa tehnoloģija

Orgāni uz čipa (OOC) ir mikrofluīdikas šūnu kultūru sistēmas, kas tiek arvien plašāk pielietotas dažādiem bioloģiskiem pētījumiem (Qirui Wu u.c, 2020).

Mikrofluīdikas sistēma ir ierīce, kas nodrošina šķidrums plūsmu caur mikročipu, kurš satur mikrokanālus (Kimura, Sakai, and Fujii 2018). Orgānu čipa kanālos tiek audzētas dažādas šūnu kultūras un tā ir alternatīva citām *in vitro* pētīšanas metodēm. Pateicoties mikrofluīdikas sistēmai, ir iespējams kontrolēt vidi, kurā atrodas šūnas, mainot koncentrācijas gradientu un sūnbīdes radīto mehānisko stresu. Piemēram, atveidojot sūnbīdes radīto mehānisko stresu mikrokanālos ir iespējams attēlot stresu, kāds ir zarnu lūmenā un kapilāros, kuri nodrošina asins piegādi zarnu traktam *in vivo* (Qirui Wu u.c, 2020). Šo metodi var izmantot dažādu šūnu kultivēšanai un pētīt vairākas orgānu sistēmas, piemēram, plaušu, zarnu, aknu, nieru, sirds u.c (Qirui Wu u.c, 2020). Šī darba ietvaros tiks pētīti tieši zarnu un asinsvadu barjeras audi. Atsaucoties uz darba mērķi tiek veidots orgānu čips, kura viens kanāls satur endotēlija, otrs zarnu epitēlija šūnas, tādējādi veidojot zarnu-asins barjeru (2.attēls). Mikrokanāli savā starpā tiek atdalīti ar porainu membrānu, nodrošinot abu šūnu līniju komunikāciju un barjeras veidošanos (Yang et al. 2018).

Kultivējot šūnas OOC ir iespējams novērot zarnām raksturīgo morfoloģiju – bārkstiņu un kriptu struktūru veidošanos (Yang et al. 2018). Bārkstiņu struktūras veidojas, pateicoties mehāniskiem stimuliem, piemēram, plūsmas radītam stresam. Mikročipa kanālos esošā plūsma aizskalo DKK-1 (Dickkopf-1) inhibitoru, ko šūnas ražo kā autokrīno signālu. DKK-1 ir inhibitors Wnt signālceļam, kas ir nepieciešams zarnu struktūru veidošanās procesam. Pētījumos ir pierādīts, ka kultivējot Caco-2 jeb kolorektālās adenokarcinomas šūnu līniju DKK-1 klātbūtnē tiek inhibēta 3D šūnu struktūru veidošanās un diferenciacija (Creff et al., 2021), ko nosaka diferenciacijas marķieru kā Villin ekspresijas palielināšanās vai samazināšanās. Atjaunotot plūsmu 3D šūnu augšana tiek atsākta jau pēc 24h, pateicoties aizskalošajai antagonista funkcijai (Shin et al., 2019). Caco-2 šūnu līnijas kultivēšana zem plūsmas veicina arī mucīna sekrēciju (Shim et al. 2017). Lai gan bārkstiņu struktūras sastopamas tikai tievajā zarnā, resnajā zarnā veidojas tām līdzīgas struktūras jeb mikrobārkstiņas, un ir sastopami arī kripti un mucīna sekrēcija (Robert J. Washabau and Michael J. Day, 2013) Starp bārkstiņu struktūrām esošais gļotu slānis ir vieta, kur kolonizē baktērijas un ir sastopamas to izdalītās BEVs (2.attēls) (Gehart and Clevers 2019).



2attēls. Shematiska GOC ilustrācija.

Figure2. Schematic illustration of GOC.

Par galvenajām OOC priekšrocībām tiek uzskatīta nepārtraukta plūsmas nodrošināšana un iespēja kontrolēt vidi, 3D šūnu struktūru veidošanās un orgānu raksturīgās *in vivo* morfoloģijas attēlošana *in vitro*, šūnu kokultivēšana un barjeras veidošanās, mikrobiotas kultivēšanas iespējas (May et al., 2017). Ņemot vērā OOC tehnoloģiju priekšrocības, kā arī iepriekš aprakstītos trūkumus citām *in vitro* modeļsistēmām OOC ir laba alternatīva šīm modeļsistēmām un tiks izmantota darba ietvaros.

OOC modeļu kultivēšanā svarīgākais instruments ir mikrofluīdikas sistēmas, kas spēj nodrošināt šķidrums plūsmu mikročipa kanālos vairākos veidos, tie iedalās aktīvos un pasīvos.

Kā aktīvie plūsmas nodrošināšanas veidi ir peristaltiskie sūkņi, spiediena sistēmas un šļirces sūkņi, kā pasīvie ir, piemēram, gravitācija vai hidrostatiskais spiediens. Aktīvie plūsmas nodrošināšanas veidi tiek izmantoti biežāk, un galvenokārt visas orgānu uz čipa sistēmas balstās un šļirces sūkņiem, peristaltiskajiem sūkņiem vai spiediena sistēmām, katrai sistēmai ir savas priekšrocības un trūkumi, kas ir apkopoti 2.tabulā, balstoties uz iepriekšējiem pētījumiem (Garcia et al., 2018), (Schneider et al., 2021) un mikrofluīdikas iekārtu ražotāju apkopojumiem (<https://www.mimetas.com/en/our-technology/>, <https://www.fluigent.com/resources-support/expertise/expertise-reviews/what-is-microfluidics/comparison-between-peristaltic-syringe-and-pressure-pumps-for-microfluidic-applications/>).

2.tabula  
Aktīvo mikrofluīdikas sistēmu priekšrocības un trūkumi.

Table 2  
Actively-driven microfluidic system advantages and disadvantages.

	Rocket perfusion	Šļirces sūkņi	Peristaltiskie sūkņi	Spiediena sistēmas
Viegli lietot	++++	+++	++	+
Nēpārtraukta plūsma	-	+++	+	++++
Plašs plūsmas ātruma spektrs	+	++++	++++	++++
Piemērots inkubatoram	++++	++	++	++
Neietekmē cirkulējošās šūnas	++++	+	-	+
Izmaksas	++++	+++	++	+

Līdz šim ir pieejamas arī dažādas iekārtas GOC kultivēšanai, izplatītākās OOC iekārtas GOC kultivēšanai ir veidotas no polidimetilsiloksāna (PDMS), jo tas ir vieglāk prototipējams (Lamberti et al., 2014). Šī darba ietvaros tiek veidots un pārbaudīts jauns modelis, kas veidots bez PDMS polimēra, izmantojot OSTE (*Off-Stoichiometry Thiol-Ene*) un COC (*Cyclic olefin copolymer*) polimērus, kas ir potenciāli labāki mikrobiotas pētniecībai, jo neabsorbē mazās molekulas un nodrošina skābekļa gradienta veidošanos un anaerobus apstākļus (Rimsa et al., 2021). Bez PDMS polimēra iekārtām ir daudz vairāk priekšrocību salīdzinājumā ar PDMS iekārtām galvenokārt, jo PDMS ir gāzu caurlaidīgs materiāls (Lamberti et al., 2014) un gāzu necaurlaidība konkrēti šim eksperimentam ir ļoti svarīga, pretējā gadījumā nav iespējams izveidot nepieciešamo skābekļa gradientu starp epitēlija un endotēlija kanāliem anaerobas mikrobiotas kultivēšanai GOC (Konjar et al., 2021), kā arī PDMS ir liela mazo molekulu absorbcija. Viens no veidiem kā zarnu mikrobiota spēj ietekmēt cilvēka fizioloģiju un slimību patogēnēzi ir netikai ar BEV, bet arī ar dažādiem metabolītiem un hormoniem līdzīgām bioaktīvām molekulām kā reaktivētiem estrogēniem, īso ķēžu taukskābēm un litoholskābēm (Chen et al., 2021) un ņemot vērā lielo PDMS polimēra mazo molekulu absorbcijas īpašības, tas nav piemērots mikrobiotas analīzei. Bez PDMS polimēra OOC iekārtas izveidošana ļautu īstenot darba mērķi un uz izveidotās GOC modeļsistēmas ļautu kultivēt no fēču paraugiem iegūto anaerobo mikrobiotu.

## 2. Materiāli un metodes

### 2.1 Materiāli, reaģenti un iekārtas

#### 2.1.1 Izmantotās šūnu kultūras

##### Caco-2 (ATTC kods – HTB-37)

Šūnu līnija iegūta no *American Type Culture Collection*, ASV (ATCC). Tā ir cilvēka resnās zarnas kolorektālās adenokarcinomas epitēlija šūnu līnija, kas iegūta no vīrieša. Šūnu dubultošanās laiks ir aptuveni 62 stundas. Šūnu kultūras audzēšanai izmanto 5. tabulā esošās barotnes sastāvu.

##### HUVEC (ATTC kods – CRL-1730)

Šūnu līnija iegūta no *American Type Culture Collection*, ASV (ATCC). Tā ir cilvēka nabas saites asinsvadu endotēlija šūnu līnija, kas iegūta no vīrieša. Šūnu dubultošanās laiks ir aptuveni 27 stundas. Šūnu kultūras audzēšanai izmanto 6. tabulā esošās barotnes sastāvu.

#### 2.1.2 Materiāli

3.tabula  
Materiāli

Table 3  
Materials

Kriostobri	CryoPure Tube with Internal Thread and Print, Yellow Cap Assembled, 1.6ml	Sarstedt, Vācija
1,5ml mikromēģenes	Eppendorf safe-lock micro test tubes 1.5ml	Eppendorf, Austrija
15 ml stobriņi	Sarstedt Inc Tube 15 ml	Sarstedt, Vācija
50 ml stobriņi	Sarstedt Inc Screw Cap Tube, 50ml	Sarstedt, Vācija
40 μm filtri	Bioswistec premium cell strainer, 40 μm	Bioswistec AG, Šveice
Nitrila cimdi	Mitrylex® beFree long	MERCATOR MEDICAL SA, Polija
Mikropipetes uzgaļi ar filtru	Biosphere Filter Tips, 1000 μL	Sarstedt, Vācija
	Biosphere Filter Tips, 200 μL	Sarstedt, Vācija
	Biosphere Filter Tips, 10 μL	Sarstedt, Vācija
1 ml medicīnas šļirce	Injekt®-F Fine dosage syringe. Size = 1ml. graduation intervals 0.01ml. made of polypropylene/polyethylene. green plunger. box of 100pcs sterile	B Braun, Vācija

Šūnu kultūru saldēšanas kastīte ar izopropanolu	Mr.Frosty™Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, ASV
Seroloģiskās pipetes	5 ml serological pipette	Sarstedt, Vācija
	10 ml serological pipette	Sarstedt, Vācija
	25 ml serological pipette	Sarstedt, Vācija
Pipešu dozators	S1 pipett filler	Thermo Fisher Scientific, ASV
Papīra lenta	Masking tape Spino 60°C 48mmx50m, white paper	Multipack, Latvija
96 bedrīšu plates adherentai šūnu audzēšanai ar pārklājumu	Corning® 96-well Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC-treated Microplates	Corning Life Sciences, Nīderlande
Caurule mikrofluīdīkai no PTFE	PTFE Tubing spare roll, iekšējais diametrs 1/32, ārējais 1/16	Darwin Microfluidics, Francija
Caurule mikrofluīdīkai no poliuretāna poliētera	Polyurethane PU Tubing, iekšējais diametrs 2.5mm, ārējais 4mm	Darwin Microfluidics, Francija
PTFE blīvējošā lenta	PTFE sealing tape	Darwin Microfluidics, Francija
Manuāls vārsts PEEK caurulēm	Shut-off-valve	Darwin Microfluidics, Francija
Mikrofluīdikas portu aizsprosts	Microfluidic plugs, 1/4 "28 vītne	Darwin Microfluidics, Francija
Mikrofluīdikas savienojumi ar 1/4 "28 vītņi paradzēti 1/16" caurulēm	Microfluidic Fittings 1/4"-28 Kit to 1/16"	Darwin Microfluidics, Francija
Skrūvējams vāciņš mikrofluīdikas cauruļu pievienošanai ar 3 izejām	Microfluidic Reservoir for 50 mL Falcon Tube	Darwin Microfluidics, Francija
Cinkotas skrūves	Head Bolt Zinc-Plated Steel M 4 x 10	SUKI international GmbH, Vācija
Filtrs 0.02µm	Whatman Anotop 25mm Syringe Filter 0,02 µm	GE healthcare life sciences, ASV
Mikrofluīdikas šļircu adatas ar tupu galu	Blunt-end Luer Lock Syringe Needles	Darwin Microfluidics, Francija
Orgānu uz čipa un vārstu turētājs	Veidots no ABS un PMMA polimēriem, satur 3 daļas	Latvijas universitātes Cietvielu uz fizikas institūts, izgatavojis Roberts Rimša
PDMS orgānu čips	Dubulkanālu PDMS polimēra orgānu čips 4 orgāniem	Latvijas universitātes Cietvielu uz fizikas institūts
OSTE/COC orgānu čips	Dubulkanālu OSTE/COC polimēra orgānu čips 4 orgāniem	Latvijas universitātes Cietvielu uz fizikas institūts
Plūsmas sadalītājs ar 1 ieeju un 4 izejām, paredzēts PEEK 1/16" savienojumiem	Manifold 5 port	Darwin Microfluidics, Francija

8 šļirču metāla adapteris	Paredzēts 8 šļirču ievietošanai šļirces sūkņī	Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Jānis Ziemeļis
Vakuuma filtrācijas iekārta, 0,2µm 500mL	Filtropur V50, Vacuum filtration unit 500 ml, PES, 0,2µm	Sarstedt, Vācija
Papīra salvetes	Hand towel roll S2	Katrin, Somija
Parafilma	Parafilm M	Bemis flexible packaging, ASV
Koncentrēšanas filtru stobriņi	Amicon Ultra 3k 0.5 mL Centrifugal Filters	Merck Millipore Ltd., Vācija
	Amicon Ultra 100k Centrifugal Filters	Merck Millipore Ltd., Vācija
Mikropipetes	Eppendorf Micropipete 1000 µl	Sigma-Aldrich, ASV
	Eppendorf Micropipete 200 µl	Sigma-Aldrich, ASV
	Eppendorf Micropipete 100 µl	Sigma-Aldrich, ASV
	Eppendorf Micropipete 20 µl	Sigma-Aldrich, ASV
	Eppendorf Micropipete 10 µl	Sigma-Aldrich, ASV
Šļirces divdaļīgas 2ml	Disposable syringes BD Discardit™ II, 2 ml	BD Becton Dickinson, ASV
Šūnu matracis adherentām šūnu kultūrām	25 cm2 TC flask, stand., vent.	Sarstedt, Vācija
	75 cm2 TC flask, stand., vent.	Sarstedt, Vācija
	175 cm2 TC flask, stand., vent.	Sarstedt, Vācija

### 2.1.3 Iekārtas un datorprogrammas

4.tabula  
Iekārtas un datorprogrammas

Table 4  
Devices and equipment

Iekārta	Apraksts	Ražotājs
Šūnu kultūru CO2 Inkubators	Sanyo CO2 incubator, MCO-5AC	Sanyo Electric Co., Ltd., Japāna
Hipoksijas CO2 inkubators	Sanyo multi-gas co2/o2 incubator, MCO-18M	Sanyo Electric Co., Ltd., Japāna
Nanodaļiņu izsekošanas iekārta	NanoSight NS300	Malvern, Lielbritānija
Daļiņu izmēra, Zeta potenciāla un molekulasmasas analizators (ZetaSizer)	Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd., Lielbritānija
Vortekss tipa maisītājs	Vortex genie 2	Scientific Industries, ASV
	Bio Vortex V1	Biosan, Latvija
	Microspin FV-2400	Biosan, Latvija
Autoklāvs	Labo MLS-3020U	Sanyo, Japāna
Šķidrā slāpekļa djuārs	MVE cryosystem 6000	Chart, ASV
Laminārās plūsmas kabinets	Biowizard	KOJAIR, Somija
	Telstar AV-100	Telstar, Lielbritānija

Magnētiskais maisītājs	Labmixer Magneti stirrer	Labotek, Dānija
Ledus bloks	Eppendorf® PCR Cooler, iceless cold storage system for 96 well plates and PCR tubes	Eppendorf, Itālija
Ūdens vanna	Optima T100 Heated Circulating Bath	Grant, Lielbritānija
Vakuuma atsūcējs šķidrumam	TOBI CLINIC SUCTION ASPIRATOR with 2x4 l jars	Gima S.p.A, Itālija
Velkmes skapis	Fume cupboard	Ezermester ISZ, Ungārija
Mikroskops	Leica ICC50 HD	Leica, Vācija
Konfokālais lāzerskenējošais Mikroskops	Leica TCS SP8 MP	Leica, Vācija
Ūdens attīrīšanas iekārta	Milli-Q Synthesis A10	Millipore, ASV
Gorjajeva kamera	Медремкомплект	Krievija
Ledusskapis	FR240-1501A+	Snaige, Lietuva
Saldētava	F100-1201A	Snaige, Lietuva
Elektroniskie svāri	Kern 360-3	Kern&Sohn, Vācija
	Kern 440-33	Kern&Sohn, Vācija
Centrifūgas	5702	Eppendorf, Itālija
	5415 D	Eppendorf, Itālija
Šļirču sūkņi	Syringe pump	Baoding Shenchen precision pump CO, Ķīna
Kelvinators	MDF-U53V	Sanyo, Japāna
Datorprogrammas	LAS X 3-D Viewer	Leica, Vācija
	Zetasizer Software v7.11	Malvern Panalytical
	NanoSight NTA Software v3.0	Malvern Panalytical
	ImageJ V1.53e	ImageJ
	Paint NET 4.2.16	dotPDN, LLC

## 2.1.4 Reaģenti

5.tabula  
Reaģenti

Table 5  
Reagents

Reaģenti un izejvielas	Ražotājs/Produkta kods
GutAlive fēču paraugu ievākšanas konteiners	MicroViable Therapeutics, Spānija
iZON kollonas izmēru izslēgšanas hromatogrāfijai	iZON, Jaunzēlande. SP5
Fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums (PBS)	Thermo Fisher Scientific, ASV. BP2944-100
Dulbecco modificētā <i>Eagle</i> barotne (DMEM/F-12) ar L-glutamīnu	Thermo Fisher Scientific, ASV. 31330095
Liellopu augļa serums (FBS)	Merck KGaA, Vācija. F7524-500ML
Primocīns antimikrobiāla piedeva (50mg/ml)	Invivogen, ASV. Ant-pm-2
96% Etanols	Biodeģviela, Latvija
Tripsīns EDTA šķīdums 10x (2,5%)	Santa Cruz Biotechnology, ASV. SC-391060
Dimetilsulfoksīds (DMSO)	Thermo Fisher Scientific, ASV. 85190
IV tipa kolagēns 0,5mg/mL no cilvēka placentas	Sigma-Aldrich, ASV. C5533-5MG
Paraformaldehīda pulveris 97%	Sigma-Aldrich, ASV. A11313
Glicerols	Merck KGaA, Vācija. 56-81-5
DAPI krāsviela šūnu kodoliem	Thermo Fisher Scientific, ASV. D1306
Triton-x-100 10%	Merck KGaA, Vācija. 93443-100ML
Liellopu seruma albumīns (BSA), pulveris	Thermo Fisher Scientific, ASV. BP9700100
1M nātrija hidroksīds NaOH 98%	Merck KGaA, Vācija. 30620-1KG-M
Sālsskābe HCl 37%	Merck KGaA, Vācija. 30721-1L-M
Dimetilformamīds	Merck KGaA, Vācija. 319937
<i>Cascade blue</i> hidrazīds, trinātrija sāls	Thermo Fisher Scientific, ASV. C687
EGM™-2 Endotēliālo šūnu augšanas barotnes komplekts	Lonza, Šveice. CC-3162
Laminīns no cilvēka fibroblastiem	Sigma-Aldrich, ASV. L4544-100UL
Fibronektīns no cilvēka plazmas	Sigma-Aldrich, ASV. F2006-1MG
LIVE/DEAD™ BacLight™ baktēriju dzīvotspējas noteikšanas komplekts mikroskopijai	Thermo Fisher Scientific, ASV. L7007
Dietil-pirokarbonāts (DEPC)	Sigma-Aldrich, ASV. 40718-25ML
Skim milk powder for microbiology	Sigma-Aldrich, ASV. 70166-500G
Saharoze	Sigma-Aldrich, ASV. S0389-5KG
Trehaloze	Sigma-Aldrich, ASV. T9531-10G
Kalcija hlorīda heksahidrāts	Sigma-Aldrich, ASV. 21108-500G
Magnija hlorīda heksahidrāts	Sigma-Aldrich, ASV. M2670-100G
Kālija hidroksīds	Sigma-Aldrich, ASV. 221473-500G
L-askorbīnskābe	Sigma-Aldrich, ASV. A5960-25G
Urīnskābe	Sigma-Aldrich, ASV. U2625-25G
Glutations	Sigma-Aldrich, ASV. G4251-10G

6.tabula  
Izmantotās antivielas

Table 6  
Used antibodies

Antiviela	Izmantotais atšķaidījums	Ražotāja kods	Ražotājs
Anti-ZO-1 poliklonāla anti- viela ekspresēta trušos	1:50	ab216880	Abcam, Lielbritānija
Anti-CD31 monoklonāla anti- viela ekspresēta pelēs	1:200	ab9498	Abcam, Lielbritānija
Anti-peles IgG poliklonāla sekundārā anti- viela, ekspresēta kazās. Konjugēta ar Alexa Fluor 568	1:1000	A11004	Termo Fisher Scientific, ASV
Anti-truša IgG poliklonāra sekundārā anti- viela, ekspresēta kazās. Konjugēta ar Alexa Flour 488	1:200	Ab150077	Abcam, Lielbritānija

### 2.1.5 Šūnu kultūru barotnes

7.tabula  
Caco-2 šūnu līnijas barotne

Table 7  
Caco-2 cell medium

	Sākuma koncentrācija	Gala koncentrācija	Tilpums 50 ml barotnē
DMEM/F12	-	-	līdz 50 ml
FBS	100%	10%	5 ml
Primocīns	50 mg/ml	50 µg / ml	50 µl

8.tabula  
Caco-2 bez antibiotiku šūnu līnijas barotne

Table 8  
Caco-2 cell medium without antibiotics

	Sākuma koncentrācija	Gala koncentrācija	Tilpums 50 ml barotnē
DMEM/F12	-	-	līdz 50 ml
FBS	100%	10%	5 ml

9.tabula  
HUVEC līnijas barotne

Table 9  
HUVEC cell medium

	<b>Sākuma koncentrācija</b>	<b>Gala koncentrācija</b>	<b>Tilpums 500 ml barotnē</b>
EBM <sup>TM</sup> -2 Basal Medium	-	-	līdz 500 ml
EGM <sup>TM</sup> -2 SingleQuots <sup>TM</sup> Supplement Pack	-	Rh VEGF 5ng/ml Rh EGF 5ng/ml Rh FGF-B 5ng/ml R3-IGF-1 15ng/ml Heparin – 0.75 units/ml Hydrocortisone 1ug/ml Ascorbic acid 50ug/ml FBS 2%	0,5ml 0,5ml 2ml 0,5ml 0,5ml 0,2ml 0,5ml 10ml
Primocīns	50 mg/ml	500 µg / ml	500 µl

10.tabula  
HUVEC bez antibiotiku šūnu līnijas barotne

Table 10  
HUVEC cell medium without antibiotics

	<b>Sākuma koncentrācija</b>	<b>Gala koncentrācija</b>	<b>Tilpums 500 mL barotnē</b>
EBM <sup>TM</sup> -2 Basal Medium	-	-	500ml
EGM <sup>TM</sup> -2 SingleQuots <sup>TM</sup> Supplement Pack	-	Rh VEGF 5ng/ml Rh EGF 5ng/ml Rh FGF-B 5ng/ml R3-IGF-1 15ng/ml Heparin – 0.75 units/ml Hydrocortisone 1ug/ml Ascorbic acid 50ug/ml FBS 2%	0,5ml 0,5ml 2ml 0,5ml 0,5ml 0,2ml 0,5ml 10ml

10.tabula  
Antioksidantu barotne

Table 10  
Antioxidant medium

<b>Koncentrācija uz 1l barotnes</b>	
PBS	1l
Skimmed milk 10%	100g
Saharoze 10%	100g
Trehaloze 5%	50g
CaCl <sub>2</sub>	0,1g
MgCl <sub>2</sub>	0,1g
KOH	0,6g
Askorbīnskābe	1g
Uric acid	0,4g
Glutations	0,1g

### 2.1.6 Šķīdumi

11.tabula  
Šķīdumu sagatavošana

Table 11  
Solution preparation

<b>Šķīdums</b>	<b>Pagatavošana</b>
BSA šķīdums 1%	1ml 1x PBS izšķīdina 10mg BSA.
BSA šķīdums 5%	1ml 1x PBS izšķīdina 50 mg BSA.
DAPI šķīdums 1µg/ml	DAPI pulveri izšķīdina dimetilformamīdā iegūstot koncentrāciju 5mg/ml. Iegūtajam šķīdumam pievieno 1% BSA šķīdumu iegūstot gala koncentrāciju 1µg/ml.
Etanols 70%	366ml 96% etanolam pievieno 135ml destilēta ūdens.
Formaldehīds 4%	Ūdens vannā uzsilda 80ml 1xPBS līdz 60°C. Pēc tam velkmes skapī pievieno 4g paraformaldehīda pulvera. Lai pulveris izšķīst tam pa pilienam pievieno 1M NaOH. Kad pulveris ir izšķīdis to izfiltrē caur 0.45µm filtru un pievieno 1xPBS līdz tiek iegūts 100ml tilpums.
NaOH 1M	100ml destilētā ūdens šķīdina 4g NaOH pulveri.
PBS 1x	1l destilētā ūdens izšķīdina 5 PBS tabletes. Šķīdumu autoklāvē 15 minūtes pie +120°C.
DEPC-PBS 1x	Velkmes skapī 1x PBS šķīdumam pievieno 1 µL DEPC uz katru 1 mL PBS buferšķīduma. To sakrata un atstāj velkmes skapī uz vienu dienu. Nākamajā dienā šķīdumu autoklāvē un filtrē caur 0,2 µm filtru. Pirms lietošanas nepieciešams nomērīt šķīduma pH (jābūt pH~7).

Tripsīns-EDTA 1x (0.25%)	9ml 1x PBS šķīdumam pievieno 1ml 10x tripsīna-EDTA.
Triton X100 0,5%	995µl 1xPBS pievieno 5µl triton X100.
<i>Cascade blue</i> 10mg/mL	10mg <i>Cascade blue</i> izšķīdina 1ml sterilā destilētā ūdenī.

## 2.2 Metodes

### 2.2.1 Darba drošības tehnika

Strādājot molekulārās bioloģijas laboratorijās, šūnu boksos ir jāievēro noteiktā darba drošības instrukcija. Nepieciešams tīrs laboratorijas mētelis, cimdi un maiņas apavi. Strādājot ar šūnām, pirms darba nepieciešams dezinficēt darba virsmu ar 70% etanolu, ieslēdzot šūnu lamināru nepieciešams uzgaidīt vismaz 10-15min, lai laminārs būtu gatavs darbam. Darbu beidzot ir nepieciešams darba virsmu notīrīt ar 70% etanolu un uz 1h ieslēgt UV lampu dezinfekcijai. Utilizējot bioloģiskos atkritumus, nepieciešams uzvilkt cimdus. Darbības ar indīgām vai viegli gaistošām vielām (formaldehīds) jāveic velkmes skapī.

### 2.2.2 Šūnu kultūru uzsākšana

Šūnu kultūras tiek uzglabātas kriostobros, šķidrā slāpekļī (-196 C). Šūnas atrodas tām paredzētā barotnē ar koncentrāciju 1milj/ml 1,5ml tilpumā ar klāt pievienotu 10% DMSO.

Darbam nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, ūdens vanna, 15 ml stobriņi, šūnu kultūru barotne, 25 cm<sup>2</sup> šūnu matracis adherentām kultūrām, centrifūga, CO<sub>2</sub> šūnu inkubators, mikropipetes uzgaļi ar filtru, mikropipete, seroloģiskās pipetes, pipešu dozators.

1. Sagatavo darba virsmu laminārā un uzliek sildīties ūdens vannu uz +37°C.
2. Ūdens vannā uzsilda izmantojamo barotni līdz +37°C.
3. 10 ml šūnu kultūru barotni iepilda 15 mL stobriņā.
4. Kriostobru, ar tajā sasalušajām šūnām, atkausēt ūdens vannā +37°C.
5. Notīra kriostobru ar 70% etanolu un ienes laminārā.
6. Šūnu suspensiju ar mikropipeti no kriostobra lēnām pa pilienam pievieno 15 ml stobriņā esošajai barotnei.
7. Iegūto šūnu suspensiju iepilda jaunā 25 cm<sup>2</sup> šūnu matracī.
8. Uz šūnu matrača virsmas norāda šūnu kultūras nosaukumu, šūnu kultūras uzcelšanas datumu un šūnu kultūras pasāžu.

9. Uz šūnu matrača esošo šūnu kultūru uz 24 stundām atstāj CO<sub>2</sub> inkubatorā (+37°C, 5% CO<sub>2</sub> un 100% gaisa mitruma apstākļos). Pēc 24 stundām veic šūnu kultūras barotnes maiņu, lai aizvāktu apoptotiskās šūnas, nodrošinātu stabilu pH un šūnu kultūrai nodrošinātu barības vielas.

### 2.2.3 Šūnu kultūras barotnes maiņa

Barotnes maiņu veic vienu reizi divās dienās vai atkarībā no barotnes krāsas maiņas, balstoties uz fenolsarkano, pēc kā barotnē var noteikt pH līmeni.

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, ūdens vanna, šūnu kultūru barotne, CO<sub>2</sub> šūnu inkubators, seroloģiskās pipetes, pipešu dozators.

1. Sagatavo darba virsmu laminārā un uzliek sildīties ūdens vannu uz +37°C.
2. Ūdens vannā uzsilda izmantojamo barotni līdz +37°C.
3. Barotni izņem no ūdens vannas, notīra ar 70% etanolu un ienes laminārā.
4. Veco barotni atsūc un uz 1 cm<sup>2</sup> šūnu matrača platības, pievieno 0,2 mL jaunu šūnu kultūras barotni.
5. Uz šūnu matrača virsmas norāda barotnes maiņas datumu.
6. Uz šūnu matrača esošo šūnu kultūru ienes CO<sub>2</sub> inkubatorā (+37°C, 5% CO<sub>2</sub> un 100% gaisa mitruma apstākļos).

### 2.2.4 Šūnu kultūras pasāžas maiņa

Pasāžas maiņas nepieciešamību vērtē pēc šūnu konfluences. Pie 70-90% šūnu konfluences ir nepieciešams veikt pasāžas maiņu un šūnas pārvietot lielākā šūnu matracī vai liekās šūnas izmest ārā, pretējā gadījumā šūnu kultūra aizaugs un tām nebūs vietas, kur dalīties, jo pie 100% konfluences šūnas ieiet augšanas plato fāzē un pārstāj dalīties.

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, ūdens vanna, 15 vai 50 ml stobriņi, šūnu kultūru barotne, tripsīns+EDTA, 1xPBS, 25/75/175 cm<sup>2</sup> šūnu matracis adherentām kultūrām, centrifūga, CO<sub>2</sub> šūnu inkubators, mikropipetes uzgaļi ar filtru, mikropipete, seroloģiskās pipetes, pipešu dozators.

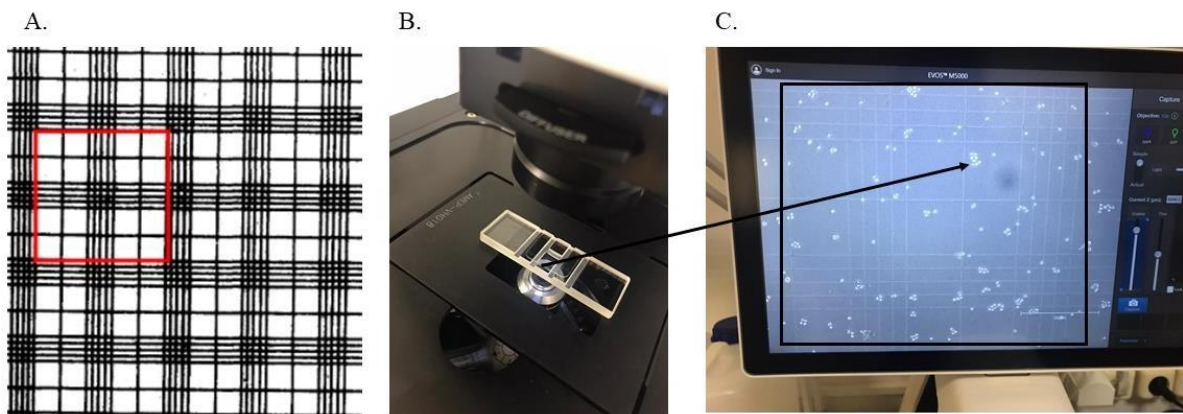
1. Sagatavo darba virsmu laminārā un uzliek sildīties ūdens vannu uz +37°C.
2. Ūdens vannā uzsilda izmantojamo šūnu barotni, EDTA tripsīnu, un 1xPBS līdz +37°C.

3. No ūdens vannas izņem šūnu barotni, tripsīnu, tripsīna inaktivācijas barotni, PBS, notīra ar 70% etanolu un ienes laminārā.
4. Atsūc šūnu kultūras veco barotni.
5. Šūnu kultūrai uz 1 cm<sup>2</sup> šūnu matrača platības, pievieno 0,2 mL 1xPBS, un viegli šūpojot ļauj PBS pārklāt šūnas, tas nepieciešams, lai PBS noskalotu pāri palikušo barotni, kas ir svarīgi, jo barotnē esošais serums (FBS) inaktivē tripsīna darbību.
6. Atsūc 1xPBS no šūnu kultūras.
7. Šūnu kultūrai pievieno uz 1 cm<sup>2</sup> šūnu matrača platības 40 μL 1x EDTA tripsīnu, EDTA ir svarīgs, lai atbrīvotos no Ca un Mg joniem, tādējādi tripsīns var efektīvāk hidrolizēt specifiskos proteīnus.
8. Uz šūnu matrača esošo šūnu kultūru ievieto CO<sub>2</sub> inkubatorā (+37°C, 5% CO<sub>2</sub> un 100% gaisa mitruma apstākļos) uz 3 minūtēm. Šajā laika periodā notiek tripsīna iedarbošanās un šūnas tiek norautas no šūnu matrača virsmas, šūnu kultūru ar pievienoto tripsīnu nepieciešams ievietot 37 grādu temperatūrā, jo šī ir temperatūra, kad tripsīnam ir vislabākā aktivitāte.
9. Uz šūnu matrača esošo šūnu kultūru izņem no CO<sub>2</sub> inkubatora un pārbauda mikroskopā vai šūnas ir atrāvušās no šūnu matrača un brīvi peld. Ja šūnas vēl nav atrāvušās, šūnu matraci var vēl uz 3 minūtēm inkubēt šūnu inkubatorā.
10. Šūnu kultūrai barotni pievieno 3x vairāk nekā tika pievienots tripsīns.
11. Šūnu suspensiju no šūnu matrača atsūc un ievieto 15 vai 50 ml stobriņā.
12. Stobriņu ar šūnu suspensiju centrifūgē 5 minūtes pie 300 g.
13. Uzmanīgi atsūc un izmet stobriņā esošo supernatantu, nepieskaroties šūnu nogulsnēm.
14. Stobriņā esošās šūnu nogulsnes uzjauc jaunā barotnē.
15. Iegūto šūnu suspensija pārnes lielākā šūnu matracī. Ja tiek izmantots tāda paša izmēra šūnu matracs kā iepriekšējais, tad šūnas drīkst ienest arī iepriekšējā šūnu matracī, bet nepieciešams daļu no šūnām atsūkt un izmest, lai izvairītos no pārlietu lielas šūnu konfluences.
16. Uz šūnu matrača virsmas norāda veikto pasāžu kopskaitu un pēdējās veiktās pasāžas datumu un šūnu kultūras nosaukumu.
17. Šūnu kultūru ienes CO<sub>2</sub> inkubatorā (+37°C, 5% CO<sub>2</sub> un 100% gaisa mitruma apstākļos).
18. Nākamajā dienā nomaina barotni, lai atbrīvotos no šūnām, kas gājušas bojā pārsēšanas procesā. Tas nepieciešams, lai mazinātu barotnē esošo apoptotisko šūnu skaitu, kas var ietekmēt dzīvo šūnu fizioloģiju.

### 2.2.5 Šūnu skaitīšana ar *Gorjajeva* kameru

Nepieciešams: *Gorjajeva* kamera, mikropipetes uzgaļi ar filtru, mikropipete, mikroskops, darbam sagatavots laminārs, 70% etanols.

1. Lai varētu veikt šūnu skaitīšana ar *Gorjajeva* kameru, nepieciešams sekot “Šūnu kultūru pasāžas maiņa” protokolam līdz 11. solim (ieskaitot).
2. *Gorjajeva* kameru (3B attēls) nosedz ar segstikliņu un pārlicinās, ka starp segstikliņu un kameras skaitāmo rāmi, nav redzami gaisa burbuļi.
3. Šūnu suspensiju, kas atrodas tripsīna un inaktivācijas šķīdumā sapipetē, lai iegūtu homogēnāku suspensiju un 20  $\mu\text{L}$  no tās uznes *Gorjajeva* kameras daļā, kur atrodas segstikliņa mala. Ļauj šūnu suspensijai iesūkties līdz skaitīšanas rāmim.
4. Šūnas skaita vienā lielajā kvadrātā, kas sastāv no 5x5 maziem kvadrātiem (3A attēls) – ievilkts ar sarkanu līniju. Šūnu izvietojums *Gorjajeva* kamerā attēlots 3C attēls). Šūnas, kas atrodas uz ārmalām, skaita tikai uz kreisās un apakšējās malas.
5. Lai iegūtu šūnu skaitu mililitrā, šūnu skaitu 5x5 laukā reizina ar atšķaidījumu ( $10^4$ ). Skaitīšanu veic vismaz 5 laukos un tālākiem aprēķiniem izmanto vidējo vērtību.



3.attēls A – *Gorjajeva* kamera, sarkanais laukums reprezentē  $1\text{mm}^2$ . B - *Gorjajeva* šūnu skaitīšanas kamera zem EVOS M5000 mikroskopa. C – *Gorjajeva* šūnu skaitīšanas kamera EVOS M5000 mikroskopā 40x palielinājumā.

Figure 3. A – *Gorjajev* chamber, red square represents  $1\text{mm}^2$ . B – *Gorjajev* chamber under EVOS M5000 microscope. C – *Gorjajev* chamber with 40x magnification in EVOS M5000 microscope.

### 2.2.6 Šūnu kultūru iesaldēšana

Lai šūnu kultūras saglabātu izmantošanai nākotnē, tās nepieciešams iesaldēt un uzglabāt kriostobros šķidrā slāpekļī.

Nepieciešams: Šķidrā slāpekļa djuārs, kelvinators, darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, tripsīna inaktivācijas barotne, tripsīns, PBS, DMSO, šūnu kultūru barotne, šūnu kultūru saldēšanas kastīte ar izopropanolu, mikropipete, mikropipetes uzgaļi ar filtru, 15 vai 50 ml stobriņi.

1. Pirms šūnu saldēšanas, nepieciešams sekot “Šūnu kultūru pasāžas maiņa” protokolam līdz 10. solim (ieskaitot).
2. Veic šūnu skaitīšanu pēc “Šūnu skaitīšana ar *Gorjajeva* kameru” protokola.
3. Šūnu suspensiju no šūnu matrača atsūc un ievieto 15 vai 50 ml stobriņā.
4. Stobriņu ar šūnu suspensiju centrifūgē 5 minūtes pie 300 g.
5. Uzmanīgi atsūc un izmet stobriņā esošo supernatantu, nepieskaroties šūnu nogulsnēm.
6. Tiek iesaldētas viens miljons šūnu vienā mL šūnu kultūru barotnes ar 10% DMSO. Izmantojot iepriekš iegūto šūnu skaitu, pievieno vajadzīgo daudzumu šūnu kultūru barotnes un DMSO, lai iegūtu 10% DMSO šūnu kultūru barotni ar tajā esošajām šūnām.
7. Šūnas homogēni izklidē 10% DMSO šūnu kultūru barotnē ar maigu pipetēšanu. Iegūto šūnu suspensiju sadala pa nomarkētiem kriostobriem.
8. Kriostobrus ar šūnām pārnes uz šūnu kultūru saldēšanas kastīti ar izopropanolu un nedēļu glabā to kelvinatorā pie  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pēc tam kriostobrus ar šūnām var pārnest uz šķidrā slāpekļa djuārā

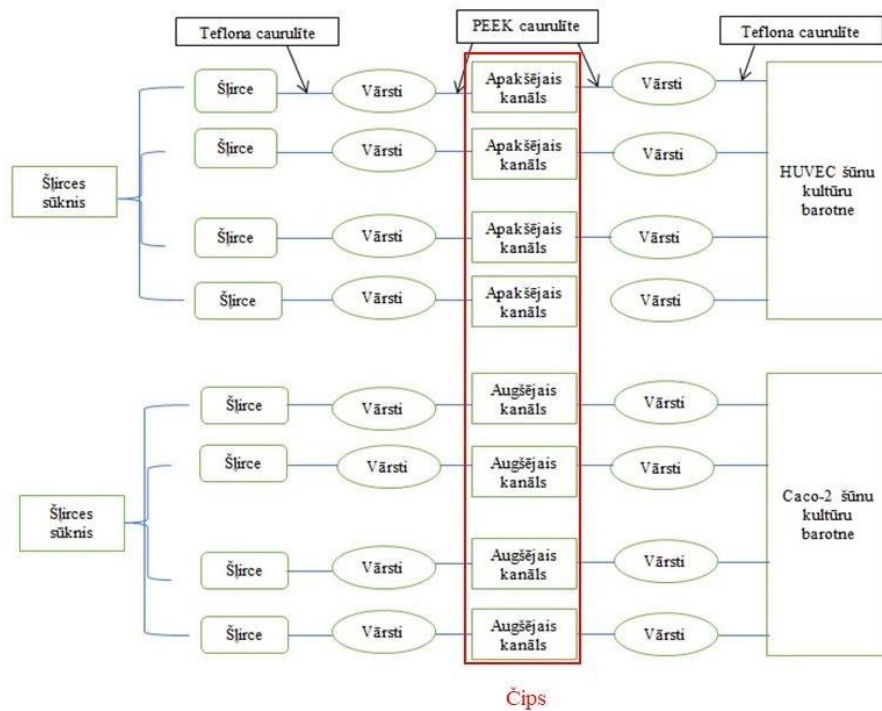
### **2.2.7 Orgānu čipa sagatavošana darbam**

Lai orgānu čipu varētu izmantot šūnu kultivēšanai pirms tam nepieciešams no sterilizēt ar 70% etanolu un 1h dezinficējot zem UV gaismas.

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, 2ml šļircēs, 1xPBS, 50mL stobriņi

1. Sagatavo darba virsmu laminārā.
2. 50ml stobriņos, kas reprezentē barotņu rezervuārus iepilda 70% etanolu un savieno ar orgānu čipa sistēmu.
3. Čipu ievieto čipa un vārstu turētājā. Savieno caurulītes, kuras iet no barotņu rezervuāriem caur vārstiem, cauri orgānu čipam un caur vārstiem uz šļircēm šļircēs sūkņī (orgānu čipa sistēmas saslēgumu skatīt 4.attēlā) 30min laiž cauri 70% etanola ar plūsmu 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ .
4. Pēc tam 70% etanola stobriņu aizvieto ar 50mL 1xPBS stobriņiem.
5. 24h, izmantojot orgānu čipa sistēmu čipu skalo ar 1xPBS pie 1 $\mu\text{l}/\text{min}$  plūsmas.

6. Pēc skalošanas ar 1xPBS čips ir gatavs bioloģiskai funkcionalizēšanai.



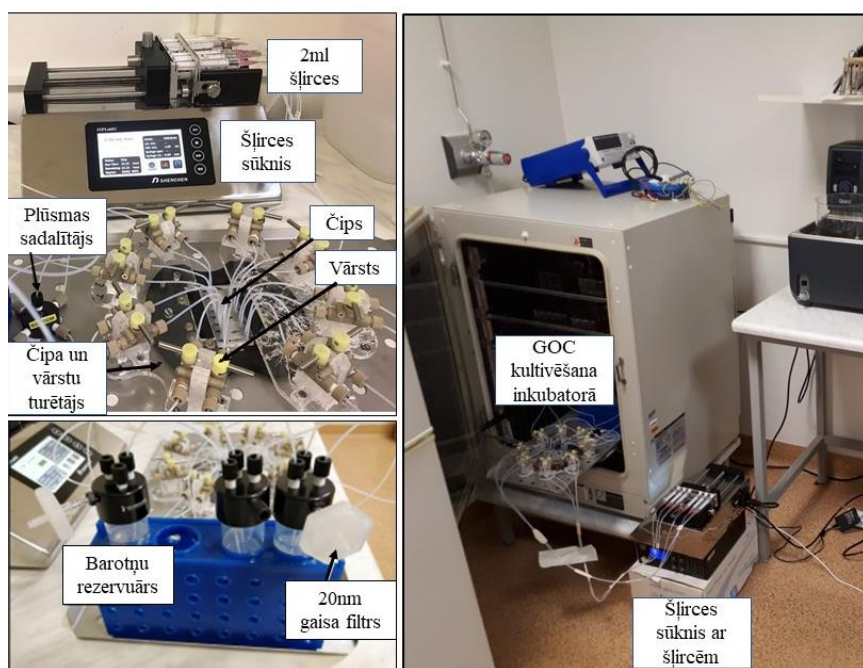
4.attēls. Orgānu čipa saslēguma shēma

Figure 4. Schematic illustration of organ chip coupling.

### 2.2.8 Orgānu uz čipa sistēmas saslēgums

Lai spētu radīt plūsmu GOC kanālos un varētu notikt veiksmīga šūnu kultivēšana GOC nepieciešams to pievienot sistēmai (5.attēls), kura sastāv no šļirces sūkņa, 1ml šļircēm, vārstiem, kuri ir īpaši svarīgi veicot manipulācijas, PDMS vai OSTE/COC čipa, čipa un vārstu turētāja, poliētera ētera ketona (PEEK) caurulītēm, teflona caurulītēm, barotņu rezervuāriem, pie kuriem tiek pievienots 0,02 mikrometru gaisa filtrs, tādējādi nodrošinot sterilus apstākļus, čipa un vārstu turētājs nodrošina stabilitāti un mikročipa pieslēgšanu pie kopējā saslēguma. Šļirces sūknis un šļirces tika izvēlētas, jo tas ir lēts veids, kā nodrošināt mikroplūsmu un ļauj savākt barotnes no katra orgāna augšējā un apakšējā kanāla atsevišķi. Tas ir būtiski, pētot mikrobiotas komunikācijas mehānismus, jo ļaus savākt tikai BEVs, kas nokļūst no zarnu lūmena kanāla asinsvadus reprezentējošā kanālā. Vārsti nodrošina plūsmas apturēšanu katram kanālam individuāli pirms manipulācijām ar čipu un atgaisošanai, lai novērstu burbuļu veidošanos, kas ir būtiska problēma mikroplūsmas sistēmās. PEEK caurulītes tika izvēlētas, jo ir ļoti fleksiblas, kā arī PEEK polimērs ir stabils, nav toksisks un ir inerts materiāls. Sūknis

darbojas vakuuma režīmā, velkot vakuumu šļircēs, tas nodrošina plūsmu caurulītēs un ļauj turēt barotņu rezervuārus inkubatorā.



5.attēls. GOC sistēmas kopējais saslēgums.

Figure 5. GOC systems coupling.

### 2.2.9 Orgānu čipa funkcionalizēšana ar ārpusšūnu matriksu (ECM – extracellular matrix)

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, IV tipa kolagēns 0,5mg/ml, fibronektīns 50μg/ml, laminīns 30μg/ml, 1xPBS, mikropipete, mikropipetes uzgaļi ar filtru .

1. Sagatavo darba virsmu laminārā.
2. Aizver čipa un vārstu turētāja vārstus un čipu atvieno no sistēmas.
3. Ar mikropipeti un 1xPBS divas reizes izskalo orgānu čipa kanāliņus.
4. Tiek izveidots ECM maisījums, kur gala koncentrācija cilvēka IV tipa kolagēnam ir 0,5 mg/ml, fibronektīnam 50μg/ml, laminīnam 30μg/ml.
5. Pēc tam ar mikropipeti orgānu čipa kanāliņos iepilda 33 μl ECM maisījuma augšējā kanāliņā un 5.4 μl apakšējā kanāliņā.
6. Orgānu čipu ar iepildīto ECM ievieto CO<sub>2</sub> inkubatorā (+37°C, 5% CO<sub>2</sub> un 100% gaisa mitruma apstākļos) uz 24 stundām, lai tas saistītos pie čipa virsmas.
7. Nākamajā dienā no kanāliņiem atsūc nesacietējušo kolagēnu un čips ir sagatavots, lai uz tā

sētu šūnas.

### 2.2.10 Orgānu čipa funkcionalizēšana ar šūnu kultūrām

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, 1xPBS, 1x EDTA tripsīns, tripsīna inaktivācijas barotne, šūnu kultūras barotnes, ūdens vanna, 15 un 50 ml stobriņi, centrifūga, CO<sub>2</sub> šūnu inkubators, mikropipetes uzgaļi ar filtru, mikropipete, seroloģiskās pipetes, pipešu dozators, mikroskops, *Gorjajeva* kamera.

1. Pirms orgānu čipa funkcionalizēšanas ar šūnu kultūrām nepieciešams sekot līdzī "Šūnu kultūru pasāžas maiņa" protokolam līdz 11. solim (ieskaitot).
2. Veic šūnu skaitīšanu pēc "Šūnu skaitīšana ar *Gorjajeva* kameru" protokola.
3. Šūnu suspensiju no šūnu matrača atsūc un ievieto 15 vai 50 ml stobriņā.
4. Stobriņu ar šūnu suspensiju nocentrifūgē 5 minūtes pie 300 g.
5. Pēc šūnu suspensijā noteiktā šūnu skaita aprēķina nepieciešamo tilpumu orgānu čipa funkcionalizēšanai (nepieciešamās šūnu koncentrācijas orgānu čipa funkcionalizēšanai šūnu kultūrām – Caco2 šūnu līnijai 1,5E6 šūnas/ml, HUVEC 9E6 šūnas/ml).
6. Ar mikropipeti uzmanīgi iesūc Caco-2 šūnu suspensiju ar konkrēto koncentrāciju un 33µl iepilda augšējā orgānu čipa kanāliņā.
7. GOC atstāj statiski uz 2h CO<sub>2</sub> inkubatorā, lai Caco-2 šūnas adherējas pie GOC membrānas (+37°C, 5% CO<sub>2</sub> un 100% gaisa mitruma apstākļos)
8. Pēc 2h apakšējā kanāliņā tika uzsētas HUVEC līnijas šūnas, atbilstoši noteiktajai koncentrācijai iepildot kanāliņā 5.4 µl šūnu suspensijas.
9. Čīps tika inkubēts CO<sub>2</sub> inkubatorā uz 24h (+37°C, 5% CO<sub>2</sub> un 100% gaisa mitruma apstākļos) apgriezts kājām gaisā, nodrošinot šūnu adhēziju pie apakšējā kanāliņa membrānas.
10. Pēc čipa funkcionalizēšanas ar šūnām tas tiek ievietots čipa un vārstu turētājā.

### 2.2.11 Orgānu čipa barotnes maiņa

Šūnas uz GOC tiek kultivētas zem 0.70µl/min plūsmas pirmās kultivēšanas dienas, vēlāk palielinot plūsmu līdz 2µl/min. Orgānu čipa barotnes maiņa jāveic katru dienu, jo šļircē barotne spēj uzkrāties tikai maksimums 2ml tilpumā, kas saistīts ar šļirces dimensijām, lai varētu nodrošināt nepieciešamo plūsmu.

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, CO<sub>2</sub> inkubators, šūnu kultūras barotne.

1. Sagatavo darbam lamināru.
2. GOC statīvu ar šļircēm izņem no CO<sub>2</sub> inkubatora un ienes laminārā.
3. Iztukšo šļircēs un 50ml stobriņos iepilda svaigu šūnu kultūras barotni, ja nepieciešams.
4. Šļircēs ievieto atpakaļ sistēmas saslēgumā un atkārtoti palaiž 0.7μl/min plūsmu, GOC šādi tiek kultivēts vismaz 3 dienas vai līdz brīdim, kad tiek novērota kriptu struktūru veidošanās un apstiprināta atbilstoša barjeras integritāte, pēc tam plūsma tiek palielināta līdz 2μl/min.

### 2.2.12 Barjeras integritātes novērtēšana ar *Cascade blue* testu

Lai novērtētu funkcionāla audu slāņa veidošanos un epiteliālās-endoteliālās barjeras integritāti, tiek veikts *Cascade blue* barjeras integritātes tests. Šis tests tiek veikts brīdī, kad ir izveidojies šūnu monoslānis.

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, šūnu kultūras baronte, 10mg/mL *Cascade blue*, 1.5ml ependorfi, 96 bedrīšu plate, mikropipete, mikropipetes uzgaļi ar filtru

1. Sagatavo darbam lamināru un orgānu čipu izņem no inkubatora un pārtrauc plūsmu.
2. 50ml stobriņos iepilda attiecīgās šūnu līnijas barotnes.
3. Caco-2 šūnu līnijas barotnei pievieno 10mg/ml *Cascade blue*, uz 1 mL barotnes tiek pievienots 1ul *Cascade blue* šķīduma.
4. Barotnes ievieto orgānu čipa barotnes rezervuāros, orgānu čipu ievieto inkubatorā un atkārtoti pieslēdz pie plūsmas 2ul/min
5. Sagatavo papildus divus 50mL stobriņus ar Caco-2 un HUVEC šūnu līnijas barotnēm.
6. Caco-2 šūnu līnijas barotnei pievieno 10mg/mL *Cascade blue* šķīduma, veidojot 7 atšķaidījumus, sākot no 10 ul/ml, 5ul/ml utt., pēc tam to pašu atkārti ar HUVEC šūnu līnijas barotni.
7. Nākamajā dienā tiek ievākta orgānu čipam cauri izplūdušī barotne, kura uzkrājusies šļircēs, tiek ievākti 200ul parauga no katras šļircēs.
8. 100ul paraugu, kā arī izveidoto atšķaidījumu standartšķīdumi un kontrole tiek iepildīta 96 bedrīšu platē, atzīmējot plates izkārtojumu. Plate tiek ievietota Victor 3V 1420 multiplašu lasītājā, veicot mērījumus pie uzstādījumiem ex355/em420, lai nomērītu *Cascade blue* koncentrāciju šķīdumos. Barjeras integritāte tiek aprēķināta pēc formulas  $P_{app} = -\frac{Q_R * Q_D}{SA * (Q_R + Q_D)} * \ln \left[ 1 - \frac{C_{R,0} * (Q_R + Q_D)}{(Q_R * C_{R,0} + Q_D * C_{D,0})} \right]$ , kur  $P_{app}$  – šķietamā caurlaidība (cm/s), SA – barjeras virsmas laukums (cm<sup>2</sup>),  $Q_R$  – šķīduma plūsmas ātrums apakšējā kanāliņā (cm<sup>3</sup>/s),  $Q_D$  – šķīduma plūsmas ātrums augšējā kanāliņā (cm<sup>3</sup>/s),  $C_{R,0}$  – *Cascade blue* koncentrācija cauri

izplūdušajā barotnē apakšējā kanāliņā ( $\mu\text{g/ml}$ ),  $\text{CD}_{D,0}$  – *Cascade blue* koncentrācija cauri izplūdušajā barotnē augšējā kanāliņā ( $\mu\text{g/ml}$ )

### 2.2.13 Orgānu čipa fiksēšana un krāsošana ar antivielām un DAPI

Lai orgānu čipu varētu mikroskopēt uz konfokālā mikroskopa un novērot struktūras nepieciešams to krāsot ar antivielām un DAPI.

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, 5% BSA, DAPI, 1xPBS, 0,5% Triton-X-100, 4% formaldehīds, ZO1 antiviena, CD31 antiviena, anti-peles IgG poliklonāla sekundārā antiviena, anti-truša IgG poliklonāla sekundārā antiviena, mikropipete, mikropipetes uzgaļi ar filtru.

1. Sagatavo darbam lamināru.
2. Orgānu čipu izņem no  $\text{CO}_2$  inkubatora un no orgānu čipa sistēmas.
3. Ar mikropipeti orgānu čipu divas reizes skalo ar 200  $\mu\text{l}$  1xPBS.
4. Pēc tam atsūc PBS un kanālos iepilda 4% formaldehīdu šūnu fiksēšanai (augšējā kanālā 33  $\mu\text{l}$ , apakšējā 5.4  $\mu\text{l}$ ) un inkubē 30min istabas temperatūrā.
5. Atsūc formaldehīdu un kanāliņus divas reizes skalo ar 200  $\mu\text{l}$  1xPBS.
6. Pēc tam šūnas tiek permabilizētas kanālos iepildot 33  $\mu\text{l}$  augšējā kanāliņā vai 5.4  $\mu\text{l}$  apakšējā kanāliņā 0,5% Triton-X-100 un inkubē 5min istabas temperatūrā.
7. Atsūc Triton-X-100 un kanālus divas reizes skalo ar 200  $\mu\text{l}$  1x PBS.
8. Pēc tam kanālos iepilda 5% BSA un inkubē istabas temperatūrā uz 2 stundām, BSA darbojas kā bloķējošs līdzeklis, lai novērstu antivielu nespecifisku saistīšanos.
9. Pēc tam orgānu čipa kanālus divas reizes skalo ar 200 $\mu\text{l}$  1xPBS.
10. Ar mikropipeti iepilda primāro antivielu ZO1 5% BSA šķīdumā GOC augšējā kanāliņā, jo tas ir blīvo savienojuma vietu marķieris, kas palīdz novērtēt epitēlija slāņa funkcionalitāti. Primāro antivielu CD31 GOC apakšējā kanāliņā, jo CD31 ir endotēlija šūnām raksturīgais marķieris. Orgānu čipu atstāj tumsā pie  $+4^\circ\text{C}$  uz nakti, aizstaisot kanāliņus ciet ar speciāliem uzgaļiem, lai tas neizžūtu.
11. Nākamajā dienā orgānu čipu 3 reizes skalo ar 200 $\mu\text{l}$  1x PBS, atsūc 1xPBS un kanālos iepilda sekundāro fluorescento antivielu šķīdumu 5% BSA, anti-peles IgG poliklonālo sekundāro antivielu iepilda kanāliņā, kur pirms tam iepildīta CD31 primārā antiviena (apakšējai endotēlija kanāls), anti- truša IgG poliklonālo sekundāro antivielu iepilda kanālā, kur pirms tam iepildīta ZO-1 primārā antiviena (augšējais epitēlija kanāls), inkubē 2h istabas temperatūrā.
12. Kanālus divas reizes skalo ar 200 $\mu\text{l}$  1xPBS, 1xPBS atsūc un kanālos iepilda 1 $\mu\text{g/mL}$  DAPI

šķīdumu, inkubē istabas temperatūrā 5min.

13. Orgānu čipa kanālus atkārtoti 3 reizes skalo ar 200 µl 1xPBS, atstāj +4°C temperatūrā tumsā līdz izmantošanas brīdim.

#### **2.2.14 Zarnu anaerobās mikrobiotas izdalīšana no fēču paraugiem**

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, 1xPBS, 40 µm filtrs, 80% glicerīns, seroloģiskās pipetes, pipešu dozators, 50 mL stobriņi, 1,5ml ependorfī, kriostobriņi, lāpstiņa, elektriskie svāri, vortekss, mikropipete, mikropipetes uzgaļi ar filtru. Protokols tika veidots atsaucoties uz publikāciju (Bellali et al. 2019).

1. Sagatavo darba lamināru, parauga apstrāde jāveic 1h laikā, lai nodrošinātu pēc iespējas lielāku baktēriju saglabāšanos pēc parauga apstrādes, ņemot vērā, ka paraugā esošās baktērija ir anaerobas un tiek izdalītas aerobos apstākļos.
2. Ar lāpstiņu fēču paraugu no GutAlive iepakojuma ievieto 50ml stobriņā un nosver.
3. Pēc noteiktā svara aprēķina nepieciešamo 1xPBS daudzumu (5mg fēču masas uz 25ml 1xPBS)
4. Ar seroloģisko pipeti stobriņam ar fēču paraugu pievieno sterilu 1xPBS.
5. Fēču paraugus resuspendē 1xPBS un filtrē ar 40 µm filtru.
6. Šķidro masu alikvotē pa 1ml un ar mikropipeti iepilda 1,5ml ependorfos.
7. Ievieto centrifūgā pie 6000g uz 15min.
8. Pēc tam atsūc supernatantu, nepieskaroties nogulsnēm.
9. Nogulsnes atkārtoti uzjauc 1xPBS līdz 1ml un vorteksē.
10. Marķē kriostobrus ar mikropipeti tajos iepilda sterilu 80% glicerīnu 225 µl
11. Kriostobriem ar 225 µl glicerīnu pievieno 1ml fēču paraugu šķidro masu.
12. Kriostobriņus ievieto saldēšanai paradzētā kastītē un uzglabā pie -80°C. Baktēriju uzglabāšana šķidrā slāpekļā nav nepieciešama, jo baktērijas ir pietiekami izturīgas, lai būtu izdzīvojušas arī pēc iesaldēšanas tikai pie -80°C

#### **2.2.15 Mikrobiotas uzsēšana uz orgānu čipa**

Pēc funkcionāla monoslāņa un 3D šūnu struktūru veidošanās apstiprināšanas, mikrobiota var tikt uzsēta orgānu čipa epitēlija kanāliņos.

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, 1.5ml ependorfī, hipoksiska bez antibiotiku Caco-2 šūnu līnijas bartone, baktēriju suspensija, mikropipete, mikropipetes uzgaļi ar filtru.

1. Sagatavo darbam lamināru.

2. No hipoksijas skapja izņem iepriekš sagatavotu Caco šūnu līnijas barotni bez antibiotikām, kura 24h pirms izmantošanas ievietota flaskos un noturēta hipoksijas apstākļos, lai nodrošinātu nepieciešamo gāzu sastāvu un 1,5mL iepilda ependorfā.
3. Paņem iepriekš no saldētavas izņemto mikrobiotas paraugu un aprēķina nepieciešamo baktēriju suspensijas atšķaidījumu, lai gala koncentrācija būtu  $1 \cdot 10^7$  baktērijas/ml un pievieno attiecīgo tilpumu hipoksiskas bez antibiotiku Caco-2 šūnu līnijas barotni.
4. Orgānu čipu izņem no hipoksijas skapja un atvieno no kopējā sistēmas saslēguma.
5. Ar mikropipeti 33  $\mu$ l mikrobiotas suspensiju iepilda orgānu čipa augšējās kanālos.
6. Orgānu čipa sistēmā augšējā kanāla barotnes rezervuārā iepilda iepriekš sagatavotu hipoksisku Caco šūnu līnijas barotni.
7. Orgānu čipu pievieno kopējai sistēmai un ievieto hipoksijas skapī, atstājot statistiski uz vienu stundu.
8. Pēc vienas stundu orgānu čipa kanālos atsāk plūsmu un atstāj hipoksijas skapī, visu kultivēšanas laiku GOC tiek turēts hipoksijas skapī pie plūsmas 2 $\mu$ l/min, ik pēc 24h palaižot plūsmu 50 $\mu$ l/min uz divām minūtēm, lai aizskalotu lielo daudzumu baktēriju, kuras ir savairojušās un epitēlija kanāls ar tām neaizaugtu.
9. Pēc darba visas virsmas un darbā izmantotos piederumus notīra ar 70% etanolu, laminārā un telpās ieslēdz UV gaismu, lai nodrošinātu pēc iespējas sterilāku darba vidi.

### **2.2.16 Dzīvo/mirušo baktēriju iezīmēšana**

Lai pēc mikrobiotas kultivēšanas uz čipa varētu novērot baktēriju dzīvotspēju, kā arī novērotu lokalizāciju, kur baktērijas kolonizē tika veikta dzīvo/mirušo baktēriju iezīmēšana.

Nepieciešams: darbam sagatavots laminārs, 70% etanols, 1xPBS, LIVE/DEAD BacLight kit, mikropipete, mikropipetes uzgaļi ar filtru.

1. Sagatavo darbam lamināru.
2. Pēc 24h mikrobiotas kultivēšanas orgānu čipā tiek pārtraukta plūsma un čips tiek atvienots no kopējā saslēguma.
3. Ar mikropipeti orgānu čipa kanāliņus divas reizes izskalo ar 100 $\mu$ l 1xPBS.
4. Iezīmēšanai tiek izmantots LIVE/DEAD BacLight kit ar SYTO9, SYTO9 pievienojot komplektā iekļautu propīdija jodīdu, iegūstot gala koncentrāciju SYTO9 5  $\mu$ M un 30 $\mu$ M propīdija jodīdam.
5. Ar mikropipeti šķīdumus iepilda augšējās orgānu čipa kanāliņos, uz kuriem kultivēta mikrobiota, čips tiek atstāts statistiski 5min istabas temperatūrā normālas atmosfēras apstākļos un

pēc tam tiek apskatīts, izmantojot lāzerskenējošo konfokālo mikroskopu, 488nm lāzeris ierosina dzīvo baktēriju fluorescenci, kuras iezīmējas zaļā krāsā, 561nm lāzeris ierosina mirušo baktēriju fluorescenci, kuras iezīmējas sarkanas, mikrobiotas dzīvotspējas procents tiek noteikts izmantojot ImageJ V1.53 programmu. Zaļā signāla intensitātes vērtība tika dalīta ar zaļā un sarkanā signāla intensitātes vērtību summu. Epitēlija slānis pēc tam tiek apskatīts, izmantojot caurejošo gaismu.

### 2.2.17 Izmēru izslēgšanas hromatogrāfija

Izmēru izslēgšanas hromatogrāfiju (SEC) izmanto daļiņu izmēru, lai frakcionētu paraugus. Sefarozes gēlā atrodas sfēriskas lodītes ar dažāda izmēra porām. Lielāka izmēra parauga daļiņas (virs 60 nm) nespēj iekļūt šajās porās, tāpēc izkļūst caur SEC kolonnai ātrāk. Savukārt mazāka izmēra daļiņas var iekļūt porās pagarinot to ceļu un tās lejā nokļūst lēnāk. Pateicoties šim principam parauga daļiņas caur kolonnu ātrāk iziet sākot ar lielāko molekulāro svaru līdz mazākajam. Tādējādi ir iespējams iegūt parauga frakcijas, kuras satur visvairāk EV un vismazāk citus piemaisījumus.

Nepieciešams: IZON kollonas, mikropipete, mikropipetes uzgaļi ar filtru, barotnes supernatanta paraugs, 0.02µm filtrēts 1x DEPC-PBS, 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņi, statīvs, līmeņrādis, centrifūga, vortekss tipa maisītājs, koncentrēšanas filtru stobriņi (Amicon Ultra 100K)

1. Pirms izmēru izslēgšanas hromatogrāfijas un BEV izdalīšanas, pēc 72h mikrobiotas kultivēšanas tiek ievākta GOC caurplūdusī barotne no katra kanāliņa 2 ml tilpumā. Barotne tiek centrifugēta pie 3000g 10 min pie +4, lai atbrīvotos no šūnām un baktērijām.
2. Pēc nocentrifugēšanas iegūto supernatantu ielej koncentrēšanas filtru stobriņos un atkārtoti centrifugē 10 min 3000g pie +4, līdz sasniegta 500 ul atzīme uz stobriņa filtra daļas
3. Šķidrumu, kas izgājis cauri filtram nolej bioloģiskajos atkritumos, savukārt koncentrātu ar 200ul mikropipeti savāc un iepilda 1,5ml ependorfos.
4. Izmēru izslēgšanas hromatogrāfija notiek izmantojot IZON kollonas, vismaz pusstundu pirms hromatogrāfijas kollonas un DEPC-PBS jānovieto istabas temperatūrā.
5. Kollona jāievieto statīvā un jānolīmeņo ar līmeņrādi.
6. Zem kollonas novieto šķidrās miskastes trauku, attaisa gan kollonas augšējo, gan apakšējo vāciņu, un ļauj izplūst cauri visam kollonā esošajam buferšķīdumam.
7. Pēc tam cauri kollonai jāizlaiž 20 ml 0,02 µm filtrēta DEPC-PBS, tikmēr sagatavo un nomarkē 20 1,5 ml ependorfu stobriņus.

8. Zem kolonnas apakšā paliek atvērtus 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņu, kas ievietoti mikrocentrifūgas stobriņu statīvā vienā līnijā, lai kolonnas filtrāts varētu iepilēt pirmajā mikrocentrifūgas stobriņā.
9. Tiklīdz viss DEPC-PBS ir izplūdis cauri kolonai, uz kolonnas filtra uznes 0,5 ml sakoncentrēto supernatanta paraugu un pagaida līdz tas iesūcas filtrā, līdz ko paraugs ir uzlikts uz filtra, sāk ievākt filtrātu pirmajā 1,5 ml ependorfā.
10. Kolonnu papildina ar 0,5 ml filtrēta 1x DEPC-PBS un neļauj kolonai izžūt. Šo soli pēc nepieciešamības atkārti līdz papildīti visi 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņi ar filtrātu.
11. Kad 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā savākta 0,5 ml tilpuma frakcija, statīvu ar stobriņiem pabīda tā, lai SEC kolonna pilētu nākamajā mikrocentrifūgas stobriņā.
12. 7. un 8. soli atkārti līdz sasniegta 20. frakcija.
13. Frakcijas var uzglabāt +4°C, bet ne ilgāk par 24 stundām.

### 2.2.18 Izdalīto frakciju raksturošana ar ZetaSizer

Lai raksturotu izdalīto daļiņu izmēru un relatīvo koncentrāciju no SEC kolonnām izdalītajās frakcijās, izmanto ZetaSizer Nano ZS analizatoru.

Nepieciešams: Vortekss tipa maisītājs, ZetaSizer, Zetasizer Software v7.11, caur izmēru izslēgšanas hromatogrāfiju iegūtās frakcijas, mikropipete, mikropipetes uzgaļi ar filtru, milliQ H<sub>2</sub>O, 0.02 μm filtrēts DEPC-PBS

1. ZetSizer iekārtu nepieciešams ieslēgt pusstundu pirms mērījumu sākšanas, lai iekārtā esošā aparatūra normalizētu temperatūru.
2. Iekārtā iekļauto kvarca kivete, pirms mērījuma sākšanas, nepieciešams skalot ar 1 ml buferšķīduma, kurā atrodas mērāmais paraugs. Šī darba ietvaros tiek izmantots 0,02 μm filtrēts 1x DEPC-PBS.
3. Datorprogrammu kalibrē nepieciešamajiem mērījumiem:
  - Iekārtas kalibrācijas laiks (*Equilibration time*) uz vienu minūti.
  - Jāveic 10 mērījumi ar diviem atkārtojumiem.
4. Mērāmās frakcijas mikrocentrifūgas stobriņu vorteksē 30 sekundes.
5. 20 mL parauga iepilda kvarca kivetē. Jāizvairās no burbuļiem kivetē.
6. Veic mērījumus un meklē frakciju kuras mērījumam nepieciešamais lāzera stiprums (*Attenuator*) ir <11, jo pie *attenuator* 11, frakcija var nesaturēt paraugu, arī tīram ūdenim uzrāda *attenuator*.11 Kad atrod frakciju ar *attenuator* zem 11, tad viena frakcija pirms tās tiek

izmantots kā EV frakciju sākumpunkts tālākai koncentrēšanai. Kā frakciju rindas beigu punktu izmanto frakciju, kurā vidējais daļiņu izmērs ir virs 40 nm un šāda izmēra daļiņas veido vismaz 80% daļiņu. Tas ļauj iegūt frakcijas, kas vairākumā satur EV un ir maz potencināli proteīnu piejaukumi.

7. Starp mērījumiem nepieciešams atsūkt kivetē iepildīto paraugu un izskalot kivetu ar 1 ml DEPC-PBS
8. Pēc mērījumu veikšanas, frakcijas kas ietilpst minētajos parametros uzskata par EV saturošām frakcijām.
9. Mērījumus beidzot, kivetu izskalo ar 1 ml DEPC-PBS.

### **2.2.19 Izdalīto EV frakciju koncentrēšana**

Nepieciešams: Vortekss tipa maisītājs, centrifūga, koncentrēšanas filtru stobriņi (Amicon Ultra 3k), 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņi, mikropipete, mikropipetes uzgaļi ar filtru.

1. Koncentrēšanas filtru stobriņos iepilda 500 µL atbilstošās frakcijas parauga.
2. Koncentrēšanas filtru stobriņus ar frakciju paraugiem nocentrifūgē 14000 g 10 minūtes pie +4°C
3. Atkārti 1. un 2. punktu līdz iekoncentrētas visas frakcijas, kas satur EV līdz 125 µL.
4. Koncentrēšanas filtru stobriņu filtra daļu uzmanīgi izņem no koncentrēšanas stobriņiem un apgriezot tos otrādāk jaunos savācējstobriņos, tos nocentrifūgē 1000 g divas minūtes pie +4°C, lai viss frakciju parauga koncentrāts atrastos stobriņu apakšā.
5. Izmantojot mikropipeti, pārbauda iekoncentrētās frakcijas parauga tilpumu. Ja tas ir mazāks par 125 µL, tad paraugam pievieno 0.02µm filtrētu DEPC-PBS līdz sasniegts šis tilpums un pēc tam paraugu vorteksē, lai iegūtu homogēnu EV suspensiju.
6. Iekoncentrēto frakciju paraugu sadala pa 25 µL piecos mikrocentrifūgas stobriņos.
7. Iegūtos EV koncentrātus uzglabā kelvinatorā pie -80 °C.

### **2.2.20 EV kvantificēšana ar nanodaļiņu izsekošanas iekārtu (NTA)**

EV daļiņu koncentrācijas noteikšanai izmanto NanoSight iekārtu (NTA) un NanoSight NTA Software v3.0 datorprogrammu.

Nepieciešams: 1x DEPC-PBS, 0,02 mm filtri, 1ml medicīnas šļirce, mikropipete,

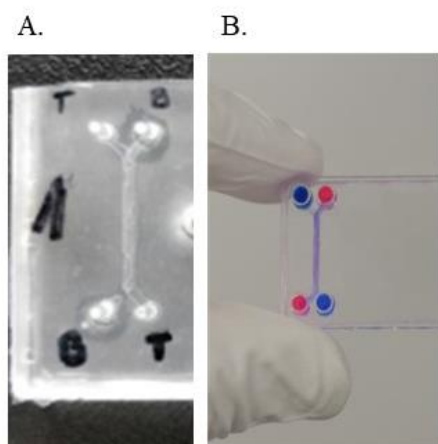
mikropipetes uzgaļi ar filtru, 10% etanols, milliQ H<sub>2</sub>O, 100 mm lateksa standarta lodītes.

1. Vismaz 30 minūtes pirms darba uzsākšanas nepieciešams ieslēgt NTA, lai iekārtas lāzers paspētu uzsilt.
2. Iepriekš sagatavo filtrētus (0,02 µm) 1x DEPC-PBS, milliQ H<sub>2</sub>O un 10% etanola šķīdumus, lai izvairītos no tajos esošo daļiņu ietekmes uz parauga mērījumiem.
3. Iepriekš sagatavo 1 ml EV parauga atšķaidījumu filtrētā 1x DEPC-PBS 1:50 atšķaidījumā. Atšķaidījumu, pēc nepieciešamības, sagatavo lielāku vai mazāku pēc pirmā mērījuma veikšanas, jo NanoSight iekārtai ir nepieciešams optimāls daļiņu skaits paraugā, savādāk iegūtie mērījumi var būt neprecīzi. Ja daļiņu vidējais skaits mērījuma vietā "*particles in frame*" ietilpst 10 līdz 90 robežās, mērījumu var neatkārtot. Ja daļiņas ir vairāk vai mazāk, veic jaunu 1 ml EV parauga atšķaidījumu ar pielāgotu proporciju.
4. Sagatavo darbam NTA paraugu kameru.
5. Uzstāda datorprogrammas mērījumu režīmu: +23°C temperatūra ar ieslēgtu temperatūras kontroli, mērījumi, 30 sekundes mērījums, Standarta mērījums "*standard measurment*".
6. Nomēra 100nm lateksa standarta lodītēs, lai pārlicinātos par izmēra pareizu detekciju.
7. Pirms mērījuma veikšanas, paraugu 30 sekundes vorteksē.
8. Izmantojot 1 mL medicīnas šļirci, 400 µl parauga iepilda NTA paraugu kamerā. Izvairās no burbuļu nokļūšanas paraugu kamerā. Medicīnas šļirci, mērījumu veikšanas laikā, atstāj pievienotu NTA paraugu kamerai.
9. Noregulē kameras jūtību un fokusu, lai redzamas daļiņas, kas iezīmējas ar zaļu krāsu, nepārsniedz 20% no visām redzamajām daļiņām un neizskatās izplūdušas. Starp mērījumiem, kameras jūtību nemaina, bet fokusu regulē pirms katra mērījuma veikšanas.
10. Veicot mērījumu, katras 30 sekundes pēc *advance sample* parādīšanās, nepieciešam paraugu ievadīt vairāk NTA paraugu kamerā, lai redzes laukā vairs nebūtu redzama jau izmērītā parauga daļa.
11. Starp paraugu mērījumiem NTA paraugu kameru skalo ar filtrētu 1x DEPC-PBS.
12. Veic papildus mērījumu ar paraugu nesaturošu 1x DEPC-PBS (*blank*), lai precizētu mērījumu rezultātus
13. Pēc mērījumu veikšanas NTA paraugu kameru skalo ar 10% etanolu un milliQ H<sub>2</sub>O

### 3. Rezultāti

#### 3.1 Zarnas uz čipa (GOC) modeļsistēmas izveide

Šī darba ietvaros tika optimizētas procedūras GOC funkcionalizēšanai ar bioloģisko materiālu, pielietojot standarta PDMS un OSTE/COC iekārtas. Šobrīd PDMS ir biežāk izmantotais materiāls GOC izveidei, līdz ar to šī darba ietvaros tika pārbaudīta GOC modeļa izveide bez PDMS iekārtā, lai pārbaudītu vai OSTE/COC hibrīdpolimēra veidotie orgānu čipi ir labāk piemēroti GOC kultivēšanai. OSTE/COC čips ir hibrīdpolimēra, jo veidots no diviem polimēriem. COC polimērs ir viens no standartpolimēriem, kas tiek izmantots *in vitro* šūnu kultūru sistēmu veidošanā, tam piemīt gan laba gaismas caurlaidība, gan gāzu necaurlaidība un tas neabsorbē mazās molekulas (Rimsa et al., 2021). Taču COC ir grūti prototipējams un ir komplicēti savienot divas COC detaļas, kas ir nepieciešams, lai izveidotu orgānu GOC, līdz ar to tas tika savienots, izmantojot OSTE polimēru. OSTE polimēram piemīt arī gāzu necaurlaidība un tas neabsorbē mazās molekulas, bet ņemot vērā, ka OSTE polimēram ir slikta gaismas caurlaidība, GOC tika veidots, izmantojot COC polimēru tā augšā un apakšā un OSTE sānos, lai apvienotu COC detaļas, tādā veidā nodrošinot zemu mazā molekulu absorbciju un anaerobus apstākļus. GOC sistēmu inženiertehisko izveidi veicis Dr.sc.ing Roberts Rimša (6A, B attēls) (Rimsa et al., 2021). Epitēlija slānim uz kura kultivē anaerobu zarnu mikrobiotu jānodrošina hipoksijas apstākļi, savukārt endotēlija slānim nepieciešami normoksiski apstākļi un tas nespēj izdzīvot hipoksijas apstāļos, līdz ar to visu orgānu čipu sistēmu nevar ievietot hipoksijas skapī un ir jānodrošina  $O_2$  gradients, nodrošinot dažādu gāzu sastāvu barotnes katram no kanāliem, ko nevar īstenot, izmantojot gāzu caurlaidīgu materiālu kā, piemēram, PDMS. Kā arī hipoksiskā vide un skābekļa gradients lūmenā ir kritiski nepieciešams arī normālai zarnu funkciju darbībai, piemēram, uzturvielu uzsūkšanās procesam (Konjar et al., 2021).



6.attēls. A – izveidotais PDMS GOC modelis, B – izveidotais OSTE/COC GOC modelis.

Figure6. A – PDMS GOC model, B – OSTE-COC GOC model.

GOC modeļi tikai veidoti, izmantojot gan PDMS, gan OSTE/COC orgānu čipus, izmantojot stabilās šūnu līnijas Caco2 un HUVEC. Šīs līnijas tika izvēlētas, jo abas ir stabilās šūnu līnijas, līdz ar to, tām ir neierobežots dalīšanās potenciāls un tās var ilgstoši audzēt, tām ir lētākas izmaksas un to kultivēšanas protokoli jau ir atstrādāti līdzšinējos eksperimentos laboratorijā, kurā autors darbojas, atšķirībā no primārajām zarnu epitēlija šūnu līnijām. Kā arī, neskatoties uz to, ka Caco2 ir kolorektālās adenokarcinomas šūnu līnija, tā joprojām spēj atveidot un daļēji atdarināt normālas resnās zarnu epitēlija funkcijas, kad tiek audzētas zem plūsmas, par ko liecina enterocītu diferenciācijas marķieru, kā Villin un ZO-1 ekspresijas palielināšanās un kriptu veidošanās (Creff et al., 2021).

Modeļusistēmas izveidē kā svarīgs solis ir orgānu čipa funkcionalizēšana ar cilvēka IV tipa kolagēnu, fibronektīnu un laminīnu, kas nodrošina ārpusšūnu matrika (ECM) funkcijas, lai spētu notikt šūnu adhēzija, pretējā gadījumā bez ECM šūnas aug būtiski sliktāk orgānu čipa kanāliņos un neveido tām raksturīgās morfoloģiskās struktūras.

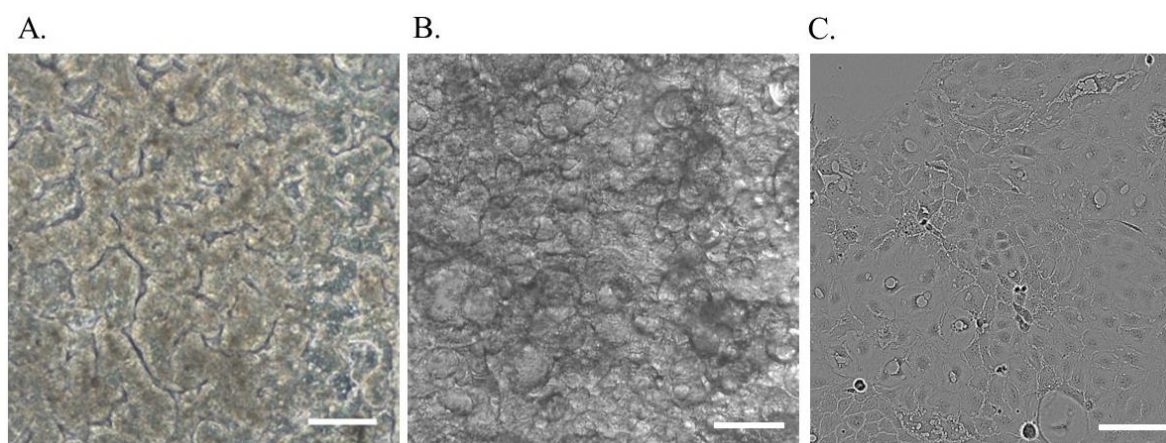
Šī darba ietvaros tika izmantots IV tipa kolagēns, kas iegūts no cilvēka placentas, fibronektīns, kas iegūts no cilvēka fibroblastiem un laminīns, kas iegūts no cilvēka plazmas, jo darba ietvaros tiek strādāts ar cilvēka šūnām un laboratorijā iepriekš veiktajos eksperimentos, kuros autors nav piedalījies, šī ECM kombinācija tika atlasīta kā labākā.

Pēc funkcionalizēšanas ar ECM ir iespējams sēt šūnas GOC kanālos. Pēc šādu darbību veikšanas čips attēlo ainu, kur endotēlija šūnas apņem epitēlija šūnas, kā tas notiek cilvēka organismā veidojoties zarnu-asins barjerai. Pētot mikrobiotas BEV ietekmi uz slimību patoģenēzi, tas būtu īpaši svarīgi, lai redzētu vai BEV nonāk cirkulācijā.

Līdzšinējos GOC pētījumos tiek apstiprināta kriptu un mikrobārkstiņu veidošanās pēc 3-21 dienu kultivēšanas GOC kanāliņos zem plūsmas (7A attēls) (Villeneuve et al. 2017), kas

būtiski atšķiras no Caco-2 šūnu līnijas veidotās morfoloģijas 2D kultūrās(7C attēls) (H. J. Kim & Ingber, 2013).

Tas parāda, ka neskatoties uz to, ka šūnas ir kolorektālā vēža izcelsmes, tām joprojām piemīt epiteliālo šūnu īpašības, kas tiek stimulētas zem plūsmas radītā stresa. Mums ir svarīgi izmantot šūnu līniju, kuras izcelsme ir resnā zarna, jo darba ietvaros tiek izdalīta zarnu mikrobiota no fēču paraugiem, savukārt fēču paraugos esošā mikrobiota galvenokārt reprezentē resnajā zarnā esošo mikrobiotas sastāvu (Donaldson et al., 2015). Tas ir nepieciešamais minimums pirmajiem zarnu mikrobiotas izdalīto BEV pētījumiem, pielietojot GOC. Arī mūsu gadījumā pēc četrus dienu kultivēšanas OSTE/COC čipos, kuri kultivēti normoksiskos apstākļos pie 2μl/min plūsmas, tika novērotas kriptu struktūras (7B attēls), kas darba ietvaros bija ļoti svarīgi, jo mikrobiotas baktērijas kolonizē kripta struktūrās.



7.attēls. A – Publikācijā parādītais Caco-2 veidotais monoslānis un kriptu struktūras pēc sešu dienu kultivēšanas PDMS GOC(Villenave et al., 2017), B – Caco-2 veidotais monoslānis un kriptu struktūras pēc četrus dienu kultivēšanas OSTE/COC GOC. C – Caco-2 morfoloģija pēc kultivēšanas 2D *in vitro* sistēmā ([https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=ecacc\\_gc](https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=ecacc_gc)). Mērogs 100μm.

Figure 7. A – Caco-2 monolayer and villi structures after cultured on PDMS GOC for six days shown in the publication(Villenave et al., 2017), B - Caco-2 monolayer and villi structures after cultured on OSTE/COC GOC for four days. C – Caco-2 morphology after cultured in 2D *in vitro* system ([https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=ecacc\\_gc](https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=ecacc_gc)) Scale 100μm.

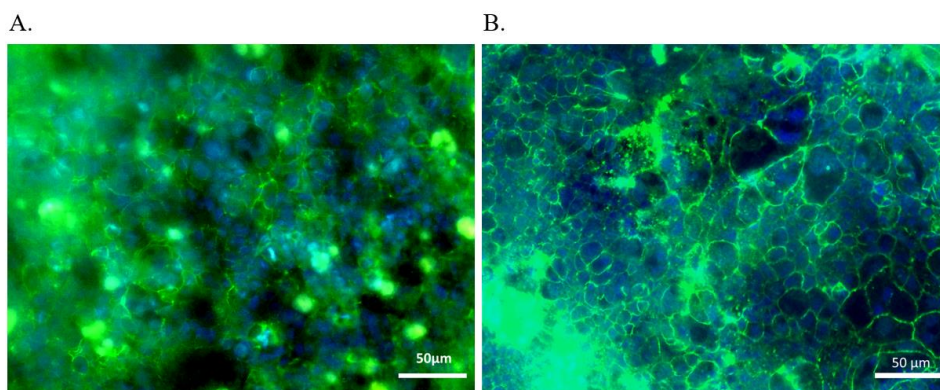
Lai novērotu Caco-2 šūnu kontaktzonas, funkcionālu monoslāni un šūnu izvietojumu uz PDMS un OSTE/COC GOC, tika veikta konfokālā mikroskopēšana, izmantojot šūnu marķierus un DAPI. Konfokālo mikroskopēšanu veica BSc.biol Fēlikss Rūmnieks uz konfokālā lāzerskenējošā mikroskopa (TCS SP8, Leica, Vācija).

Kanāli tika krāsoti ar primārajām antivielām pret ZO-1 jeb ciešo savienojumu proteīns-1

(tight junction protein-1), ko kodē cilvēka gēns TJP1 un kas tiek izmantots kā ciešu kontakzonu marķieris un liecina par funkcionāla epitēliāla slāņa veidošanos, kas ir nepieciešams Caco-2 gadījumā (McNeil, Capaldo and Macara 2006). CD31 jeb trombocītu endotēlija šūnu adhēzijas molekula (PECAM-1) tika lietota HUVEC šūnu iezīmei, jo tas ir endotēlija šūnu marķieris un apstiprina endotēliālo šūnu klātbūtni, endotēlija formēšanos, kā arī endotēlija šūnu starpšūnu savienojumus (Liu and Shi 2012).

Pēc Caco-2 imunofluorescences krāsošanas ar ZO-1 GOC tika secināts, ka ir izveidojies funkcionāls epitēlija slānis (8.attēls). OSTE/COC čipos pēc 4 dienu kultivēšanas tika novērota kriptu formēšanās (8A attēls), kamēr salīdzinot ar PDMS pēc 4 dienu kultivēšanas netika novērota kriptu struktūru formēšanās (8B attēls)

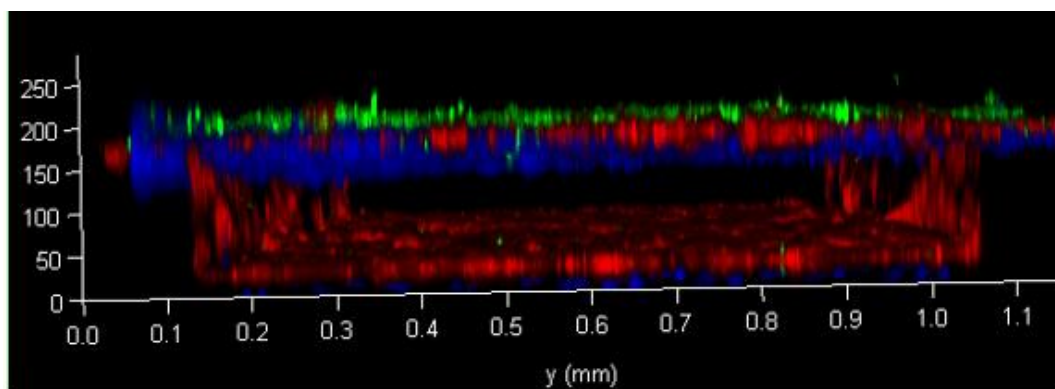
OSTE/COC orgānu čipā (8A attēls) ZO-1 krāsojums atsevišķās vietās ir ārpus fokusa un koncentrētāks salīdzinot ar 8B attēlu, kas liecina par 3D struktūrām uz membrānas, kamēr 8B attēlā ir skaidri redzams, ka šūnas uz PDMS GOC veido vairāk 2D raksturīgu monoslāni (JanssenDuijghuijsen et al., 2017), kas ir skaidrojams ar to ka uz PDMS GOC ir nepieciešams ilgāks laiks kamēr Caco-2 sāk veidot kriptu struktūras (Jalili-Firoozinezhad et al., 2019). Šie rezultāti apstiprina, ka ir izdevies iegūt reprezentatīvu zarnu epitēliju no Caco-2 šūnu līnijas uz COC/OSTE GOC ātrāk kā PDMS čipiem. Turpmākos salīdzināšanas eksperimentos abi čipi tika audzēti līdz arī uz PDMS izveidojās kriptu struktūras (dati nav attēloti). PDMS GOC gadījumā kriptu veidošanās tika novērota pēc 5 dienām, kas ir par 20% vēlāk kā OSTE/COC gadījumā.



8. attēls. A – Caco-2 šūnu līnijas veidotās kontaktzonas OSTE/COC GOC, iekrāsotas ar ZO-1 primāro antivielu un *Alexa fluor 488*. B – Caco -2 šūnu līnijas veidotās kontaktzonas PDMS GOC iekrāsotas ar ZO-1 primāro antivielu un *Alexa fluor 488*. Mērogs 50 μm.

Figure 8. A – Caco-2 cell lines tight junctions stained with ZO-1 primary antibody and *Alexa fluor 488* on OSTE/COC GOC. B – Caco -2 cell lines tight junctions stained with ZO-1 primary antibody and *Alexa fluor 488* on PDMS GOC. Scale 300 μm.

Pēc OSTE/COC GOC imūnfluorescences krāsošanas ar konfokālo mikroskopiju tika izveidots arī 3D kanāliņa šķērsriezuma attēls. Tika novērota epiteliālās-endoteliālās barjeras veidošanās un vaskulārā endotēlija formēšanās apakšējā kanāliņā (9.attēls). Ar DAPI iekrāsoti šūnu kodoli redzami zilā krāsā gan uz GOC membrānas virspuses un apakšas, gan endotēlija kanāla apakšā un nedaudz gar sāniem, kas bija sagaidāms. Attēlā redzams arī kā CD31 signāls (sarkans) aptver visu apakšējo kanālu, kas ir endotēlijam raksturīgais marķieris. Un tika novērotas arī Caco-2 šūnu kontaktzonas uz membrānas augšējā kanāliņā, kas iekrāsotas ar ZO-1 antivielu (zaļš).



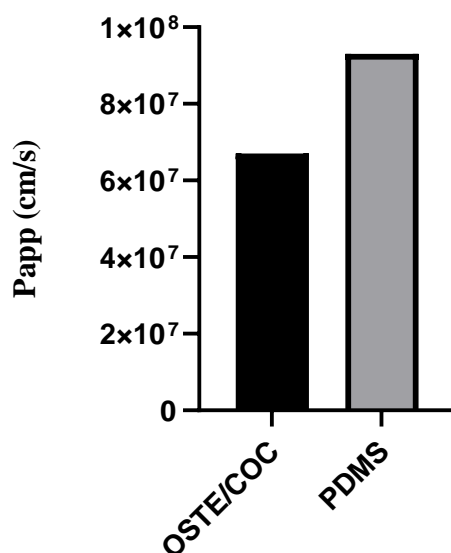
9.attēls. OSTE/COC GOC kanāliņa 3D modelis šķērsgriezumā. Zils – kodolu iezīme DAPI, zaļš - uz membrānas redzamo Caco-2 ciešo kontaktzonu iezīme ar ZO-1 un Alexa fluor 488, sarkans - HUVEC endotēlija šūnas apņem visu kanāla virsmu, veidojot vaskulāro endotēliju, CD31 iezīme ar Alexa fluor 568.

Figure 9. 3D model of OSTE/COC GOC channel crosssection. Blue – nucleus stain with DAPI, green – caco-2 tight junctions stain with ZO1 and *Alexa fluor 488*, red - HUVEC endothelial cells around the channel surface, representing vascular endothelium, CD31 stain with *Alexa fluor 568*.

Lai novērtētu epiteliālās-endoteliālās barjeras caurlaidību tika veikts *Cascade blue* barjeras integritātes tests. Tas mums ļauj novērtēt barjeras caurlaidību un apstiprināt funkcionālas epitēlija/endotēlija barjeras veidošanos orgānu čipos, salīdzinot to ar iepriekš publicētajām vērtībām. Kā arī novērot atšķirības barjeras integritātei PDMS un bez PDMS polimēra čipos. *Cascade blue* barjeras integritātes tests ir molekulas difūzijas eksperiments, kur pēc molekulas difundēšanas no augšējā uz apakšējo kanālu var noteikt barjeras integritāti. Pievienojot *Cascade blue* barotnes rezervuārā pēc 24h, ir iespējams ievākt GOC cauri izplūdušo barotni un nomērot absorbciju novērot cik daudz molekulas ir augšējā, cik apakšējā kanālā, pēcāk aprēķinot barjeras caurlaidību. *Cascade blue* tika pievienots pēc trīs dienu PDMS un OSTE/COC GOC kultivēšanas normoksiskos apstākļos. Trīs dienu laika periods tika izvēlēts, lai iegūtos datus varētu salīdzināt ar iepriekš publicētiem datiem, kuri tika veikti pēc trīs dienu kultivēšanas. Kā redzams 10.attēlā, *Cascade blue* tests uzrādīja par 28% labāku barjeras

integritāti OSTE/COC iekārtā salīdzinot ar PDMS, kas iespējams skaidrojams ar materiālu īpašībām mazo molekulu absorbcijā no barotnes, kas samazina to daudzumu šūnām. Mūsu PDMS šis mērījums daļēji sakrīt ar iepriekš publicētajām vērtībām GOC PDMS pēc 3 dienu kultivēšanas normoksiskos apstākļos (Jalili-Firoozinezhad et al., 2019).

### Bioloģiskās barjeras novērtējums ar *Cascade blue*



10.attēls. *Cascade blue* barjeras integritātes testa mērījumi OSTE/COC un PDMS GOC pēc 3 dienu kultivēšanas.

Figure 10. *Cascade blue* barrier assay measurements in OSTE/COC and PDMS GOC at day 3 after seeding.

### 3.2 Dzīvas anaerobas mikrobiotas izdalīšana un kultivēšana GOC

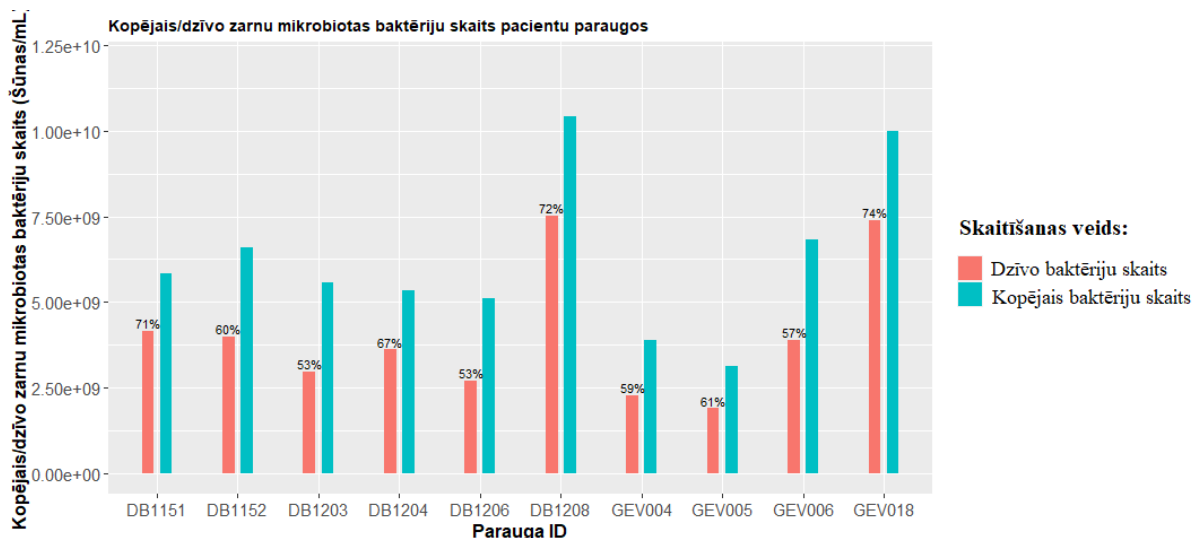
Lai pārbaudītu anaerobas mikrobiotas kultivēšanu izveidotajos GOC tika ievākti fēču paraugi anaerobās mikrobiotas izdalīšanai no kuņģa vēža pacientiem un veseliem donoriem. Paraugu ievākšana notika saskaņā ar Centrālās Ētikas un Medicīnas komitejas atļauju, kas tika iegūta Nr.: lzp-2020/2-0380 projekta ietvaros. Tika ievākti četri kuņģa vēža (GaCa) pacientu paraugi, visi pacienti bija 60-80 gadus veci, ar vīriešu/sieviešu attiecību 1/3 (1 vīrietis un 3 sievietes) un atbilstoši seši veselu donoru (HD), kas atbilda pēc vecuma un dzimuma (pacientu vidējais vecums 60-80 gadi, pēc dzimuma viens vīrietis un piecas sievietes). Pēc Latvijas slimību un profilakses centra datiem veseli donori iepriekš nav slimojuši ar onkoloģiskām slimībām, diabētu, kā arī nebija lietojuši antibiotikas un kortizoīdos sterioīdus vismaz 3 mēnešus pirms paraugu ievākšanas, ņemot vērā ka šie rādītāji varētu ietekmēt mikrobiotu un iegūtos rezultātus. Ievāktu paraugu daudzumu ietekmēja Latvijas veselības aprūpes sistēmas

pārslodze 2021.gada laikā, ņemot vērā COVID-19 pandēmijas uzliesmojumus. Kā arī kuņģa vēža pacienti bieži ir gados veci un ar smagu slimības gaitu, kas apgrūtina paraugu ievākšanas procesu, taču šobrīd ievāktais paraugu daudzums ir pietiekams sākotnējiem mikrobiotas pētījumiem. Kuņģa vēža pacientu paraugi tika izvēlēti, jo ir pierādīts, ka mikrobiotas sastāvs zarnās negatīvi spēj ietekmēt tā kancerogēnēzi (Liu et al., 2021), kā arī kuņģa vēzis ir ceturtais izplatītākais vēža veids un “Pasaules veselības organizācijas” dati liecina, ka 2020.gada laikā atklāti 1.09 miljoni jauni kuņģa vēža gadījumi un tas izraisījis 769000 nāves gadījumu 2020. gada laika periodā (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>). Šī darba ietvaros ir nepieciešami gan GaCa, gan HD pacientu paraugi, lai varētu novērtēt vai BEV saturs RNS līmenī, kas šķērso epiteliālo-endoteliālo barjeru atšķiras starp šīm grupām. Protams, mikrobiotas sastāvs katram cilvēkam ir unikāls un nebūs iespējams atrast kādu konkrētu RNS, taču tādējādi var novērot vai RNS, kas ir šķērsojusi barjeru spēj attainot tos mikroorganismus, kuri sastopami zarnās.

GaCa paraugi tika ievākti Rīgas Austrumu Klīniskās universitātes slimnīcā, Latvijas Onkoloģijas centrā, savukārt HD pacienti paraugus ievāca paši mājas apstākļos, sekojot GutAlive komplekta protokolam. Paraugi tika uzglabāti GutAlive uzglabāšanas traukā istabas temperatūrā un tika transportēti tajā pašā dienā, kad paraugi tika ievākti vai atsevišķos gadījumos 24h pēc ievākšanas, ņemot vērā, ka šie ievākšanas trauki nodrošina anaerobu vidi līdz 72h. GutAlive trauki tika izvēlēti, jo tie nodrošina anaerobus apstākļus parauga uzglabāšanai un transportēšanai, kas ir svarīgi, jo lielākā daļa no mikrobiotas sastāv tieši no anaerobām baktērijām, līdz ar to uzglabājot šos paraugus aerobos apstākļos, tas novestu pie baktēriju nāves (Martínez et al. 2019). Tas tiek nodrošināts pateicoties komerciālā GutAlive komplekta specifikai un komplektā iekļautajām granulām, kas veido anerobisko reaģentu, kurš absorbē skābekli. Diemžēl nav zināms konkrēts šo granulu sastāvs, jo produkts ir patentēts.

Lai noteiktu baktēriju daudzumu, dzīvotspēju un to vai procedūras laikā ir izdalītas anaerobas baktērijas, tika veikta plūsmas citometrija, taču darba autors nav piedalījies šajos eksperimentos. Dzīvo/mirušo baktēriju skaitīšana ar *live/dead bacteria viability kit* (“LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy”) tika veikta uz augstas izšķirtspējas plūsmas citometra Amnis® ImageStream®XMark II (Luminex) pie sadarbības partnera Dr.pharm Vadima Parfējeva kopā ar autora kolēģi BSc. biol Jāni Plūmi. Tā darbības princips balstās uz baktēriju membrānas integritāti. Komplektā ir iekļauts gan propīdija jodīds, gan SYTO9 krāsviela. Baktērijas ar bojātu membrānu tiek uzskatītas par mirušām un iekrāsojas sarkanas, taču dzīvās baktērijas tik iekrāsojas zaļas. SYTO9 spēj saistīties gan ar dzīvo, gan mirušo baktēriju DNS un iekrāso tās zaļas, taču propīdija jodīds baktērijā, kurai ir bojāta

membrāna aizvieto SYTO9, aizstājot zaļo fluorescenci ar sarkano, līdz ar to, kad baktēriju suspensija tiek apstrādāta ar šīm divām krāsvielām, dzīvas baktērijas iekrāsojas zaļas, savukārt mirušas sarkanas. Dzīvo/mirušo baktēriju skaitu ir svarīgi noteikt, lai varētu spēt novērtēt, cik daudz baktēriju ir izdzīvojušas un, lai tālāk kultivējot baktērijas uz GOC varētu zināt aptuveno baktēriju koncentrāciju, kas ir nepieciešams, lai inokulētu GOC (11. attēls).



11.attēls. Kopējais un dzīvo baktēriju skaits paraugos pēc mikrobiotas izdalīšanas, noteikts ar plūsmas citometriju. DB – veselo donoru paraugu kods, GEV – kuņģa vēža pacientu paraugu kodi.

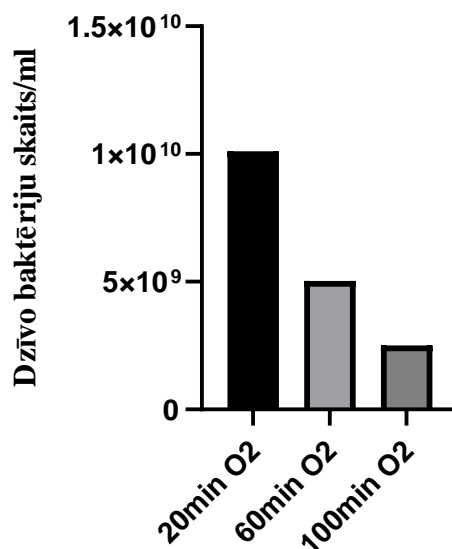
Figure 11. Total and live bacteria count in samples after microbiota isolation, determined with flow cytometry. DB – healthy donors sample codes, GEV – gastric cancer patient codes.

Visos izolētajos paraugos bija vairāk nekā 50% dzīvotspējīgas mikrobiotas. Procentuāli izdalītais dzīvo baktēriju skaits paraugos variēja no 53-74% dzīvotspējīgu baktēriju (11.attēls), ko var skaidrot ar katra parauga apstrādei veltīto laiku, gan kopējo baktēriju sastāvu paraugos un to skābekļa toleranci, taču šie rezultāti liecina par veiksmīgu protokola izpildi un atbilst līdzšinējiem pētījumu rezultātiem par dzīvas zarnu mikrobiotas izdalīšanu no fēcū paraugiem (Bellali et al., 2019)

Kad tika noskaidrota baktēriju dzīvotspēja un secināts, ka visos paraugos izdalīta vismaz 50% dzīvotspējīgas mikrobiotas, tika veikts eksperiments lai pārlicinātos par anerobo baktēriju klātbūtni (12.attēls). Eksperimenta gaitā tika veikta dzīvo mirušo baktēriju krāsošana un apskate plūsmas citometrā, lai novērotu dzīvās mikrobiotas dinamiku laika periodā pakļaujot tās aerobai videi. Rezultāti parādīja, ka baktēriju dzīvotspēja samazinās palielinoties laikam, ko baktērijas pavada aerobā vidē (12.attēls). Dzīvo baktēriju skaits bija  $\sim 1.01 \cdot 10^{10}$  ml pēc 20min aerobos apstākļos, kas ir arī minimālais laiks, kas nepieciešams, lai veiktu baktēriju krāsošanu. Pēc 1h aerobos apstākļos dzīvo baktēriju skaits bija samazinājies par aptuveni 50% līdz  $5.03 \cdot 10^9$  ml, savukārt palielinot laiku līdz 100min, dzīvo baktēriju skaits bija samazinājies jau par 75%

salīdzinot ar pirmo mērījumu jeb  $2.5 \times 10^9$  ml. Baktēriju dzīvotspējas samazināšanās aerobos apstākļos liecina par anaerobu baktēriju esamību paraugos, kas atbilst iepriekš publicētajiem rezultātiem (Bellali et al., 2019).

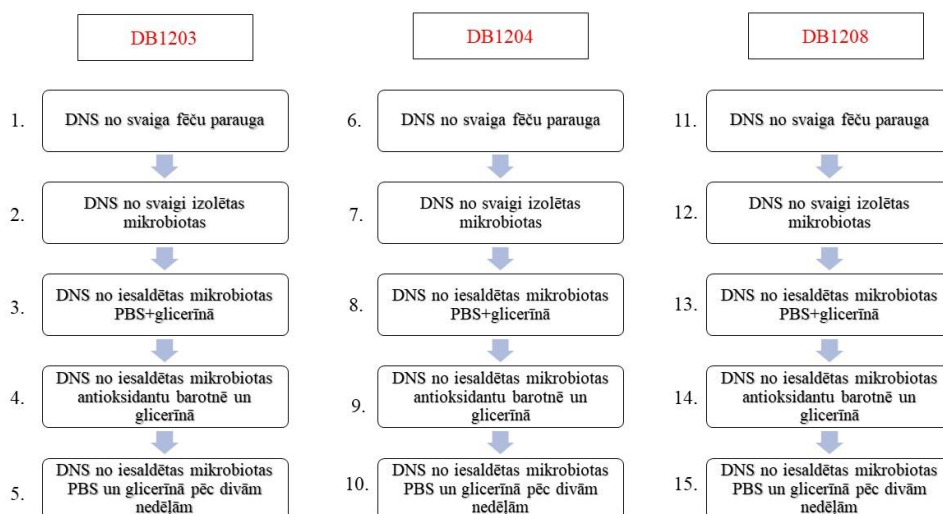
### Baktēriju dzīvotspējas samazināšanās aerobos apstākļos



12.attēls. Kopējais dzīvo baktēriju skaits/ml pēc parauga pakļaušanas skābekļa iedarbībai dažādos laika punktos.

Figure 12. Total live bacteria count cells/ml after sample exposure to oxygen in multiple time points.

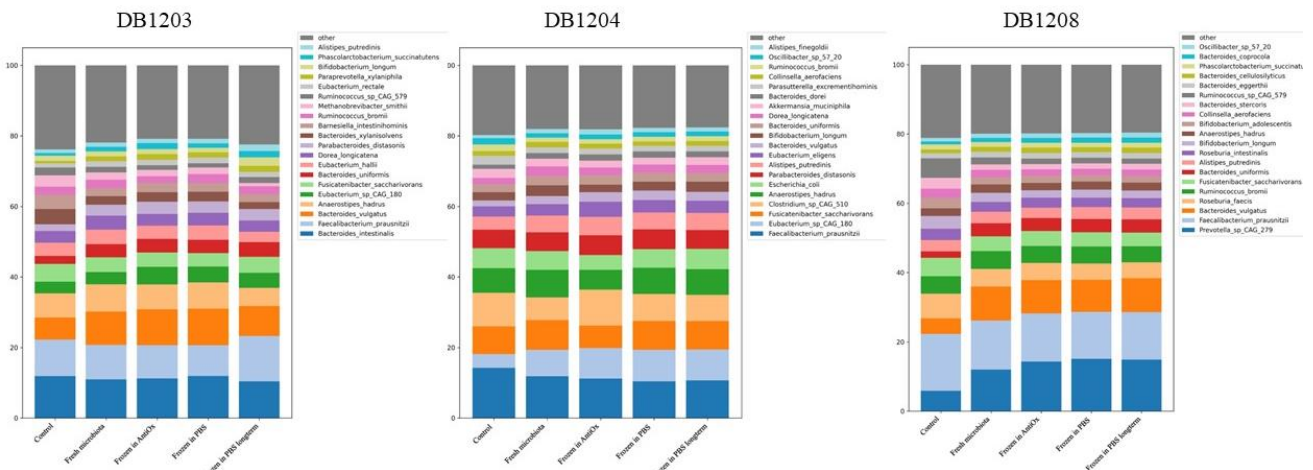
Tālāk, lai analizētu, kā dzīvas mikrobiotas izdalīšana un iesaldēšana ietekmē baktēriju sugu dinamiku tika veikta metagenoma sekvencēšana. Tika izdalīts DNS no trīs HD svaigiem fēču paraugiem kā kontrole, kā arī no svaigi izolētas mikrobiotas. DNS tika izdalīts arī no iesaldētas mikrobiotas divās dažādās barotnēs - PBS+glicerīns un antioksidantu barotne+glicerīns pēc 24h, un iesaldētas mikrobiotas pēc 2 nedēļu laika perioda PBS+glicerīnā. Kopumā tika izveidotas un sekvencētas 15 metagenomu bibliotēkas (13. attēls). Darba autors nav piedalījies paraugu sekvencēšanā, bibliotēku veidošanā un datu analīzē, taču šie rezultāti bija nepieciešami, lai turpinātu darbu pie mikrobiotas inokulēšanas GOC. Bibliotēku konstruēšanu veica BSc. Jānis Plūme, sekvencēšanu veica Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā (LBMC) esošais Genoma Centrs un datu analīzi veica LBMC Bioinformātikas centrs.



13.attēls. Izmantotie paraugi metagenoma bibliotēku veidošanā.

Figure 13. Samples used for metagenomic library construction.

Grafikos redzami iegūti sekvenčšanas dati 15 paraugiem (14.attēls). Sugu daudzveidība un daudzums visos paraugos korelē un nav ievērojamu atšķirību. Līdz ar to tika secināts, ka izdalīšanas protokols ir veikts veiksmīgi un dzīvas zarnu mikrobiotas izdalīšana un iesaldēšana neietekmē baktēriju sugu dinamiku. Arī relatīva ilgtermiņa iesaldēšana nenodara kaitējumu, kā arī nav novērojamas būtiskas atšķirības starp PBS un antioksidantu barotni, līdz ar to turpmāk mikrobiotas iesaldēšanai tika izmantots PBS+glicerīns, kas ir gan vienkāršāk izmantojams, gan lētāks. DB1203 pacienta paraugā no 20 dominantajām iegūtajām baktēriju sugām viena – *Bifidobacterium longum*, ir identificēta kā mikroaerotolerants anaerobs, visas pārējās iegūtās dominantās baktēriju sugas pieder anaerobiem mikroorganismiem. Arī DB1204 pacienta paraugā tika identificēta *Bifidobacterium longum* un arī *Escherichia coli*, kurš ir fakultatīvs anaerobs, pārējās 18 dominantās iegūtās baktēriju sugas tika apstiprināti kā anaerobi. Līdzīgi arī DB1208 pacienta paraugā no 20 dominantajām sugām vienīgais mikroaerotolerantais anaerobs bija *Bifidobacterium longum*. Šie dati atkārtoti apstiprina anaerobas zarnu mikrobiotas izdalīšanu, uzrādot vairāk nekā 90% anaerobu baktēriju klātbūtni paraugos, kas ir īpaši svarīgi, jo no fēču paraugiem iegūtā zarnu mikrobiota galvenokārt reprezentē resnajā zarnā esošo mikrobiotas sastāvu, kuri pieder anaerobiem mikroorganismiem.



14.attēls. Baktēriju sugu dinamika mikrobiotas paraugos. X ass – dažādi apstrādāti mikrobiotas paraugi (kontrolē, svaiga mikrobiota, iesaldēta mikrobiota pēc 24h antioksidantu barotnē, iesaldēta mikrobiota pēc 24h PBS, iesaldēta mikrobiota PBS pēc divām nedēļām), y ass – baktēriju sugu daudzuma sadalījums procentos.

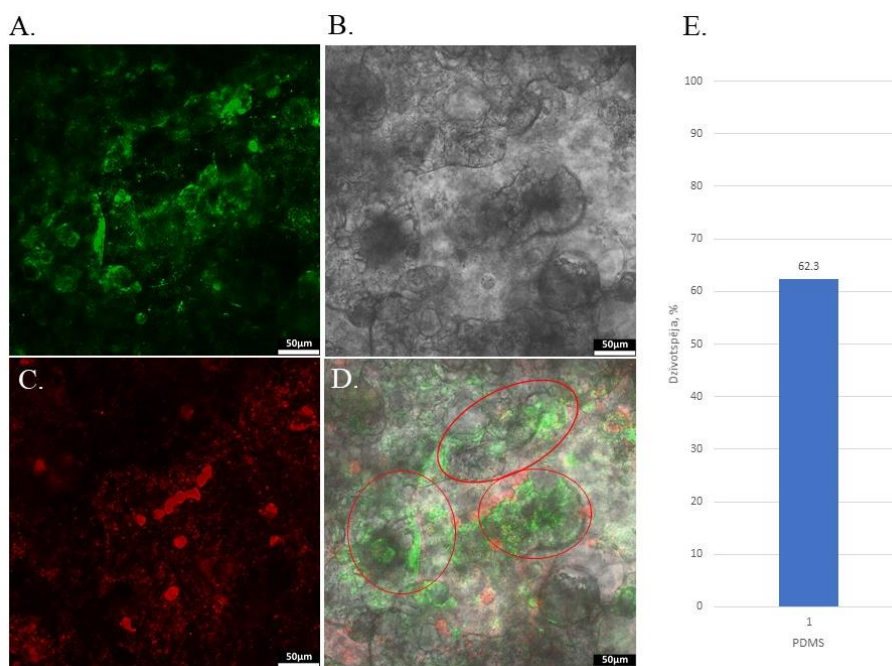
Figure 14. Dynamics of bacterial species in microbiota samples. X axis – differently treated microbiota samples (control, fresh microbiota, frozen in antioxidant medium after 24h, frozen in PBS after 24h, frozen in PBS after two weeks), y axis – quantity distribution of bacterial species in percents.

### 3.3 Dzīvas, anaerobas mikrobiotas kultivēšana GOC

Balstoties uz iepriekš veiktajiem mikrobiotas pētījumiem, izmantojot GOC tika noteikta koncentrācija dzīvu baktēriju kultivēšanai (Jalili-Firoozinezhad et al., 2019), kas ir  $1 * 10^7$  dzīvas baktērijas/ml. Atšķaidījums tika izveidots dzīvai anaerobajai mikrobiotai, pievienojot attiecīgu tilpumu Caco2 šūnu līnijas barotni bez antibiotikām un balstoties uz iepriekš iegūtajiem datiem, mikrobiotas pievienošana čipam tiek veikta 20min laikā, tādējādi būtiski neietekmējot baktēriju dzīvotspēju.

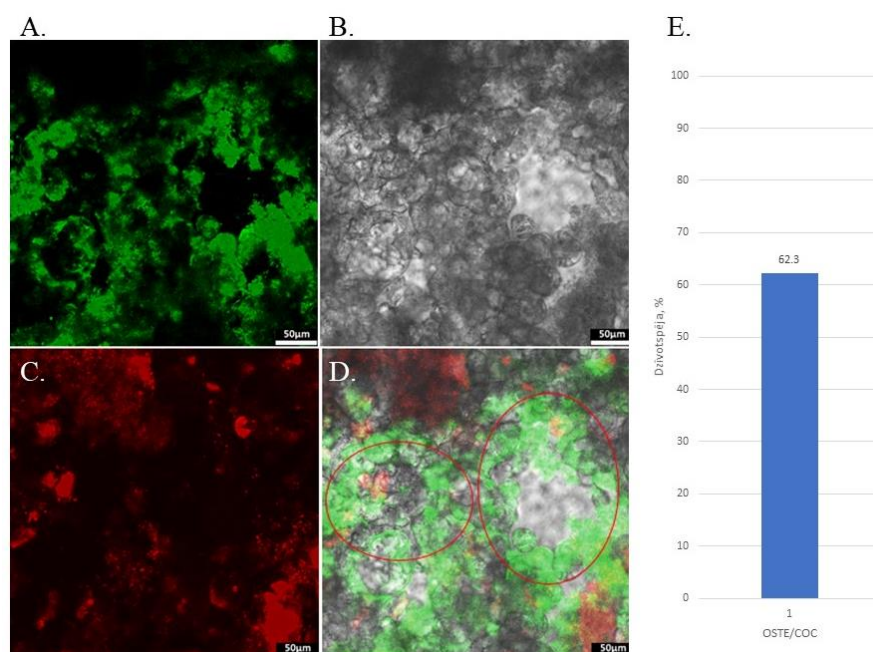
Lai pārbaudītu, vai mūsu izstrādātais OSTE/COC GOC ir piemērots anaerobās mikrobiotas audzēšanai un vai mēs spējam vizualizēt tajā dzīvas baktērijas, kuras ir bijušas spējīgas piestiprināties un kolonizēt GOC kriptu struktūrās, tika audzēti PDMS un OSTE/COC hibrīdpolimēra GOC modeļi. Čipi tika funkcionālizēti pēc iepriekšējiem protokoliem ar stabilām šūnu līnijām. Pēc piecu dienu kultivēšanas PDMS gaismas mikroskopā tika novērota bārkstiņu struktūru un kriptu formēšanās (15B attēls), savukārt OSTE/COC pēc četrus dienu kultivēšanas (16B attēls). Pēc abu čipu funkcionālizēšanas un 3D šūnu struktūru novērošanas augšējais kanāls tika kultivēts ar hipoksisku Caco-2 barotni bez antibiotikām, bet apakšējais kanāls tika kultivēts ar normoksisku bez antibiotiku HUVEC barotni, lai veidotu skābekļa gradientu GOC, kam sekoja dzīvotspējīga anaerobās zarnu mikrobiotas sēšana un kultivēšana augšējā kanālā. Pēc 24 stundām tika novērtēta mikrobiotas dzīvotspēja ar LIVE/DEAD BacLight komplekta testu (15A, 15C, 16A, 16C attēli), kas parādīja, ka OSTE/COC GOC

dzīvotspēja ir labāka nekā PDMS GOC respektīvi 62,3% dzīvu baktēriju no kopējā baktēriju daudzuma OSTE/COC un 51,4% PDMS dzīvotspējīgu baktēriju, ko varētu izskaidrot ar labāku skābekļa gradientu OSTE/COC, ņemot vērā gāzu necaurlaidīgā materiāla īpašības (15E un 16E attēli). Kā arī uz OSTE/COC kriptas struktūras bija daudz izteiktākas un ap tām kolonizēja lielākas baktēriju kolonijas, salīdzinājumā ar PDMS (15D un 16D attēli). Šie rezultāti liecina, ka PDMS nesaturošs GOC ir iespējami labāk piemērots anaerobās zarnu mikrobiotas kultivēšanai.



15.attēls A – BacLight kit dzīvo baktēriju iezīme PDMS GOC. B – PDMS GOC gaismas mikroskopa attēls. C – BacLight kit mirušo baktēriju iezīme PDMS GOC. D – Kombinēts dzīvo, mirušo baktēriju un gaismas mikroskopijas attēls PDMS GOC, ar sarkanu norādīta dzīvo baktēriju kolonizēšana kriptas struktūrās. E – Mikrobiotas dzīvotspēja procentos pēc 24h kultivēšanas PDMS GOC balstoties uz dzīvo/mirušo baktēriju analīzi.

Figure 15. A – BacLight kit live bacteria stain of PDMS GOC microbiota culture. B – BacLight kit dead bacteria stain of PDMS GOC microbiota culture. C – Bright field image of PDMS GOC microbiota culture. D – Combined Live, Dead and Bright field images of PDMS GOC microbiota culture, red circles show live bacteria localization in crypt structures. E – Microbiota viability in percents after 24h cultivation in PDMS GOC determined with live/dead bacteria analysis.



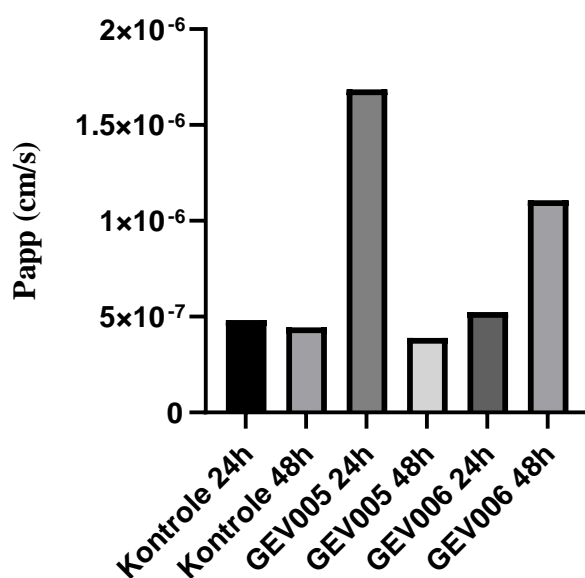
16.attēls A – BacLight kit dzīvo baktēriju iezīme OSTE/COC GOC. B – OSTE/COC GOC gaismas mikroskopa attēls. C – BacLight kit mirušo baktēriju iezīme OSTE/COC GOC. D – Kombinēts dzīvo, mirušo baktēriju un gaismas mikroskopijas attēls OSTE/COC GOC, ar sarkanu norādīta dzīvo baktēriju kolonizēšana kriptā struktūrās. E – Mikrobiotas dzīvotspēja procentos pēc 24h kultivēšanas OSTE/COC GOC balstoties uz dzīvo/mirušo baktēriju analīzi.

Figure 16. A – BacLight kit live bacteria stain of OSTE/COC GOC microbiota culture. B – BacLight kit dead bacteria stain of OSTE/COC microbiota culture. C – Bright field image of OSTE/COC GOC microbiota culture. D – Combined Live, Dead and Bright field images of OSTE/COC GOC microbiota culture, red circles show live bacteria localization in crypt structures. E – Microbiota viability in percents after 24h cultivation in OSTE/COC GOC determined with live/dead bacteria analysis.

Tā kā iepriekš prezentētie rezultāti tomēr nav pietiekami, lai līdz galam apstiprinātu vai mūsu izveidotie GOC ir piemēroti tieši anaerobas mikrobiotas kultivēšanai, jo to var ietekmēt arī krāsošanas un vizualizēšanas procedūra, kā arī tas neko nepasaka par sugu dinamiku, tika veikta arī metagenoma sekvencēšana mikrobiotai, kas kultivēta GOC OSTE/COC 72 h. Mikrobiota no diviem kuņģa vēža pacientiem (GEV005/GEV006) tika kultivēta uz diviem orgānu čipa kanāliņiem, savukārt viens kanāls tika izmantots kā kontrole uz kura netika kultivēta mikrobiota. Kontrole bez mikrobiotas nepieciešama, lai pārliicinātos, ka iegūtie metagenomiskie dati nenāk no kontaminācijas. DNS izdalīšanu no GOC kanāliem un metagenoma bibliotēku konstruēšanu arī veica BSc.biol Jānis Plūme. Šobrīd tiek gaidīti sekvencēšanas dati, lai novērtētu mikrobiotas dinamiku laikā (72h), kultivējot uz čipa. Pirms sekvencēšanas kanālos tika noteikta arī barjeras integritāte ar *Cascade blue* pēc 24 un 48h, lai noskaidrotu kā mikrobiotas audzēšana kanālos ietekmē to (17.attēls). Tika novērots, ka kontrolei barjeras integritāte laika gaitā būtiski nemainījās, kas sakrīt ar sagaidāmo rezultātu, kamēr abiem GaCa pacientu mikrobiotas uzrādīja diametrāli pretējus rezultātus. GEV005 barjeras integritāte samazinājās pēc 24h, bet atgriezās kontroles līmenī pēc 48h, kas var būt

skaidrojams ar mikrobiotas inokulāciju, kas tiek veikta manuāli un iespējams ar pipetēm tiek nedaudz traumēts epitēlija slānis, ko nākotnē varētu atrisināt ar automatizētu mikrobiotas inokulāciju izmantojot kontrolētu plūsmu. Kamēr GEV006 gadījumā barjeras integritāte pēc 24h bija kontroles līmenī taču samazinājās pēc 48 h, kas varētu liecināt, ka šī pacienta mikrobiotā ir disbioze, kas veicina barjeras integritātes samazināšanos, kā tas ir novērojams *leaky gut* gadījumos (Apostolou et al., n.d.). Taču uz šiem jautājumiem galējo atbildi varēs sniegt tikai tad, kad tiks saņemti metagenoma skevenēšanas dati pēc kultivēšanas uz GOC. *Cascade blue* tests netika veikts pēc 72h, kad tika izdalīts DNS no kanāliem, jo barotne no pēdējam 24h tika izmantota ārpusšūnu vezikulu izdalīšanai (EV), lai noskaidrotu vai nākotnē šī platforma ir piemērota BEV analīzei.

### Bioloģiskās barjeras novērtējums ar *Cascade blue*



#### Laiks pēc mikrobiotas uzsēšanas kanālos

17.attēls. *Cascade blue* barjeras integritātes testa mērījumi GOC pēc 24h un 48h mikrobiotas kultivēšanas kanālos.

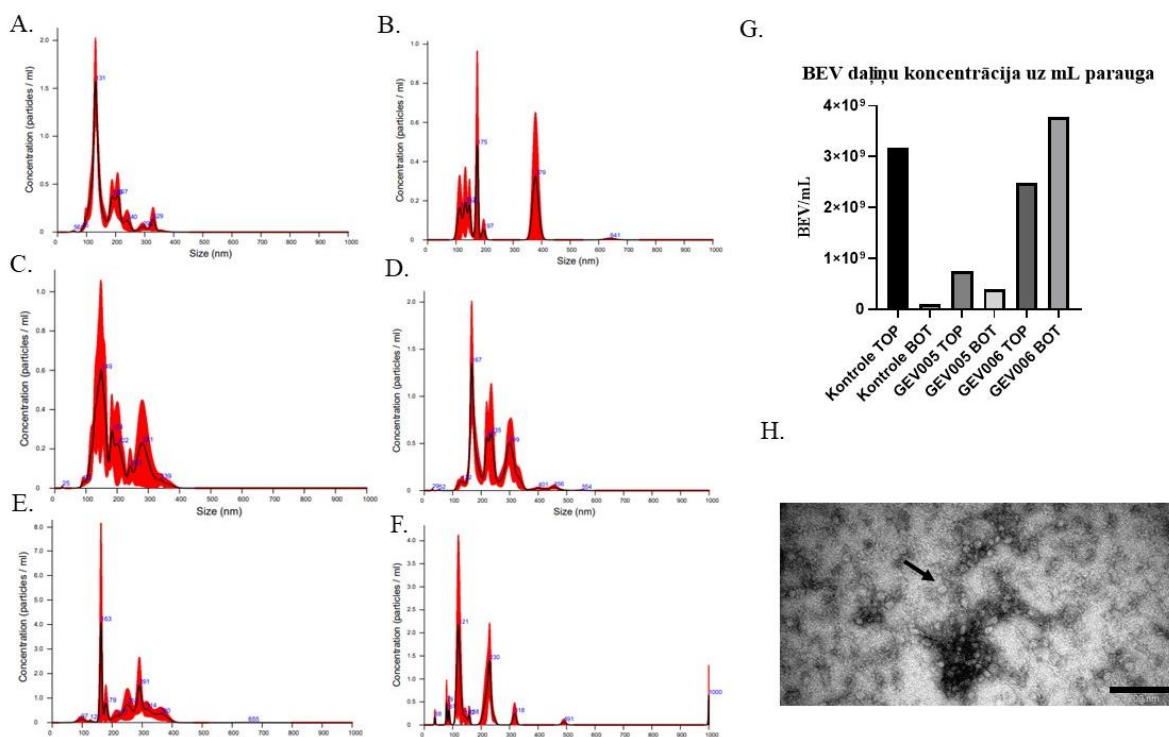
Figure 17. *Cascade blue* barrier assay measurements in GOC after 24h and 48h after microbiota seeding in channels.

### 3.4 EV izdalīšana un analīze no OSTE/COC GOC

Pēc trīs dienu mikrobiotas kultivēšanas uz COC/OSTE GOC tika veikts nākamais eksperiments. Tika ievākta GOC kanāliņiem cauri izgājusi barotne pēc pēdējam 24h, lai no tās varētu izdalīt EV. EV tika izdalītas, izmantojot lieluma izslēgšanas hromatogrāfiju (SEC) un SEC IZON kollonas. Lai novērtētu EV izmērus, koncentrāciju un morfoloģiju pēc izdalīšanas to analīzei tika izmantots NTA un TEM (*Transmission electron microscopy*).

18A, B attēlos redzams izdalīto EV izmēru sadalījums pēc NTA datiem kontroles paraugam bez mikrobiotas klātbūtnes, savukārt 18C,D un 18E,F attēlos redzams izmēru sadalījumos paraugos no kanāliem uz kuriem tika kultivēta GaCa pacientu mikrobiota. Salīdzinot izmēru sadalījumu starp kontroli un mikrobiotas kanāliem, var novērot, ka mikrobiotas augšējās (zarnu lumens) kanālos izdalītajām EV ir lielāki, nekā kontroles kanālam, īpaši izteikti 18C un D attēlā, kas iespējams skaidrojams ar to, ka šajos paraugos dominē BEV. Tomēr viennozīmīgi nevar apgalvot, ka ir izdalītas EVs, kas satur BEV, jo tās pārklājas izmēros ar eikariotu izdalītajām EVs (20-400nm). Kā arī ar TEM ir apstiprināta daļiņu klātbūtne paraugos un EV raksturīgā kausveida morfoloģija (18H attēls). Galējai BEV apstiprināšanai būtu nepieciešama vismaz EV satura analīze RNS līmenī, par cik BEV šobrīd nav zināmu specifisku BEV marķieru.

Tālāk tika analizēts izdalīto EV daudzums (18G attēls). Kontroles augšējā kanāliņā izdalīto EV koncentrācija bija par 30 reizēm lielāka nekā apakšējā kanālā, kas iespējams ir skaidrojams ar Caco-2 enterocītu dabu. GEV005 GaCa mikrobiotas gadījumā augšējā kanālā EV daudzums bija par divām reizēm vairāk, kamēr EV daudzums kontroles parauga augšējā kanālā ir lielāks, kā kanālā ar mikrobiotu, kam varētu būt vairāki iemesli, kā piemēram, tas, ka baktērijas kultivētas epitēlija slānī to spēj ietekmēt, kas samazina EV izdalīšanos. GEV006 gadījumā rezultāti bija pretēji, apakšējā kanāliņā izdalīto vezikulu daudzums bija par 1,5 reizēm lielāks nekā augšējā, kas visticamāk ir tāpēc, ka ir nepietiekama barjeras integritāte, salīdzinot ar *Cascade blue* datiem 17. attēlā, respektīvi, ir palielināta caurlaidība un EV spēj nekontrolēti nonākt endotēlija kanāliņā. Kā arī, jāņem vērā, ka katram indivīdam ir unikāls mikrobioms un katra baktērija spēj savādāk ietekmēt eikariotus, tāpēc arī lielumi un koncentrācijas starp dažādiem paraugiem variē. Šajā gadījumā svarīgāk būtu noteikt vai BEV RNS sastāvs, kas ir šķērsojis barjeru un nokļuvis asinīs reprezentē zarnās esošo mikrobiotu. Šobrīd tiek optimizēta BEV satura RNS sekvencēšana, kas tiks salīdzināta ar metagenomu. Optimizāciju veic BSc.biol Jānis Plūme.



18.attēls. A – BEV izmēru sadalījums augšējā kontrolē kanālā pēc NTA, B – BEV izmēru sadalījums apakšējā kontrolē kanālā pēc NTA, C - BEV izmēru sadalījums no GEV005 augšējā kanālā pēc NTA, D - BEV izmēru sadalījums GEV005 apakšējā kanālā pēc NTA, E - BEV izmēru sadalījums GEV006 augšējā kanālā pēc NTA, F - BEV izmēru sadalījums GEV006 apakšējā kanālā pēc NTA, G - NTA kvantitatīvie dati par BEV koncentrāciju uz ml parauga. H – reprezentatīvs izdalīto EV TEM attēls no augšējā kanāla uz kura kultivēta mikrobiota, bultiņa norāda uz EV, mērogs 200nm. TOP – augšējais kanāls. BOT – apakšējais kanāls, GEV005/GEV006 – kuņģa vēža pacientu izdalītās mikrobiotas paraugu kodi.

Figure 18. A – NTA size distribution of BEV from top control channel, B - NTA size distribution of BEV from bot control channel, C - NTA size distribution of BEV from GEV005 top channel, D - NTA size distribution of BEV from GEV005 bottom channel, E - NTA size distribution of BEV from GEV 006 top channel, F - NTA size distribution of BEV from GEV006 bottom channel, G - Quantitative data of NTA from top and bottom channels of Control and GC biological replicate samples. GEV005/GEV006 – sample codes of microbiota from gastric cancer patients. H - representative picture of TEM from EVs isolated from COC/OSTE GOC cultivated with microbiota flowthrough top channel, arrow indicate EV, scale 200nm.

No šiem rezultātiem var secināt, ka izmantojot COC/OSTE GOC anaerobas mikrobiotas kultivēšanai ir iespējams izdalīt EVs no caurplūdes barotnes un analizēt tās ar TEM un NTA. Tas liecina, ka šī platforma ir piemērota arī mikrobiotas BEV analīzei nākotnē. Kā nākamais solis, kas netika veikts šī darba ietvaros, bet tiks veikts līdz būs iegūti sekvencēšanas dati - tiks novērtētas atšķirības starp BEV RNS datiem no GaCa pacientiem un HD, salīdzinot ar iegūtajiem metagenoma sekvencēšanas datiem.

## 4.Diskusija

Mūsdienās orgāni uz čipa tehnoloģijas strauji attīstās un tās potenciāli spēs atrisināt daudz problēmas, kas rodas, izmantojot citas modeļsistēmas, taču, kā jau visām modeļsistēmām, tās nespēj pilnībā atdarināt cilvēka ķermenī notiekošos procesus, tāpēc ir svarīgi saprast pētniecisko jautājumu, kuru vēlas risināt, izmantojot šīs sistēmas un tās šī brīža limitācijas.

Pēc GOC saslēguma izveides tas tiek funkcionalizēts ar ECM. Visbiežāk izmantotais ECM ir veidots no I tipa kolagēna un matrigela, taču šie komponenti ir iegūti no žurku astēm un žurku audzēju kultūrām (Menon et al. 2017; Jalili-Firoozinezhad et al., 2019). Šī darba ietvaros tas nebūtu reprezentatīvi, jo tiek strādāts ar cilvēka šūnu līnijām, tāpēc ar vien vairāk orgānu čipu funkcionalizēšanai sāk izmantot cilvēka bazālās membrānas galvenos komponentus, kuri ir komercionāli pieejami. Darba ietvaros tika izmantots ECM no IV tipa cilvēka kolagēna, fibronektīna un laminīna. Laminīns ir bazālās membrānas komponents, kam ir arī nozīme epitēlija audu veidošanā un uzturēšanā. Tā ekspresija ir svarīga diferenciācijas un poliferācijas pakāpei Caco-2 šūnās (Sakharov et al., 2019). Cita alternatīva būtu primārās šūnu kultūras vai biopsijas paraugs no resnās zarnas, taču tas ir ļoti dārgi un ar zemu atkārtojamību, par cik šie materiāli savā starpā variē (Bein et al., 2018; Pearce et al., 2018).

Zarnas uz čipa izveidei kā epitēliju reprezentējošā šūnu līnija tika izmantota Caco-2, savukārt kā endotēliju reprezentējošā – HUVEC. Šobrīd šis modelis ir pietiekami reprezentatīvs anaerobās mikrobiotas pētniecībai, jo tas spēj atdarināt galveno, kas nepieciešams mikrobiotas kultivēšanai un tālākai BEV analīzei, respektīvi, tas veido kriptu struktūras. Jāmin, ka modelis neataina resno zarnu pilnībā, jo Caco-2 šūnu līnija diferencējoties zem plūsmas apstākļos galvenokārt attēlo enterocītus un lai modelis pilnībā attēlotu resno zarnu būtu nepieciešams čipa funkcionalizēšanai izmantot vairākas šūnu kultūras, lai tiktu veidoti arī citu epitēlijā esošo šūnu tipi un atdarinātas to funkcijas. Piemēram, audzējot Caco-2 šūnu līniju kopā ar HT-29 šūnu līniju, kas arī ir kolorektālā adenokarcinomas šūnu līnija. Šūnām diferencējoties Caco-2 šūnu līnija atdarina enterocītus, kas jau ir iepriekš noteikts, detektējot enterocītu virsmas marķieru kā Villin klātbūtni. Savukārt HT-29 šūnu līnija atdarina kausiņu šūnu funkcijas, kas nodrošina mucīnu sekrēciju, kas tika pierādīts ar diferenciācijas marķieriem kā alkalīna fosfatāze, aminopeptidāze un dipeptidilpeptidāze IV. Kā arī resnajā zarnā visvairāk sastopami tieši enterocīti un kausiņu šūnas. Abu šūnu kokultivēšana nodrošina to, ka izveidotais epitēlijs ir pēc iespējas līdzīgāks kā tas ir fizioloģiski (Ferraretto et al., 2018).

Abu šūnu līniju koncentrācijas uzsējot uz čipa ir atšķirīgas, jo atšķiras arī šūnu izmēri. Koncentrācijas tika izvēlētas balstoties uz iepriekšējiem GOC pētījumiem (Jalili-Firoozinezhad

et al., 2019; Jeon et al., 2022; Tan et al., 2018), kā arī tās tika optimizētas laboratorijā, kurā autors darbojas. Piemeklējot optimālāko koncentrāciju, tika nodrošināta šūnu slāņa veidošanās kanāliņā, taču tajā pat laikā neļautu kanāliņam aizaugt, kas notiktu gadījumā, ja tiktu izmantota pārāk liela koncentrācija.

Šobrīd ir vairāki komercionāli GOC modeļi, piemēram, HuMIX, MIMETAS un EMULATE. HuMIX modeļsistēmas arī izmanto bez PDMS polimēra čipus un darbojas ar GOC sistēmām mikrobiotas kultivēšanai, taču šo sistēmu lielākais trūkums ir tas, ka epitēlija šūnu slānis nav tiešā saskarē ar mikrobiotu, līdz ar to nenotiek tieša mikrobiotas mijiedarbība ar epitēlija šūnu slāni, kas nav fizioloģiski precīzi (Shah et al., 2016). Arī MIMETAS neizmanto PDMS polimēra čipus un šīs sistēmas darbojas uz citu principu. Tās šļirces sūkņa vietā izmanto *rocker perfusion* sistēmu, taču šī plūsmas veida nodrošināšanas lielākais trūkums ir tas, ka tādējādi tiek recirkulēta barotne un nav iespējams regulēt dažādus mehāniskos stresus kanālos, par cik endotēlija šūnām ir nepieciešams lielāks mehāniskais stress, kā epitēlija šūnām (Thompson et al., 2020). Kā arī, šī sistēma nespēj nodrošināt skābekļa gradientu kanālu izvietojuma un dizaina dēļ, un nav pētījumu par mikrobiotas kultivēšanu, izmantojot šīs ierīces. (Shah et al., 2016) Šī darba ietvaros tiek izmantots līdzīgs GOC dizains kā EMULATE, jo tas ļauj izmantot dažādus mehāniskos stresus kanālos, nodrošināt vienmērīgu un nepārtrauktu plūsmu to nerecirkulējot, taču EMULATE izmanto PDMS polimēru, lai veidotu GOC sistēmas. EMULATE arī ir eksperimentējuši ar mikrobiotu, kura izdalīta no fēču paraugiem un tās kultivēšanu. Skābekļa gradienta uzturēšanai viņi izmanto anaerobo kameru, kas ļauj saglabāt zemu skābekļa līmeni, taču epitēlijs joprojām saņem difundēto skābekli caur PDMS membrānu no skābekli saturošās barotnes, kas plūst endotēlija kanālos no ārējiem skābekļa barotņu rezervuāriem, kas ir šīs sistēmas lielākais trūkums (Jalili-Firoozinezhad et al., 2019).

Lai novērtētu šūnu morfoloģiju un funkcionāla epitēlija-endotēlija slāņa veidošanos tika veikta immūnfluorescence un *Cascade blue* barjeras integritātes tests, kas parādīja, ka bez PDMS polimēra čipos barjeras integritāte bija par 28% lielāka nekā PDMS polimēra čipos un tas atbilda iepriekš publicētām vērtībām (Jalili-Firoozinezhad et al., 2019). Barjeras integritātes ir ļoti svarīga normālu zarnu funkcijas nodrošināšanai. *Leaky gut syndrom* ir samazināta epiteliālas-endoteliālās barjeras integritāte, kas ir potenciālais veids kā BEV nokļūst asinīs. *Leaky gut syndrom* var izraisīt zarnu mikrobiotas disbiozi, kas traucē normālas zarnas fizioloģiskās funkcijas, palielinot epiteliālās-endoteliālās barjeras caurlaidību (Apostolou et al., n.d.). Ir veikts pētījums, lai noteiktu BEV klātbūtni cirkulācijā pacientiem, kuriem ir konstatētu zarnu barjeras disfunkcija jeb caurlaidība. Tika analizēti asins plazmas paraugi no veselīgiem donoriem un zarnu barjeras disfunkcijas pacientu paraugiem, kuri slimo ar *inflammatory bowel*

*disease* (IBD), HIV vai zarnu mukozītu. Pēc plazmas frakcionēšanas tika veikti testi, lai kvantitatīvi noteiktu ar BEV saistītos lipopolisaharīdus (LPS). Rezultāti parādīja paaugstinātu LPS pozitīvo BEV līmeni plazmā pacientiem, kuri cieš no IBD, HIV un zarnu mukozīta. Pacienti arī uzrādīja augstāku zonulīna līmeni plazmā, kas ir traucētas barjeras integritātes marķieris. Šis proteīns izraisa blīvo savienojuma vietu izjaukšanu, fosforilējot ZO proteīnus (Tulkens, Vergauwen et al., 2020). Šie dati parāda, ka BEV translokācijai ļoti svarīgs faktors ir barjeras caurlaidība.

Mikrobiotas izdalīšana no svaigiem fēču paraugiem, tika veikta balstoties uz jau iepriekš minētu protokolu (Bellali et al., 2019), jo šī protokola ietvarā tika izmantoti svaigi iegūti fēču paraugi un galvenais uzsvars bija uz anaerobas mikrobiotas izdalīšanu, kas ir svarīgi arī šī darba ietvaros. Izdalīšana tika veikta vadoties pēc 3 dažādiem protokoliem - standarta protokola, protokola, kur mikrobiota tika iesaldēta antioksidantu barotnē un optimizēta protokola, kurā tika izmantota gan antioksidantu barotne, gan izdalīšanas process tika veikts nodrošinot anaerobus apstākļus. Pētījuma ietvaros, izmantojot standarta protokolu, tika izdalītas 55,52% dzīvas baktērijas no kopējo baktēriju skaita. Izmantojot protokolu ar antioksidantu barotni, tika izdalītas 58,51% dzīvas baktērijas, bet, izmantojot protokolu ar antioksidantu barotni un papildus anaerobu apstākļu nodrošināšanu 61,69%.

Konkrēti šī darba ietvaros tika izmantots standarta protokols, vidēji no 10 paraugiem tika izdalītas 62,7% dzīvotspējīgas baktērijas, kas ir ļoti augsts rezultāts, ņemot vērā, ka paraugi netika izdalīti anaerobos apstākļos, jo LBMC nesatur infrastruktūru ar *GlowBox* ar hipoksiju. Paraugi tika iesaldēti gan PBS + glicerīns, gan antioksidantu barotnē + glicerīns, taču šajā gadījumā tas būtiskas izmaiņas neuzrādīja. Šī darba ietvaros paraugu uzglabāšanai tika izmantots GutAlive uzglabāšanas konteiners. Ņemot vērā šo uzglabāšanas trauku anaerobos apstākļus tiek iegūta lielāka baktēriju daudzveidība un arī to skaits. Šī produkta īpašības ir parādītas arī pētījumā, kur fēču paraugs tika sadalīts divās daļās un katrs paraugs ievietots citā uzglabāšanās konteinerī. Pētījumā uzmanība tika vērsta *B.bifidum* anaerobajai baktērijai, kas ir raksturīga un apdzīvo cilvēka zarnu mikrobiotu. Pēc 72h tika secināts, ka GutAlive uzglabāšanas konteinerī šo baktēriju dzīvotspēja ir saglabājusies līdz pat 90%. Savukārt paraugā, kurš netika uzglabāts GutAlive, bet parastā fēču paraugu ievākšanas konteinerī, dzīvotspēja bija tikai 66% (Martínez et al. 2019).

Lielāko daļu zarnu mikrobiotas veido tieši anaerobas baktērijas un pēc baktēriju dzīvotspējas noteikšanas tika secināts, ka ir izdevies izdalīt anaerobas baktērijas. Tas tika noteikts pakļaujot baktērijas skābekļa ietekmei un mērot to dzīvotspēju laikā. No mikrobiotas paraugiem izdalot DNS un veicot metagenoma sekvencēšanu, tika apstiprināts, ka izdalītajos

mikrobiotas paraugos lielākā daļa ir anaerobas baktērijas vai atsevišķos izņēmuma gadījumos fakultatīvi anaerobas.

Tikai funkcionāla epitēlija un 3D morfoloģijas veidošanās gadījumos ir iespējams kultivēt zarnu mikrobiotu. Tā kā ir veikta metagenoma sekvencēšana pirms mikrobiotas ievietošanas čipā, apstiprināts funkcionāls monoslānis un mikrobiota ir kultivēta čipā, tad kā nākamais solis bija metagenoma sekvencēšana pēc mikrobiotas kultivēšanas, lizējot kanāliņā esošās šūnas un baktērijas DNS izdalīšanai, lai novērotu mikrobiotas dinamiku un izmaiņas laikā. Iepriekš ir veikts viens pētījums, kurā ir analizēta mikrobiotas dinamika laikā to kultivējot GOC anaerobos apstākļos. Pētījumā salīdzinot mikroorganismu koncentrāciju pirms un pēc kultivēšanas uz čipa, tika novērots, ka baktēriju koncentrācija pieaug 24h laikā pēc mikrobiotas inokulēšanas čipā un pārējo eksperimenta laiku paliek nemainīga. Kā arī, salīdzinot mikroorganismu augšanu čipā un parastā anaerobā barotnē tika novērots, ka mikroorganismu augšana čipā ir aktīvāka, ko skaidroja ar to, ka notiek mijiedarbība ar šūnām un gļotu sekrēciju. Tika secināts, ka zarnu epitēliju var kultivēt tiešā saskarē ar zarnu mikrobiotu, neapdraudot epitēlija barjeras funkciju, un šī kokultūra tika stabili uzturēta 5 dienas. Kā arī mikrobiotas sastāvs pēc kultivēšanas uz čipa attēloja mikrobiotas sastāvu pacientu paraugos (Jalili-Firoozinezhad et al., 2019). Taču šī pētījuma trūkums ir tas, ka tika izmantoti PDMS GOC čipi un netika skaidri nodemonstrēts, ka tiek izveidots skābekļa gradients starp epitēlija un endotēlija kanālu, par cik PDMS ir gāzes caurlaidīgs. Kā arī, mikrobiota tika izdalīta no jaundzimušo fēču paraugiem 24h laikā, taču šajā periodā netika nodrošināti anaerobi apstākļi paraugam. Mūsu gadījumā priekšrocība ir tā, ka mēs neizmantojam PDMS GOC un kaut arī mēs neesam nodemonstrējuši skaidru skābekļa gradientu, jo šobrīd vēl notiek O<sub>2</sub> sensoru integrēšana caurplūdes kanālos, taču no literatūras ir skaidri zināms, ka PDMS ir gāzes caurlaidīgs, kamēr OSTE un COC nav (Rimsa et al., 2021). Kā arī mēs skaidri esam nodemonstrējuši, ka spējām izdalīt anaerobu mikrobiotu no fēču paraugiem, pateicoties atstrādātiem parauga ievākšanas un apstrādes protokoliem.

Pēc mikrobiotas kultivēšanas tika ievākta čipam cauri izplūdušī barotne, no kuras tika izdalītas EVs un tika analizēts arī to lielums un daudzums starp epitēlija un endotēlija kanāliņiem, lai novērtētu zarnu-asins barjeras šķērsošanu. Evs tika izdalītas no kanāliņiem caurplūdušās barotnes pēc 72h mikrobiotas kultivēšanas uz čipa, taču būtu nepieciešams šādu eksperimentu atkārtot un izdalīt EVs katru dienu visu kultivēšanas laiku, lai novērtētu to dinamiku laikā. Viens no potenciālajiem iemesliem, kāpēc mūsu paraugos esošais BEV lielums un koncentrācija variē, varētu būt tas, ka baktērijas un to izdalītās BEV var ietekmēt saimniekorganisma šūnu EV sekrēciju to samazinot (Rodrigues et al., 2018). Svarīgs būs arī to

saturs, izdalot RNS un novērojot izmaiņas gan starp kontroles kanāliem un kanāliem uz kuriem kultivēta mikrobiota, gan starp kuņģa vēža pacientu un veselu donoru mikrobiotas kanāliem. Tādējādi varēs secināt vai ir tikušas izdalītas BEV un kādas ir atšķirības RNS līmenī paraugos starp pacientiem. Šādus datus tālāk varēs izmantot izdalītās RNS sekvenču validācijai pacientos un salīdzināt kā RNS saturs lūmenā atšķiras no satura, kas ir šķērsojis zarnu barjeru. Tas ļaus arī noskaidrot vai šie profili reprezentē zarnās esošo mikrobiotu, cik lielā mērā un kā tas mainās GaCa un HD.

Lai veiktu BEV analīzi nepieciešams tās izdalīt no iegūtajiem paraugiem, izdalīšana var tikt veikta izmantojot dažādas metodes, kuras tiek pielietotas EVs izdalīšanai, piemēram, SEC, blīvuma gradienta centrifugēšana vai ultracentrifugācija. Izmantojot ultracentrifugāciju parasti tiek novērota daļiņu agregēšanās, kamēr SEC gadījumā var būt piejaukumi vai zudumi (Tulkens, de Wever, et al., 2020). Šī darba ietvaros BEV izdalīšana tika veikta, izmantojot SEC IZON kollonas, jo tā ir labi atstrādāta metode laboratorijā, kurā autors darbojas. Līdz šim nav neviena protokola, kurā BEV būtu izdalītas no GOC caurplūdušās barotnes supernatanta pēc mikrobiotas kultivēšanas, taču BEV ir izolētas no cilvēka bioloģiskā materiāla – fēču paraugiem un asins plazmas, izmantojot SEC. Ir pētījums, kurā izmantojot ultrafiltrēšanu, SEC un blīvuma gradienta centrifugēšanu tika izdalītas BEV no fēču un asins plazmas paraugiem. Izmantojot visas trīs metodes pētījumā tikai panākta eikariotu izdalīto EV atdalīšana no BEVs tās tālāk analizējot pēc to ultrastruktūras un proteomiskā satura. BEV klātbūtne tika noteikta detektējot ar membrānu saistītos lipoproteīnus *ApoA1* un *ApoB*, izmantojot ELISA un Western blot testus, kā arī balstoties uz NTA mērījumiem un iegūtajiem TEM attēliem. Lai gan tika uzsvērts, ka pētījumā izmantotie marķieri nav izplatīti uz visu BEV membrānu, kā arī uzsverot, ka no katra bioloģiskā materiāla šķīduma parauga izdalīšana ir atšķirīga un nav standartizējams protokols (Tulkens, de Wever, et al., 2020).

Vaskularizētas GOC sistēmas ir veids kā vairāk izprast mikrobiotas komunikācijas mehānismus, tai skaitā BEV, ņemot vērā darbā izvirzīto hipotēzi. Šo BEV potenciālais pielietojums ir vēža imūnterapijā, sistēmiskai gramnegatīvu BEV ievadīšanai no ģenētiski modificētas *Escherichia Coli* (*E. coli*) *msbB*<sup>-/-</sup> celma (bez endotoksīniem) ir selektīvs tropisms attiecībā uz audzēju un spēja izraisīt ilgstošas pretvēža imūnās atbildes reakcijas, ražojot citokīnus CXCL10 un interferonu- $\gamma$ , kas var pilnībā izskaust konstatētos audzējus bez ievērojamas nelabvēlīgas ietekmes. Līdzīga pretvēža iedarbība tika novērota arī grampozitīvajām BEV, kas iegūtas no *Lactobacillus Acidophilus* un *Staphylococcus Aureus* (Chronopoulos & Kalluri, 2020).

Darbā tika izveidota funkcionāla GOC iekārta no alternatīviem polimēriem un

stabilām šūnu līnijām, un tika kultivēta anaeroba cilvēka zarnu mikrobiota. Cik mums zināms, līdz šim šādi pētījumi nav veikti un publicēti. Šobrīd notiek darbs pie oriģinālraksta manuskripta papildināšanas ar pēdējo eksperimentu rezultātiem, kur līdzautors ir arī šī darba autors. Ņemot vērā notikumus pasaulē, ir aizkavējušās reaģentu piegādes, kā arī COVID-19 pandēmijas dēļ tika apgrūtināta paraugu ievākšana un datu sekvencēšana. Līdz ar to, nav veikti eksperimenti ar visiem mikrobiotas paraugiem, šobrīd notiek pārējo paraugu kultivēšana, analīze un sekvencēšana. Paralēli tiek uzlaboti arī O<sub>2</sub> un TEER (trans epiteliālā elektriskā rezistence) biosensori. O<sub>2</sub> biosensori palīdzētu monitorēt skābekļa izmaiņas kanālos un ļautu pārlicināties par skābekļa gradientu GOC. Citu veidu kā to apstiprināt reālā laikā šobrīd nav, par cik barotne atverot hipoksijas inkubatoru paliek normoksiska pāris sekundēs, kamēr lai tā kļūtu no normoksiskas uz hipoksisku jāpaiet vairākām stundām. TEER sensori dod iespēju veikt elektriskās rezistences mērījumus šūnu monoslānim, tā ir ļoti uzticama metode, lai novērtētu un apstiprinātu bioloģiskās barjeras integritāti reālajā laikā, līdz ar to nebūtu jāveic *Cascade blue* testi, kas netikai paātrinātu integritātes novērtēšanas laiku, bet arī sniegtu kvalitatīvākus rezultātus par GOC funkcionalitāti.

## 5. Secinājumi

1. Izveidota jauna funkcionāla bez PDMS polimēra GOC modeļsistēma.
2. Tika novēroti un apstiprināti funkcionāli šūnu veidotie slāņi un kriptu struktūru veidošanās epitēlija šūnu kanāliņā, apstiprināta endoteliālās-epiteliālās barjeras veidošanās.
3. Ir apstiprināta veiksmīga dzīvas, anaerobas mikrobiotas izdalīšana no fēču parauga.
4. Veikta mikrobiotas kultivēšana, pielietojot GOC, uzrādot vēlamo baktēriju lokalizāciju un dzīvotspēju, kultivējot GOC.
5. Ir nodemonstrēts, ka ir iespējams izdalīt EVs no jaunizveidoto GOC caurplūdes barotnes, kur ir kultivēta mikrobiota, kas nākotnē ļaus analizēt mikrobiotas BEV.

## 6. Pateicības

Vēlos izteikt pateicību savam bakalaura darba vadītājam Dr.biol Artūram Ābolam par iespēju izstrādāt bakalaura darbu Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā un iespēju darboties inovatīvā projektā, paldies par sniegto palīdzību un paskaidrojumiem. Vēlos izteikt pateicību BSc.biol Artim Galvanovskim, BSc.biol Jānim Plūmem un Dr.pharm Karīnai Narbutei par sniegto atbalstu laboratorijā un par slodzes sadali projekta laikā. Kā arī paldies BSc.biol Artim Galvanovskim un BSc.biol Jānim Plūmem par metožu apmācību. Paldies Latvijas Universitātes Cietvielu un fizikas institūtam, Dr.sc.ing Robertam Rimšam un Dr.sc.ing Gatim Mozoļevskim par PDMS un OSTE/COC orgānu čipu izgatavošanu, sistēmas testēšanu un palīdzību tehniskos jautājumos. Kā arī vēlos izteikt pateicību BSc.biol Fēlikam Rūmniekam par konfokālās mikroskopijas veikšanu un Dr.biol Jurim Jansonam par TEM veikšanu. Paldies arī Dr.pharm Vadimam Parfējevam par plūsmas citometrijas veikšanu. Vēlos izteikt pateicību MSc. biol Lailai Silamiķelei par darba recenzēšanu.

Darbs ir izstrādāts pateicoties projektam:

Mikrobioma ārpusšūnu vezikulu saturs un tā ietekme uz vēža attīstību izpēte, pielietojot zarnas uz čipa sistēmu. Izp-2020/2-0380

## Literatūras saraksts

- Al-Lamki, Rafia S., John R. Bradley, and Jordan S. Pober. 2017. "Human Organ Culture: Updating the Approach to Bridge the Gap from in Vitro to in Vivo in Inflammation, Cancer, and Stem Cell Biology." *Frontiers in Medicine*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00148>.
- Alhinai, Eiman A., Gemma E. Walton, and Daniel M. Commane. 2019. "The Role of the Gut Microbiota in Colorectal Cancer Causation." *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20215295>.
- Apostolou, A., Panchakshari, R. A., Banerjee, A., Manatakis, D. v, Paraskevopoulou, M. D., Luc, R., Abuali, G., Dimitriou, A., Lucchesi, C., Kulkarni, G., Maulana, T. I., Bleck, B., Manolagos, E. S., Hamilton, G. A., Giallourakis, C., Karalis, K., & Program, 7 Graduate. (n.d.). A Micro-engineered Human Colon Intestine-Chip Platform to Study Leaky Barrier. <https://doi.org/10.1101/2020.08.28.271759>
- Azzouz LL, Sharma S. Physiology, Large Intestine. 2021 Aug 9. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 29939634.
- Bein, A., Shin, W., Jalili-Firoozinezhad, S., Park, M. H., Sontheimer-Phelps, A., Tovaglieri, A., Chalkiadaki, A., Kim, H. J., & Ingber, D. E. (2018). Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine. In *CMGH* (Vol. 5, Issue 4, pp. 659–668). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.12.010>
- Bellali, Sara, Jean Christophe Lagier, Didier Raoult, and Jacques Bou Khalil. 2019. "Among Live and Dead Bacteria, the Optimization of Sample Collection and Processing Remains Essential in Recovering Gut Microbiota Components." *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01606>.
- Bonis, V., Rossell, C., & Gehart, H. (2021). The Intestinal Epithelium – Fluid Fate and Rigid Structure From Crypt Bottom to Villus Tip. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661931>
- Brown, Sam P., Daniel M. Cornforth, and Nicole Mideo. 2012. "Evolution of Virulence in Opportunistic Pathogens: Generalism, Plasticity, and Control." *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.005>.
- Chen, Jennifer, Jacqueline Douglass, Vishnu Prasath, Meghan Neace, Siavash Atrchian, Masoud H. Manjili, Shervin Shokouhi, and Mehran Habibi. 2019. "The Microbiome and Breast Cancer: A Review." *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05407-5>.
- Chen, Yinwei, Jinghua Zhou, and Li Wang. 2021. "Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.625913>.
- Chronopoulos, A., & Kalluri, R. (2020). Emerging role of bacterial extracellular vesicles in cancer. In *Oncogene* (Vol. 39, Issue 46, pp. 6951–6960). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01509-3>
- Collins, J T, A Nguyen, and M Badireddy. 2021. "Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine." In *StatPearls*.
- Cong, Jing, and Xiaochun Zhang. 2018. "How Human Microbiome Talks to Health and Disease." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3263-1>.
- Dalton, Alyssa, Christine Mermier, and Micah Zuhl. 2019. "Exercise Influence on the Microbiome–Gut–Brain Axis." *Gut Microbes*. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1562268>.
- Díaz-Garrido, N., Badía, J., & Baldomà, L. (2021). Microbiota-derived extracellular vesicles in interkingdom communication in the gut. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 10, Issue 13). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jev2.12161>
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. In *Nature*

- Reviews Microbiology (Vol. 14, Issue 1, pp. 20–32). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Dominguez-Bello, Maria Gloria, Filipa Godoy-Vitorino, Rob Knight, and Martin J. Blaser. 2019. “Role of the Microbiome in Human Development.” *Gut* 68 (6). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317503>.
- Dumauthioz, Nina, Sara Labiano, and Pedro Romero. 2018. “Tumor Resident Memory T Cells: New Players in Immune Surveillance and Therapy.” *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02076>.
- Ferraretto, A., Bottani, M., de Luca, P., Cornaghi, L., Arnaboldi, F., Maggioni, M., Fiorilli, A., & Donetti, E. (2018). Morphofunctional properties of a differentiated Caco2/HT-29 co-culture as an in vitro model of human intestinal epithelium. *Bioscience Reports*, 38(2). <https://doi.org/10.1042/BSR20171497>
- Frost, Fabian, Frank U. Weiss, Matthias Sendler, Tim Kacprowski, Malte Rühlemann, Corinna Bang, Andre Franke, et al. 2020. “The Gut Microbiome in Patients With Chronic Pancreatitis Is Characterized by Significant Dysbiosis and Overgrowth by Opportunistic Pathogens.” *Clinical and Translational Gastroenterology*. <https://doi.org/10.14309/ctg.000000000000232>.
- Garcia, V.E, Liu, J., & DeRisi, J. L. (2018). Low-cost touchscreen driven programmable dual syringe pump for life science applications. *HardwareX*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2018.e00027>
- Gehart, Helmuth, and Hans Clevers. 2019. “Tales from the Crypt: New Insights into Intestinal Stem Cells.” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>.
- Gribble, Fiona M., and Frank Reimann. 2016. “Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium.” *Annual Review of Physiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105439>.
- Haas-neill, Sandor, and Paul Forsythe. 2020. “A Budding Relationship: Bacterial Extracellular Vesicles in the Microbiota–Gut–Brain Axis.” *International Journal of Molecular Sciences* <https://doi.org/10.3390/ijms21238899>.
- Heintz-Buschart, Anna, and Paul Wilmes. 2018. “Human Gut Microbiome: Function Matters.” *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002>.
- Hubrecht, Robert C., and Elizabeth Carter. 2019. “The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change.” *Animals*. <https://doi.org/10.3390/ani9100754>.
- Jalili-Firoozinezhad, Sasan, Francesca S. Gazzaniga, Elizabeth L. Calamari, Diogo M. Camacho, Cicely W. Fadel, Amir Bein, Ben Swenor, et al. 2019. “A Complex Human Gut Microbiome Cultured in an Anaerobic Intestine- on-a-Chip.” *Nature Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0397-0>.
- JanssenDuijghuijsen, L. M., Grefte, S., de Boer, V. C. J., Zeper, L., van Dartel, D. A. M., van der Stelt, I., Bekkenkamp-Grovenstein, M., van Norren, K., Wichers, H. J., & Keijer, J. (2017). Mitochondrial ATP depletion disrupts Caco-2 monolayer integrity and internalizes claudin 7. *Frontiers in Physiology*, 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00794>
- Javed, Ibrahim, Xuejing Cui, Xiaoyu Wang, Monika Mortimer, Nikolaos Andrikopoulos, Yuhuan Li, Thomas P. Davis, Yuliang Zhao, Pu Chun Ke, and Chunying Chen. 2020. “Implications of the Human Gut-Brain and Gut- Cancer Axes for Future Nanomedicine.” *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c07258>.
- Kahai, Preet, and stany lobo. 2019. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Large Intestine. StatPearls*.
- Jeon, M. S., Choi, Y. Y., Mo, S. J., Ha, J. H., Lee, Y. S., Lee, H. U., Park, S. D., Shim, J. J., Lee, J. L., & Chung, B. G. (2022). Contributions of the microbiome to intestinal inflammation in a gut-on-a-chip. *Nano Convergence*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40580-022-00299-6>

- Kastl, Arthur J., Natalie A. Terry, Gary D. Wu, and Lindsey G. Albenberg. 2020. "The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions." *CMGH*. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.006>.
- Kim, H. J., & Ingber, D. E. (2013). Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 5(9), 1130–1140. <https://doi.org/10.1039/c3ib40126j>
- Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. In *Current Gastroenterology Reports* (Vol. 12, Issue 5, pp. 319–330). <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0131-2>
- Kimura, Hiroshi, Yasuyuki Sakai, and Teruo Fujii. 2018. "Organ/Body-on-a-Chip Based on Microfluidic Technology for Drug Discovery." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2017.11.003>.
- Konjar, Š., Pavšič, M., & Veldhoen, M. (2021). Regulation of oxygen homeostasis at the intestinal epithelial barrier site. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22179170>
- Kwon, O., Han, T. S., & Son, M. Y. (2020). Intestinal Morphogenesis in Development, Regeneration, and Disease: The Potential Utility of Intestinal Organoids for Studying Compartmentalization of the Crypt-Villus Structure. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593969>
- Lamberti, A., Marasso, S. L., & Cocuzza, M. (2014). PDMS membranes with tunable gas permeability for microfluidic applications. *RSC Advances*, 4(106), 61415–61419. <https://doi.org/10.1039/c4ra12934b>
- Liu, Li, and Guo Ping Shi. 2012. "CD31: Beyond a Marker for Endothelial Cells." *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs108>.
- Liu, S., Dai, J., Lan, X., Fan, B., Dong, T., Zhang, Y., & Han, M. (2021). Intestinal bacteria are potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer. *Microbial Pathogenesis*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104747>
- Lueschow, Shiloh R., and Steven J. McElroy. 2020. "The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine." *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00587>.
- Macia, Laurence, Ralph Nanan, Elham Hosseini-Beheshti, and Georges E. Grau. 2020. "Host-and Microbiota-Derived Extracellular Vesicles, Immune Function, and Disease Development." *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21010107>.
- Magnúsdóttir, Stefania, Dmitry Ravcheev, Valerie de Crecy-Lagard and Ines Thiele. 2015. "Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes" *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00148>
- Martínez, Noelia, Claudio Hidalgo-Cantabrana, Susana Delgado, Abelardo Margolles, and Borja Sánchez. 2019. "Filling the Gap between Collection, Transport and Storage of the Human Gut Microbiota." *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44888-8>.
- May, S., Evans, S., & Parry, L. (2017). Organoids, organs-on-chips and other systems, and microbiota. In *Emerging Topics in Life Sciences* (Vol. 1, Issue 4, pp. 385–400). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/ETLS20170047>
- McNeil, Elizabeth, Christopher T. Capaldo, and Ian G. Macara. 2006. "Zonula Occludens-1 Function in the Assembly of Tight Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells." *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-07-0650>.
- Menon, Nishanth Venugopal, Hui Min Tay, Soon Nan Wee, King Ho Holden Li, and Han Wei Hou. 2017. "Micro-

- Engineered Perfusable 3D Vasculatures for Cardiovascular Diseases.” *Lab on a Chip*. <https://doi.org/10.1039/c7lc00607a>.
- Narayanamurthy, Vigneswaran, Z. E. Jeroish, K. S. Bhuvaneshwari, Pouriya Bayat, R. Premkumar, Fahmi Samsuri, and Mashitah M. Yusoff. 2020. “Advances in Passively Driven Microfluidics and Lab-on-Chip Devices: A Comprehensive Literature Review and Patent Analysis.” *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/d0ra00263a>.
- Nation, Daniel A., Melanie D. Sweeney, Axel Montagne, Abhay P. Sagare, Lina M. D’Orazio, Maricarmen Pachicano, Farshid Sepehrband, et al. 2019. “Blood–Brain Barrier Breakdown Is an Early Biomarker of Human Cognitive Dysfunction.” *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0297-y>.
- Nasr, R., Shamseddine, A., Mukherji, D., Nassar, F., & Temraz, S. (2020). The crosstalk between microbiome and immune response in gastric cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21186586>
- Noah, Taeko K., Bridgitte Donahue, and Noah F. Shroyer. 2011. “Intestinal Development and Differentiation.” *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.09.006>.
- Pearce, Sarah C., Heidi G. Coia, J. P. Karl, Ida G. Pantoja-Feliciano, Nicholas C. Zachos, and Kenneth Racicot. 2018. “Intestinal in Vitro and Ex Vivo Models to Study Host-Microbiome Interactions and Acute Stressors.” *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01584>.
- Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M. H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Nyström, E. E. L., Wising, C., Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. In *Immunological Reviews* (Vol. 260, Issue 1, pp. 8–20). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>
- Qian, Y., Yang, X., Xu, S., Wu, C., Qin, N., Chen, S. di, & Xiao, Q. (2018). Detection of microbial 16S rRNA gene in the blood of patients with Parkinson’s disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00156>
- Rimsa, Roberts, Artis Galvanovskis, Janis Plume, Felikss Rumnieks, Karlis Grindulis, Gunita Paidere, Sintija Erentraute, Gatis Mozolevskis, and Arturs Abols. 2021. “Lung on a Chip Development from Off-Stoichiometry Thiol–Ene Polymer.” *Micromachines*. <https://doi.org/10.3390/mi12050546>.
- Rodrigues, M., Fan, J., Lyon, C., Wan, M., & Hu, Y. (2018). Role of extracellular vesicles in viral and bacterial infections: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. In *Theranostics* (Vol. 8, Issue 10, pp. 2709–2721). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.20576>
- Sakharov, D., Maltseva, D., Knyazev, E., Nikulin, S., Poloznikov, A., Shilin, S., Baranova, A., Tsykina, I., & Tonevitsky, A. (2019). Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Systems Biology*, 13. <https://doi.org/10.1186/s12918-019-0686-y>
- Scheithauer, T. P. M., Dallinga-Thie, G. M., de Vos, W. M., Nieuwdorp, M., & van Raalte, D. H. (2016). Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. *Molecular Metabolism*, 5(9), 759–770. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.06.002>
- Schoeler, Marc, and Robert Caesar. 2019. “Dietary Lipids, Gut Microbiota and Lipid Metabolism.” *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09512-0>.
- Schneider, S., Bubeck, M., Rogal, J., Weener, H. J., Rojas, C., Weiss, M., Heymann, M., van der Meer, A. D., & Loskill, P. (2021). Peristaltic on-chip pump for tunable media circulation and whole blood perfusion in PDMS-free organ-

- on-chip and Organ-Disc systems. *Lab on a Chip*, 21(20), 3963–3978. <https://doi.org/10.1039/d1lc00494h>
- Shah, P., Fritz, J. v., Glaab, E., Desai, M. S., Greenhalgh, K., Frachet, A., Niegowska, M., Estes, M., Jäger, C., Seguin-Devaux, C., Zenhausem, F., & Wilmes, P. (2016). A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human-microbe interface. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11535>
- Shaker, A., & Rubin, D. C. (2010). Intestinal stem cells and epithelial-mesenchymal interactions in the crypt and stem cell niche. In *Translational Research* (Vol. 156, Issue 3, pp. 180–187). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2010.06.003>
- Sheflin, Amy M., Alyssa K. Whitney, and Tiffany L. Weir. 2014. “Cancer-Promoting Effects of Microbial Dysbiosis.” *Current Oncology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11912-014-0406-0>.
- Shim, Kyu Young, Dongwook Lee, Jeonghun Han, Nam Trung Nguyen, Sungsu Park, and Jong Hwan Sung. 2017. “Microfluidic Gut-on-a-Chip with Three-Dimensional Villi Structure.” *Biomedical Microdevices*. <https://doi.org/10.1007/s10544-017-0179-y>.
- Shin, Hye Su, Vinayakumar Gedi, Joon Ki Kim, and Dong ki Lee. 2019. “Detection of Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Vesicles Using DNA Aptamers.” *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49755-0>.
- Shin, W., Hinojosa, C. D., Ingber, D. E., & Kim, H. J. (2019). Human Intestinal Morphogenesis Controlled by Transepithelial Morphogen Gradient and Flow-Dependent Physical Cues in a Microengineered Gut-on-a-Chip. *IScience*, 15, 391–406. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.04.037>
- Tan, H. Y., Trier, S., Rahbek, U. L., Dufva, M., Kutter, J. P., & Andresen, T. L. (2018). A multi-chamber microfluidic intestinal barrier model using Caco-2 cells for drug transport studies. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197101>
- Thompson, C. L., Fu, S., Knight, M. M., & Thorpe, S. D. (2020). Mechanical Stimulation: A Crucial Element of Organ-on-Chip Models. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602646>
- Thursby, Elizabeth, and Nathalie Juge. 2017. “Introduction to the Human Gut Microbiota.” *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>.
- Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 13–24). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- Tulkens, J., de Wever, O., & Hendrix, A. (2020). Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization. *Nature Protocols*, 15(1), 40–67. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0236-5>
- Tulkens, J., Vergauwen, G., van Deun, J., Geurickx, E., Dhondt, B., Lippens, L., de Scheerder, M. A., Miinalainen, I., Rappu, P., de Geest, B. G., Vandecasteele, K., Laukens, D., Vandekerckhove, L., Denys, H., Vandesompele, J., de Wever, O., & Hendrix, A. (2020). Increased levels of systemic LPS-positive bacterial extracellular vesicles in patients with intestinal barrier dysfunction. In *Gut* (Vol. 69, Issue 1, pp. 191–193). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317726>
- Umar, Shahid. 2010. “Intestinal Stem Cells.” *Current Gastroenterology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0130-3>.
- Villeneuve, Remi, Samantha Q. Wales, Tiama Hamkins-Indik, Efstathia Papafragkou, James C. Weaver, Thomas C. Ferrante, Anthony Bahinski, Christopher A. Elkins, Michael Kulka, and Donald E. Ingber. 2017. “Human Gut-

- on-a-Chip Supports Polarized Infection of Coxsackie B1 Virus in Vitro.” *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169412>.
- Washabau, R. J., & Day, M. J. (2013). Large Intestine. *Canine and Feline Gastroenterology*. 2013:729–77. doi: 10.1016/B978-1-4160-3661-6.00058-4. Epub 2012 Jul 25. PMID: PMC7152016.
- Wu, Qirui, Jinfeng Liu, Xiaohong Wang, Lingyan Feng, Jinbo Wu, Xiaoli Zhu, Weijia Wen, and Xiuqing Gong. 2020. “Organ-on-a-Chip: Recent Breakthroughs and Future Prospects.” *BioMedical Engineering Online*. <https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>.
- Yamanashi, Yoshihide, Tappei Takada, Ryoya Kurauchi, Yusuke Tanaka, Toko Komine, and Hiroshi Suzuki. 2017. “Transporters for the Intestinal Absorption of Cholesterol, Vitamin E, and Vitamin K.” *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. <https://doi.org/10.5551/jat.RV16007>.
- Yang, Jinho, Eun Kyoung Kim, Andrea McDowell, and Yoon Keun Kim. 2018. “Microbe-Derived Extracellular Vesicles as a Smart Drug Delivery System.” *Translational and Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.12793/tcp.2018.26.3.103>.
- Zheng, L., Kelly, C. J., & Colgan, S. P. (2015). Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A review in the theme: Cellular responses to hypoxia. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 309(6), C350–C360. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00191.2015>
- Mimetas. (2011) Our technology. <https://www.mimetas.com/en/our-technology/>.
- Fluigent. (2005) Comparison between peristaltic, syringe and pressure pumps for microfluidic applications. Retrieved from: <https://www.fluigent.com/resources-support/expertise/expertise-reviews/what-is-microfluidics/comparison-between-peristaltic-syringe-and-pressure-pumps-for-microfluidic-applications/>.
- UK Health Security Agency Culture collections. (2021) Caco-2. Product images. Retrieved from: [https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=ecac\\_c\\_gc](https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=ecac_c_gc)
- World Health Organization (WHO). News room. Cancer. (February 3<sup>rd</sup> 2022). Retrieved from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Bakalaura darbs „Anaerobās mikrobiotas kultivēšana un analīze, pielietojot zarnas uz čipa bez PDMS polimēra” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

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

Autors: Valērija Movčana *paraksts* 01.06.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr.biol. Artūrs Ābols *paraksts* 01.06.2022.

Recenzents: *paraksts* MSc. biol Laila Silamiķe

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 01.06.2022.

Lietvede: Liliāna Teļeševa *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr.           , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: