

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE  
FARMĀCIJAS BAKALaura STUDIJU PROGRAMMA

**AUDZĒJA EKSTRACELULĀRO VEZIKULU  
UZŅEMŠANA MONOCĪTU ŠŪNĀS  
UN IETEKME UZ TĀM**

BAKALaura DARBS

Autore: Vera Morkovska

Studenta apliecības Nr.: vm14007

Darba vadītāja: Mag. pharm. Ineta Popēna

RĪGA 2017

## ANOTĀCIJA

Audzēju sekretētās ekstracelulārās vezikulas (EV) ir viens no komunikācijas veidiem starp audzēju šūnām un mikrovidi. Audzēju mikrovidē līdzdarbojas vairākas šūnas, tajā skaitā arī makrofāgi un monocīti. Darba mērķis ir izpētīt kolorektālā audzēja SW480 un SW620 šūnu līniju normoksijas un hipoksijas apstākļos sekretēto EV uzņemšanu THP-1 šūnu līnijas monocītos un ietekmi uz tiem. Darbā tika pielietotas plūsmas citometrijas, fluorescentās un fāžu kontrasta mikroskopijas metodes. Iegūtie rezultāti liecina, ka THP-1 šūnas uzņem EV kaveolīna atkarīgās endocitozes ceļā. THP-1 šūnu diferenciācijas procesā SW480 un SW620 šūnu līniju sekretētās EV paaugstina CD14 marķiera ekspresiju uz monocītu, M0 un M1 makrofāgu virsmas.

Atslēgvārdi: monocīti, makrofāgi, audzējs, ekstracelulārās vezikulas, endocitoze, plūsmas citometrija.

## ANNOTATION

Extracellular vesicles (EVs) play an important role in cell-to-cell communication. Tumor-derived EVs can influence the tumor microenvironment. Monocytes and macrophages are part of the tumor microenvironment. The aim of this study was to investigate colorectal SW480 and SW620 cancer cell line's normoxic and hypoxic condition secreted EV uptake by THP-1 cells and EV effect on monocytes differentiation. In our research we have used flow cytometry, fluorescent microscopy and phase-contrast microscopy methods. The results show that THP-1 cells take up EVs by a caveolin-mediated endocytic pathway. Tumor-derived EVs increase CD14 marker expression on monocytes, M0 and M1 macrophages surfaces.

Key words: monocytes, macrophages, tumor, extracellular vesicle, endocytosis, flow cytometry.

# SATURS

APZĪMĒJUMI.....	4
IEVADS .....	5
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	7
1.1. Audzēji .....	7
1.2. Audzēju mikrovide .....	11
1.3. Ekstracelulārās vezikulas.....	14
1.4. Makrofāgi un monocīti .....	20
1.5. Makrofāgu heterogenitāte.....	24
1.6. TAMs.....	26
2. MATERIĀLI UN METODES.....	29
2.1. Izmantotie materiāli un iekārtas .....	29
2.2. Šūnu kultivēšana.....	31
2.3. EV iezīmēšana .....	31
2.4. EV uzņemšanas un endocitozes ceļa noteikšana THP-1 šūnu līnijā .....	32
2.4.1. EV uzņemšanas un endocitozes ceļa noteikšana THP-1 šūnu līnijā ar plūsmas citometrijas metodi .....	32
2.4.2. EV uzņemšanas noteikšana THP-1 šūnās ar fluorescentās mikroskopijas palīdzību .....	35
2.5. Monocītu diferenciacija un EV pievienošana.....	35
2.6. EV ietekmes noskaidrošana uz monocītu diferenciaciju ar plūsmas citometrijas palīdzību .....	37
2.7. Datu apstrāde un statistiskā analīze .....	38
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	39
3.1. EV uzņemšanas noteikšana THP-1 šūnās ar plūsmas citometrijas metodi un ar fluorescentās mikroskopijas palīdzību.....	39
3.2. EV endocitozes ceļa noteikšana THP-1 šūnu līnijā ar plūsmas citometrijas metodi.....	45
3.3. Monocītu diferenciacija.....	47
3.4. EV ietekmes noskaidrošana uz monocītu diferenciaciju ar plūsmas citometrijas palīdzību .....	51
4. SECINĀJUMI .....	58
PATEICĪBAS .....	59
IZMANTOTĀ LITERATŪRA .....	60

## APZĪMĒJUMI

TAMs – vēža makrofāgi (*tumor-associated macrophages*)

CAFs - vēža fibroblasti (*cancer-associated fibroblasts*)

NK - dabīgās galētājšūnas

EV - ekstracelulārās vezikulas

TGF- $\beta$  - transformējošais augšanas faktors beta (*transforming growth factor beta*)

VEGF - vaskulārais endotēlija augšanas faktors (*vascular endothelial growth factor*)

IL - interleikīns

## IEVADS

Mūsdienu pasaulē onkoloģiskās slimības ir ļoti nopietna problēma, jo tās ir otrais pēc izplatības biežākais nāves cēlonis (pirmo vietu ieņem kardiovaskulārās slimības), aptuveni 16% cilvēku visā pasaulē mirst no patoloģijām, kas ir saistītas ar audzēju attīstību (2015. gadā audzēju izraisītas nāves sastādīja 8,8 miljons gadījumu). Statistika ir biedējoša - katram trešajam Zemes iedzīvotājam dzīves gaitā ir iespēja saslimt ar vēzi. Audzēji ir ne tikai globāla veselības problēma, bet arī ekonomikas problēma – 2010. gadā onkoloģijai tika patērēti 1,16 triljons ASV dolāru (1).

Mums varētu rasties iespaids, ka audzēji ir tikai mūsdienu cilvēku problēma, bet pirmais dokumentētais vēža apraksts ir nācis no Senās Ēģiptes - Edvīna Smita papirusā, kas ir datējams ar 2500. gadu pirms mūsu ēras, Imhoteps apraksta krūts vēzi, kuru viņš sauc par piebriedušo krūts masu un raksta, ka ārstēšanas iespējas nav (2).

Cilvēcei jau sen ir pazīstamas onkoloģijas slimības, bet to ārstēšanas iespējas bija ļoti ierobežotas, un slimības cēloņi nebija zināmi. 20. gadsimtā sākās audzēju intensīva izpēte, kura turpinās arī tagad. Šobrīd atklāti daudzi slimības cēloņi, vēža attīstības mehānismi, bet joprojām šajā sfērā paliek daudz neizskaidrota un nezināma. Tāpēc mūsdienās pētījumi intensīvi turpinās. Pirms tam audzējus apskatīja kā veselu neatkarīgu veidojumu, bet pēdējā laikā uzmanība tiek veltīta vēža un apkārtējo šūnu savstarpējās mijiedarbības izpētei. Audzēju sekretētās ekstracelulārās vezikulas (EV) ir viens no komunikācijas veidiem starp audzēju šūnām un mikrovidi. Audzēju mikrovidē līdzdarbojas vairākas šūnas, tajā skaitā arī makrofāgi un monocīti (3).

Bakalaura darba mērķis ir izpētīt kolorektālā audzēja SW480 un SW620 šūnu līniju normoksijas un hipoksijas apstākļos sekretēto EV uzņemšanu THP-1 šūnu līnijas monocītos un ietekmi uz tiem.

Darba uzdevumi:

1. apgūt monocītu šūnu kultivēšanu *in vitro*
2. apgūt audzēju ekstracelulāro vezikulu iezīmēšanu ar fluorescentu iezīmi
3. noteikt kolorektālā audzēja šūnu līniju SW480 un SW620 normoksijas un hipoksijas apstākļos sekretēto ekstracelulāro vezikulu uzņemšanu THP-1 līnijas monocītu šūnās ar plūsmas citometrijas un fluorescentās mikroskopijas metodi

4. noteikt mehānismu audzēju ekstracelulāro vezikulu uzņemšanai THP-1 monocītu šūnās ar plūsmas citometrijas metodi
5. noteikt audzēju ekstracelulāro vezikulu ietekmi uz virsmas marķieru CD14, CD206 un HLA-DR ekspresiju monocītu-makrofāgu diferencēšanas procesā ar plūsmas citometrijas metodi
6. noteikt audzēju ekstracelulāro vezikulu ietekmi uz šūnu morfoloģiju monocītu-makrofāgu diferencēšanas procesā ar fāžu kontrasta gaismas mikroskopijas metodi

Bakalaura darbu veido 4 daļas:

1. literatūras apraksts
2. materiāli un metodes
3. rezultāti un diskusija
4. secinājumi

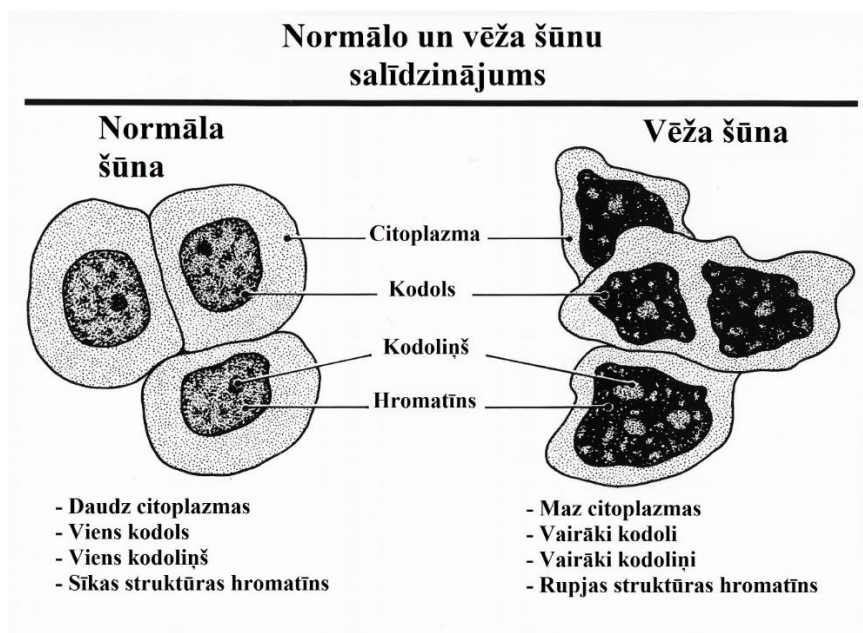
Bakalaura darbs sastāv no 70 lpp, un rakstīšanas procesā tika izmantoti vairāki informācijas avoti: publikācijas no žurnāliem, grāmatas angļu un latviešu valodā, LU izstrādāts bakalaura darbs un elektroniskie informācijas avoti.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Audzēji

Audzēji ir audu masa, kas patvaļīgi aug un nepakļaujas organisma regulācijai. Audzējus iedala labdabīgos un ļaundabīgos audzējos. Ir svarīgi būt spējīgam atšķirt šo divu audzēju tipus, tas ietekmē terapijas izvēli un paredzēto iznākumu. Labdabīgie audzēji ir veidoti no augsti diferencētām šūnām, ir atdalīti no veselīem audiem, neveido metastāzes un aug salīdzinoši lēni. Bet laikā gaitā labdabīgs audzējs var pārvērsties ļaundabīgā (4).

Ļaundabīgajiem audzējiem ir raksturīgas vairākas pazīmes: infiltratīva un ātra augšana, metastāžu veidošana, iespiešanas apkartējos audos. Ļaundabīgo audzēju šūnas ir diferencētas dažādās pakāpēs – ir sastopamas gan augsti diferencētas šūnas, gan mazdiferencētas šūnas. Mazdiferencētas šūnas sauc par anaplastiskajām šūnām, tās nespēj veikt savas funkcijas. Vēl ļaundabīgajiem audzējiem ir raksturīgs šūnu pleiomorfisms – šūnas ir dažādā lielumā, tās atšķiras no audu raksturīgajām šūnām. Audzēju šūnas kodols parasti ir palielināts, tam ir nepareiza forma, šūna var saturēt arī vairākus kodolus un kodoliņus. Kodolu-citoplazmas attiecība ir tuva 1:1, kamēr normālās šūnās tā ir 1:4, vai 1:6. Morfoloģiskas pazīmes histoloģiskajā preparātā ir viens no būtiskākajiem parametriem diagnozes uzstādīšanai un ļaundabīga audzēja noteikšanai (5). Normālo šūnu un vēža šūnu salīdzinājums ir atainots 1.1. attēlā.



1.1.att. Veselu šūnu un audzēju šūnu salīdzinājums. Attēls ar izmaiņām (6)

Šūnu nekontrolēta dalīšana ir izskaidrojama ar defektīvo gēnu darbību, kas var rasties no gēnu punktveida mutācijām, gēnu amplifikācijas vai hromosomu translokācijas, bet biežākais audzēja iemesls tomēr ir mutācijas. Mutācijas var būt iedzimtas, var rasties dzīves gaitā kancerogēnu faktoru ietekmē un var būt saistītas ar novecošanas procesiem, kad organisms nespēj pietiekami labi salabot DNS bojājumus (4,7). Mutācijas, kas ir saistītas ar neoplāziju, var veidoties divu veidu gēnos: proto-onkogēnos vai audzēju supresorgēnos (8).

Proto-onkogēni ir gēni, kas kodē proteīnus, kuri savukārt kontrolē šūnu dalīšanos, diferenciāciju un apoptozi. Audzēju gadījumā proto-onkogēni pārvēršas par onkogēniem, un kodē defektīvus proteīnus, kurus sauc par onkoproteīniem, un proteīni nepakļaujas organisma kontrolei. Kopumā ir aprakstīti vairāk nekā 100 proto-onkogēni. Zinātnes literatūrā nepastāv vienota proto-onkogēnu klasifikācija, bet tomēr gēnus bieži iedala pēc kodētu proteīnu funkcionālās nozīmes (1.1.tabula) (7,9,10).

1.1.tabula

**Proto-onkogēnu iedalījums un audzēji, kas ir saistīti ar proto-onkogēnu mutācijām (7,9,10)**

Funkcionālais iedalījums	Gēna piemērs	Gēna kodēts proteīns	Audzējs
Gēni, kas kodē augšanas faktorus	<i>IGF1</i> gēns	Insulīnam līdzīgs augšanas faktors 1 ( <i>IGF1 – insulin like growth factor 1</i> )	Prostatas, krūts audzējs
Gēni, kas kodē augšanas faktoru receptorus	<i>c-erbB</i> gēns	Her2/neu (tirozīnkināzes receptors)	Krūts audzējs
Gēni, kas kode GTPāzes proteīnus	<i>c-ras (Kras)</i> gēns	Ras proteīns	Dažādu veidu audzēji, 30% no visiem audzējiem
Gēni, kas kodē citoplazmas tirozīnkināzes	<i>BCR-ABL</i> gēns (Filadelfijas hromosomā)	ABL tirozīnkināze	Hroniskā mieloleikoze
Gēni, kas kodē serīna/treonīna kināzes	<i>RAF1</i> gēns	RAF1 serīna/treonīna kināze	melanoma, kolorektālais audzējs
Gēni, kas kodē transkripcijas faktorus	<i>c-myc</i> gēns	Myc transkripcijas faktors	Plaušu, nervaudu audzējs

Audzēju supresorgēni kodē proteīnus, kas atbild par šūnu proliferācijas kontroli un par DNS reparāciju. Notiekot izmaiņām šajos gēnos, šūnu dalīšanās un DNS reparācija netiek vairs kontrolēta. Pirmais aprakstītais audzēju supresorgēns ir *Rb* gēns, kuras mutācijas dēļ attīstās iedzimtā retinoblastoma. Mutētas alēles esamība *APC* gēna predisponē indivīdu uz kolorektāla audzēja attīstību. Lielākajai audzēju daļai (vairāk par 50% no visiem audzējiem) ir mutēts *TP53* gēns, kas arī pieder pie audzēju supresorgēniem (11).

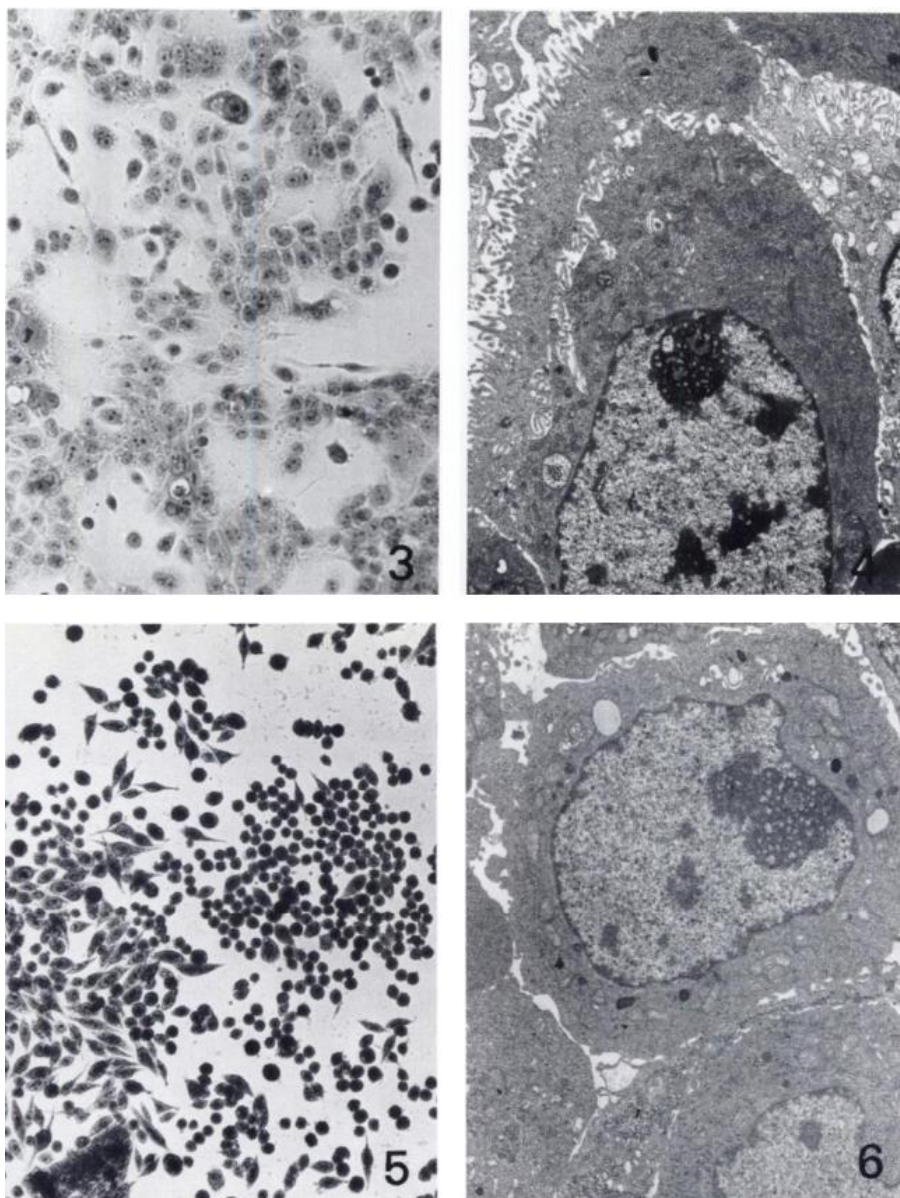
Kopumā var pateikt, ka izmaiņām ģenētiskajā aparātā ir liela nozīme audzēja attīstībā, bet tomēr audzējs ir multifaktoriāla slimība, un lielu lomu spēle arī ārējās vides faktori. Ģenētiskās izmaiņas var predisponēt cilvēku uz vēža attīstību, bet tas nenozīmē, ka audzējs obligāti attīstīsies. Tāpēc pasaulē ārsti vērš uzmanību uz kaitīgo ārējo faktoru likvidēšanu cilvēka dzīvē, jo ir vieglāk ietekmēt ārējos faktorus, nekā ģenētiskās izmaiņas. Ārstējot neoplāziju, izmanto 3 galvenās metodes: ķirurģisko izgriešanu, staru terapiju un medikamentozo ārstēšanu. Tā kā katrs audzējs ir ļoti individuāls, ir grūti izstrādāt ārstēšanas stratēģiju, šajā jomā lielā nozīme ir individualizētai medicīnai un farmakoterapijai (5).

Viens no biežāk sastopamajiem audzējiem ir kolorektālais vēzis. Pēc pasaules statistikas rādītājiem kolorektālais audzējs ir trešais pēc izplatības audzēju veids vīriešiem, un otrais sievietēm (1). Latvijā kolorektālais vēzis veido 10% no visiem diagnosticētiem audzējiem (12). Latvijā, lai mazināt mirstību no kolorektālajiem audzējiem, veic kolorektālā vēža organizēto skrīningdiagnostiku. Diagnostikas pamatā ir slēpto asiņu izmeklēšana izkārnījumos reizi gada pacientiem no 50 gadu vecuma. Statistika uzrāda, ka laikā veiktais skrīnings mazina mirstību no kolorektālā audzēja par 33% (13).

Zinātnieki savos pētījumos *in vitro* izmanto izolētas kolorektālo audzēju šūnu līnijas. Uz doto brīdi no kolorektālajiem audzējiem ir izolētas vairāk nekā 60 atsevišķas šūnu līnijas, kurām ir atšķirīgas bioķīmiskās un ģenētiskās īpašības (14). Bakalaurā darbā tika izmantotas ekstracelulārās vezikulas no SW480 un SW620 kolorektālā audzēja šūnu līnijām.

SW480 šūnu līnija ir izolēta no primārās adenokarcinomas, SW620 šūnu līnija ir iegūta no limfvada audiem, kur vēzis nonāk ar metastāžu palīdzību. Abas šūnu līnijas ir aneiploīdas (ir palielināts hromosomu skaits, salīdzinot ar veselu šūnu) un ekspresē uz savas virsmas karcinoembriālo antigēnu (CEA). SW480 un SW620 šūnu līnijās ir atklātas mutācijas *TP53*, *Kras* gēnos un mikrosatelītu nestabilitāte (15,16). Pētot šūnu līnijas gaismas mikroskopā, var redzēt, ka SW480 šūnas aug nelielos sakopojumos (saliņās), dažviet ir sastopamas arī atsevišķas bipolāras šūnas. SW620 šūnām ir tendence veidot mazāk sakopojumus, preparātā ir vairāk mazo sfērisko un bipolāro šūnu. Elektronmikroskopā SW480 šūnas ir poligonālas

formas un uz šūnu virsmas bieži var novērot viciņas. SW620 šūnas ir vairāk diferencētas, salīdzinot ar SW480 šūnām, jo tām ir izodiametriska forma, un viciņas nav konstatētas uz šūnu virsmas (1.2.attēls). Pētījumā, kas norisinājās ASV 1976. gadā, ir pierādīts, ka, injicējot SW480 un SW620 šūnas (injecēto šūnu skaits  $6 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ ) pelēm mugurā vai vēderdaļā, bez-timusa pelēm (Nu pelēm) attīstās audzējs, kurš histoloģiski ir ļoti līdzīgs cilvēka kolorektālajam audzējam (16).

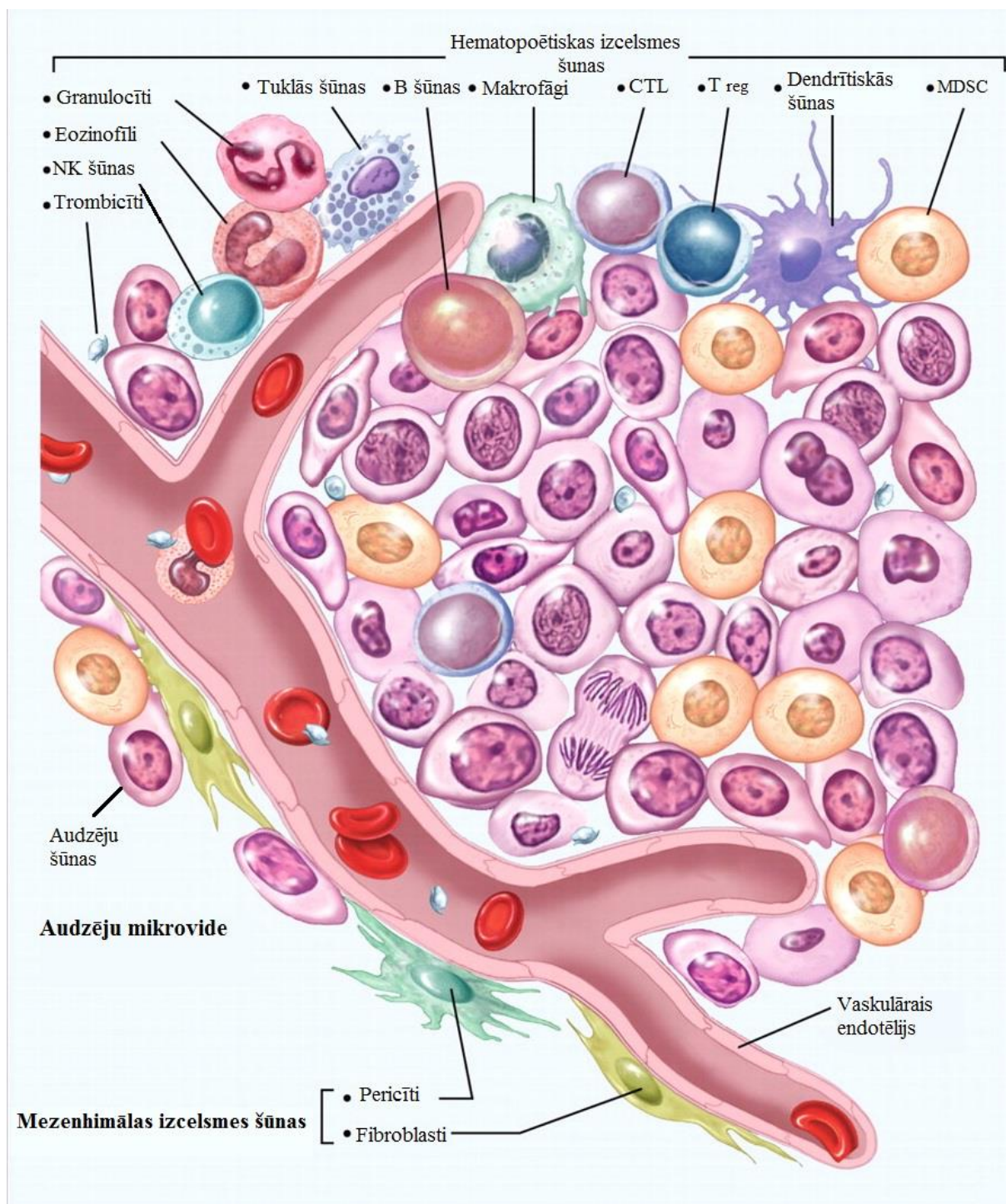


- 3 - SW480 šūnu līnija gaismas mikroskopā (H&E, x 350 palielinājums)  
 4 - Šūna no SW480 šūnu līnijas elektronmikroskopā (x 5000 palielinājums)  
 5 - SW620 šūnu līnija gaismas mikroskopā (H&E, x 350 palielinājums)  
 6 - Šūna no SW620 šūnu līnijas elektronmikroskopā (x 5000 palielinājums)

1.2.att. SW480 un SW620 šūnu līnijas gaismas mikroskopā un elektronmikroskopā (16)

## 1.2. Audzēju mikrovide

Cilvēka organismā visi procesi ir saistīti savā starpā, un arī audzējs neeksistē izolēti viens pats, bet audzēja šūnas mijiedarbojas ar blakusesošajām šūnām, kuras veido audzēja mikrovidi. Pie audzēja mikrovides šūnām pieskaita vairākas hematopoētiskas un mezenhimālas izcelsmes šūnas (1.3.attēls) (17).



1.3.att. Audzēju mikrovide. Attēls ar izmaiņām (17)

Fibroblasti ir viena no audzēju stromas veidojošajām sastāvdaļām. Dažos audzējos fibroblasti var veidot skaitliski lielāku populāciju nekā audzēja šūnas. Fibroblasti, kas atrodas audzēju mikrovidē, ir aktivēti un fenotipiski atšķiras no veselu audu fibroblastiem. Aktivētos fibroblastus, kas atrodas audzēju mikrovidē, sauc par vēža fibroblastiem (*cancer-associated fibroblasts* - CAFs). CAFs šūnām līdzīgi kā miofibroblastiem ir vārpstveidīga šūnu forma (18). Pateicoties īpatnējai formai, kā arī  $\alpha$ -gludo muskuļaudu aktīna ( *$\alpha$ -smooth muscle actin* -  $\alpha$ -SMA) ekspresijai uz šūnu virsmas, zinātnieki spēj identificēt aktivētos fibroblastus (19). Tas ir svarīgi, jo CAFs šūnām ir nozīmīga loma audzēju attīstībā un pašlaik aktivētie fibroblasti tiek plaši pētīti. CAFs veicina audzēja augšanu, proliferāciju, invāziju un metastazēšanu, izdalot augšanas faktorus, citokīnus, hemokīnus un sagraujot ekstracelulārā matricas proteīnus (20). Aktivētie vēža fibroblasti sekmē arī angiogenezi, sekretējot interleikīnu 6 (IL-6), kas veicina vaskulārā endotēlija augšanas faktora (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) izdalīšanos. VEGF jau tiešā veidā stimulē jaunu asinsvadu izveidi (21). 2009. gadā zinātnieku grupa savā pētījumā konstatēja, ka vēža šūnas inducē Varburga efektu aktivētos fibroblastos. Tas nozīmē, ka CAFs šūnās par dominējošo enerģijas ieguves veidu pārvēršas anaerobā glikolīze. Rezultātā pastiprināti veidojas laktāts un piruvāts, kurus vēža fibroblasti sekretē apkārtējā vidē un kurus audzēju šūnas uzņem un izmanto kā enerģijas iegūšanas avotu. Šo parādību, kad CAFs šūnas apgādā vēža šūnas ar enerģijas avotu, nosauca par reversīvo Varburga efektu (22). Vēža fibroblasti ietekmē audzēja rezistenci pret zālēm trijos veidos: veidojot mehānisku barjeru, izdalot vairākas vielas (piem. karboanhidrāzi 9) un palielinot interstīcijas šķidrums spiedienu (*interstitial fluid pressure* - IFP) caur trombocītu atvasinājumu augšanas faktora (*platelet-derived growth factor* – PDGF) receptoriem (23). Apskatot visas augstāk minētas CAFs funkcionālas darbības, var secināt, ka aktivētajiem fibroblastiem ir liela nozīme audzēju mikrovidē notiekošajiem procesiem.

Audzēju mikrovidē aktīvi darbojas arī imūnšūnas: monocīti, makrofāgi, dendrītiskās šūnas, neitrofīli, limfocīti, dabīgās galētājšūnas (naturālie killeri jeb NK šūnas) un mieloīdās izcelsmes supresoršūnas (*myeloid-derived suppressor cells* - MDSCs). Neskatoties uz to, ka visām minētajām šūnām galvenā funkcija ir imūnās atbildes nodrošināšana un organisma aizsardzība, audzēja ietekmē šūnās notiek izmaiņas, un imūnšūnas nevis iznīcina vēzi, bet sekmē to attīstību (17). Saņemot hemotakses signālus, piem. monocītu hemotakses proteīnu-1 (*monocyte chemotactic protein-1* MCP-1), monocīti pārvietojas uz iekaisuma vietu, kur tie diferencējas par makrofāgiem vai dendrītiskajām šūnām. Audzēju šūnu ietekmē monocīti pārveidojas par M2 aktivētajiem makrofāgiem, kurus sauc arī par vēža makrofāgiem (*tumor-associated macrophages* - TAMs). Vēža makrofāgi veicina angiogenezi, audzēja invāziju un

metastazēšanu, imūnas atbildes nomākšanu un matricas pārveidošanos (detalizētāk M2 funkcionālā darbība ir aprakstīta sadaļā TAMs) (24).

NK šūnas pētījumos neuzrādīja spēju veicināt audzēja attīstību, bet dabīgās galētājšūnas nepilda arī savu citotoksisko darbību audzēju mikrovidē. Zinātnieki to izskaidro ar vēža šūnu izdalītā transformējošā augšanas faktora beta (*transforming growth factor beta* -TGF-β) ietekmi uz NK šūnu darbību (25). Savukārt mieloīdās izcelsmes supresoršūnas sekretē slāpekļa oksīda sintāzi 2 (*nitric oxide synthase 2* - NOS2) un argināzi 1 (ARG1), kuras inhibējoši iedarbojas uz citotoksisko T šūnu aktivāciju (26,27). MDSCs vēl stimulē regulatoru T šūnu (T reg) veidošanos un makrofāgu polarizāciju par M2 makrofāgiem (28,29). Ir atklāts, ka MDSCs ne tikai stimulē M2 veidošanos, bet arī pašas mieloīdās izcelsmes supresoršūnas noteiktos apstākļos spēj pārvērsties par audzēju makrofāgiem (30). T reg šūnām ir divējāda darbība audzēju mikrovidē – tās var aktivēt T un B limfocītus un veicināt pretvēža aktivitāti vai darboties imūnsupresīvi, izdalot interleikīnu 10 (IL-10) un TGF-β (31). Krūts vēža un hepatocelulārās karcinomas gadījumā T reg infiltrācija audzēju mikrovidē ir korelējama ar samazinātu izdzīvošanas varbūtību, bet kolorektālā vēža gadījumā – ar paaugstinātu izdzīvošanas varbūtību. Tas atspoguļo regulatoru T šūnu divējādu darbību un audu specifisko ietekmi uz šūnu funkcijām (32,33,34). CD8<sup>+</sup> citotoksiskās T šūnas spēj atpazīt un noārdīt vēža šūnas. CD8<sup>+</sup> T šūnu atrašanās vēža audos ir saistīta ar labvēlīgu izārstēšanas prognozi (35). CD4<sup>+</sup> šūnas jeb T helperus (T<sub>H</sub>) var iedalīt T<sub>H1</sub> un T<sub>H2</sub>. T<sub>H1</sub> sekretē iekaisuma citokīnus un nodrošina pretvēža darbību. T<sub>H2</sub> savukārt darbojas pret iekaisuma procesiem un veicina audzēja attīstību. T<sub>H1</sub> un T<sub>H2</sub> attiecība audos ir savstarpēji saistīta ar audzēja stadiju un pakāpi (35; 36).

Svarīgs process, kas veicina audzēja attīstību, ir angiogēnēze. Audzējs ir atkarīgs no barības vielu un metabolismam nepieciešamo vielu piegādes, kuru veic jaunizveidotie asinsvadi. Vēža šūnas, fibroblasti un imūnšūnas, kas atrodas audzēju mikrovidē, izdala vaskulāro endotēlija augšanas faktoru. VEGF ir galvenais faktors, kas ietekmē angiogēzi. Taču ir konstatēts, ka jaunie asinsvadi ir neregulārās formas, tādiem asinsvadiem ir raksturīga nevienmērīga izplatība audzēja audos un netipiskas sazarošanās. Jaunizveidotus asinsvadus nav iespējams iedalīt arteriolās, vēnulās vai kapilāros. Paaugstināts interstīcijas šķidruma spiediens, kas ir raksturīgs jauniem audzēju asinsvadiem, veicina hipoksijas attīstību un papildus VEGF izdali (37,38).

Audzēju mikrovidei bieži ir raksturīgi hipoksiski apstākļi. Par hipoksiskiem apstākļiem uzskata pO<sub>2</sub> mazāku par 15 mmHg, kad savukārt normoksijas apstākļi raksturojas ar pO<sub>2</sub>

augstāku par 35 mmHg. Samazināts skābekļa parciālais spiediens asinīs bija novērots vairākos audzējos: dzemdes kakla un krūts vēža gadījumos, kā arī smadzeņu, galvas un kakla audzējos (39). Hipoksija veidojas no pārmērīgas metaboliskās slodzes un nepietiekamas jaunizveidoto asinsvadu darbības, kas ir izskaidrojama ar asinsvadu strukturālajām pārmaiņām. Zinātnieki uzskata, ka hipoksija ir saistīta ar audzēja agresīvo darbību un rezistenci pret zāļu vielām (40). Atbildē uz stresa apstākļiem šūnas izdala hipoksijas inducētos faktoros (HIFs). HIFs ir transkripcijas faktori, kas ietekmē angiogēni, glikozes metabolismu, šūnas augšanu un diferenciāciju. Normoksijas apstākļos HIF tiek inaktivēti ar hidroksilgrupas pievienošanu pie prolīna, kuru veic prolīna hidroksilāzes domēna (*prolyl hydroxylase domain* - PHD) proteīni. Izveidots savienojums tiek pakļauts degradācijai proteasomās. Bet hipoksijas apstākļos samazināta O<sub>2</sub> līmeņa dēļ samazinās enzīmu hidroksilēšanas spēja. Rezultātā palielinās HIFs līmenis un hipoksijas inducēto faktoru efektu izpausme (41). Hipoksijas apstākļos ir priekšroka izdzīvošanai šūnām ar mutācijām, kas noved pie mutēto šūnu proliferācijas. Hipoksija inducē VEGF produkciju, kas sekmē jaunu defektīvo asinsvadu veidošanos, kas vēl vairāk pastiprina hipoksijas attīstību un VEGF izdali (40). Tā kā hipoksija ir papildus faktors, kas ietekmē audzēja attīstību un arī šūnas, kas atrodas audzēju mikrovidē, bakalaura darba ietvaros tiek pētīta gan normoksijas, gan hipoksijas apstākļos sekretēto EV ietekme uz monocītu diferenciāciju.

### 1.3. Ekstracelulārās vezikulas

Aprakstītajā audzēju mikrovidē notiek nepārtraukta šūnu savstarpēja komunikācija. Šūnas var mijiedarboties ar signālmolekulu starpniecību vai caur šūnu tiešo kontaktu. Viens no komunikācijas veidiem, kas plaši ir pētīts pēdējos gados, ir ekstracelulāro vezikulu (EV) izdalīšana un uzņemšana mērķšūnās (42).

Ekstracelulārās vezikulas ir ar membrānu norobežoti pūslīši, kurus prokariotu un eikariotu šūnas izdala ekstracelulārajā vidē. Pirmo reizi EV aprakstīja pirms 30 gadiem, bet ilgu laiku pastāvēja uzskats, ka EV neveic bioloģiski nozīmīgas funkcijas organismā (43,44). Zinātnieki mainīja savu viedokli, kad 1996. gadā pētījumā tika pierādīts, ka EV spēj stimulēt iegūtās imūnsistēmas atbildreakcijas (45). No tā laika tika veikti vairāki pētījumi ar mērķi noskaidrot EV lomu organismā un ietekmi uz citām šūnām. EV ir izolētas no vairākiem ķermeņa šķidrumiem: no urīna, no amniotiskā šķidruma, no bronhoalveolārās lavāžas (*bronchoalveolar lavage*) šķidruma, no krūts piena, no asinīm un no siekalām (46). Ekstracelulārās vezikulas var saturēt nukleīnskābes, proteīnus un lipīdus (47). EV saturs ir

atkarīgs no vezikulu producējošām šūnām. Piemēram, plaušu epitēlija šūnas izveido EV, kuras satur surfaktanta proteīnus (48). Ekstracelulārās vezikulas var iedalīt pēc izcelsmes: neitrofili un monocīti sekretē ektosomas, endotēlija šūnas izdala mikrodaļiņas (*microparticles*), no sēklas šķidrums izdala prostatosomas, kardiomiocīti izplata kardiosomas. Bet biežāk izmantotais iedalīšanas veids ir klasificēšana pēc bioģenēzes. Izšķir eksosomas, mikrovezikulas un apoptotiskos ķermenīšus. Atšķirības starp trim veidiem ir uzskaitītas 1.2. tabulā (49).

1.2.tabula

Ekstracelulāro vezikulu klasifikācija pēc bioģenēzes. Tabula ar izmaiņām (49)

Vezikulu veids	Īpašības			
	Veidošanās	Izmērs	Virsmas marķieri	Sastāvs
Eksosomas	Endolizosomu ceļā; multivezikulāro ķermenīšu intraluminālā veidošanās un saplūšana ar šūnas membrānu	40-120 nm	Tetraspanīns (TSPAN29 un TSPAN30); programmētas šūnas nāves 6-mijiedarbības proteīns ( <i>programmed cell death 6-interacting protein</i> - PDCD6IP); audzēju uzņēmības gēna 101 proteīns ( <i>tumour susceptibility gene 101 protein</i> - TSG101)	mRNS, mikroRNS un citas nekodējošās RNS, proteīni
Mikrovezikulas	Šūnu membrānas izvērziņas rezultātā uz āru	50-1000 nm	Integrīni, selektīni, CD40 ligands	mRNS, mikroRNS un citas nekodējošās RNS, proteīni
Apoptiskie ķermenīši	Apoptiskās šūnu membrānas sadalīšanas rezultātā	500-2000 nm	Fosfatidilserīns	Kodola frakcijas, šūnu organoīdu daļas

Ekstracelulārās vezikulas, nodrošinot starpšūnu komunikāciju, spēj ietekmēt citas šūnas. EV var iedarboties uz mērķšūnām divos veidos - saistīties ar virsmas receptoru vai

endocitozes ceļā nokļūst šūnā, kur notiek ekstracelulāro vezikulu satura atbrīvošana. Ir iespējami vairāki veidi, kā EV saturs nokļūst mērķšūnā: var notikt vezikulas saplūšana ar plazmatisko membrānu, fagocitoze, makropinocitoze, klatrīna atkarīgā endocitoze, kaveolīna atkarīgā endocitoze vai lipīdu plostu (*lipid raft*) ierosinātā endocitoze (1.4.attēls) (50).

Ekstracelulāro vezikulu membrāna var saplūst ar mērķšūnas plazmatisko membrānu, tādā veidā nogādājot EV saturu šūnā. Bet zinātnieki tomēr uzskata, ka biežāk notiek EV endocitoze, nekā ekstracelulāro vezikulu membrānas saplūšana ar šūnas plazmatisko membrānu. To apstiprina vairāki pētījumi, kur šūnām, kultivētām 4°C, samazinājās spēja uzņemt EV. Tas nozīmē, ka EV uzņemšanai mērķšūnās tiek patērēta enerģija, un EV uzņemšana šūnās notiek caur aktīvo transportu, pie kura pieder endocitoze (51).

Fagocitozes ceļā tiek uzņemtas lielas daļiņas (>0.5 μm), piemēram, mikroorganismi, atmirušas šūnas. Fagocitoze sākas ar receptora aktivāciju uz mērķšūnas virsmas, tālāk seko aktīva polimerizācija, kas izsauc plazmatiskās membrānas deformāciju un invagināciju. Izmaiņu rezultātā veidojas pseidopodijas, kas apņem EV no visām pusēm. Kad daļiņa ir uzņemta, aktīva filamentu depolarizējas, pseidopodiju brīvie gali savienojas, pilnībā aptverot EV, izveidojot fagosomu. Nonākot šūnas iekšpusē, fagosoma saplūst ar lizosomu, izveidojot fagolizosomu, kur notiek EV satura atbrīvošana (52). Uz makrofāgu virsmas atrodas fosfatidilserīna receptors TIM4, kuru nobloķējot, zinātnieki panāca leukēmijas audzēja izdalīto EV uzņemšanas inhibēšanu makrofāgu šūnās. TIM4 proteīns ir saistīts ar fagocitozes uzņemšanas ceļu, tāpēc pētnieki secināja, ka iespējamais EV uzņemšanas veids makrofāgos ir fagocitozes ceļš (53,54).

Makropinocitoze arī norisinās pateicoties aktīva polimerizācijai, kuru ierosina koloniju stimulētājfaktors 1 (*colony stimulating factor* - CSF-1), epidermālais augšanas faktors (*epidermal growth factor* - EGF) un trombocītu atvasinājumu augšanas faktors (*platelet-derived growth factor* – PDGF) (55). Makropinocitozes mehānisms ir ļoti līdzīgs fagocitozes procesam, bet pastāv arī dažas atšķirības: nav nepieciešams tiešs kontakts ar uzņemto vielu, un uzņemšanai ir pakļauta arī daļa no ekstracelulārā šķidrums, kas atrodas ap uztverto vielu (56). Makropinocitoze ir atkarīga no aktīva, holesterola, Rac1 proteīna un Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporta darbības. Inhibējot aktīva, Rac1 vai Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporta funkcionālo darbību, zinātnieki novēroja samazinātu EV uzņemšanu mikroglijas šūnās. EV uzņemšana mikroglijas šūnās samazinājās arī alkilējošo aģentu (bafilomicīna A, monensīna, hlorohīna) klātbūtnē. Zinātnieki šo parādību izskaidro ar makropinocitozes vakuolas paskābināšanos zāļu vielu ietekmē (57). Bet tomēr apkopojot vairākus pētījumus, zinātnieki secināja, ka EV reti tiek uzņemtas makropinocitozes ceļā. Iespējams, ka tāds uzņemšanas ceļš ir raksturīgs tikai dažiem šūnu veidiem (piem. mikroglijai) (56).

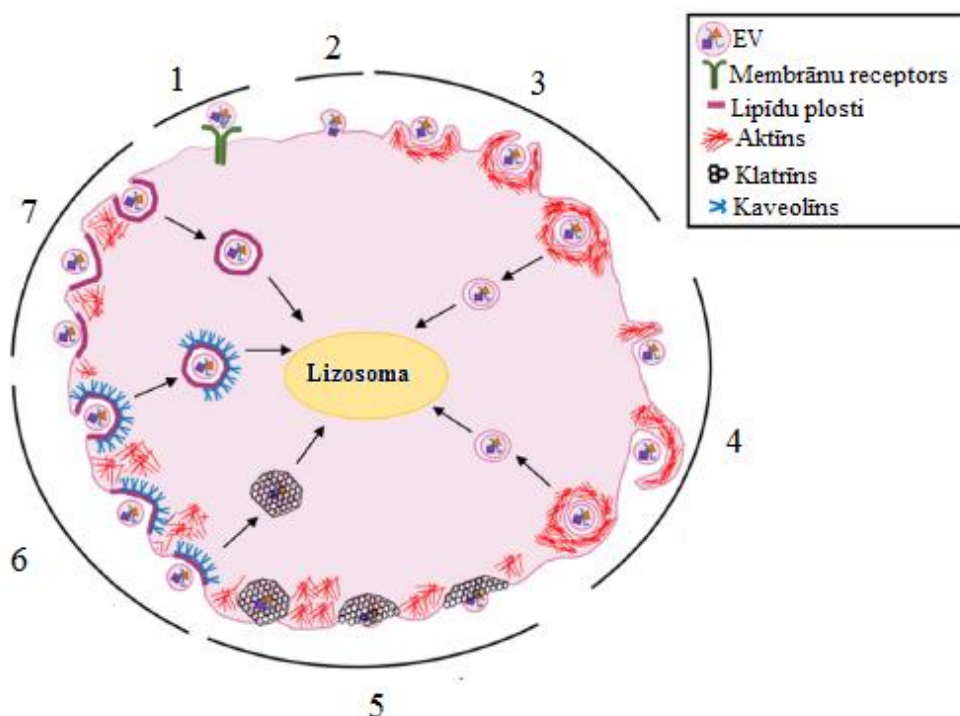
Klatrīna atkarīgā endocitoze ir vielu uzņemšana šūnas iekšienē ar klatrīna apvalkotā pūslīša palīdzību. Process sākas ar receptora aktivāciju uz šūnas virsmas. Notiekot reakciju kaskādei, adaptorie proteīni (*adaptor proteins*), piemēram, AP180 un adaptīns (*adaptin*), rekrutē klatrīnu pie plazmatiskās membrānas. Klatrīnam polimerizējoties, notiek plazmatiskās membrānas invaginācija. Klatrīns pārklāj membrānas ieliekumu un klatrīna apvalkotā vezikula nopumpurojas, nonākot šūnas iekšpusē. Vezikulas atdalīšanas procesā aktīvo lomu spēle dinamīns. Šūnas iekšā klatrīna apvalks disociē, un vezikula saplūst ar iekššūnu endosomām, atbrīvojot savu saturu (58). Vairākos pētījumos ir konstatēts, ka EV uzņemšana var notikt caur klatrīna atkarīgo endocitozi. Hlorpromazīns ir viens no klatrīna atkarīgās endocitozes inhibitoriem, kas nobloķē klatrīna apvalkotā pūslīša veidošanos. Izmantojot hlorpromazīnu, bija novērojama samazināta EV uzņemšana olnīcas vēža šūnās un arī fagocītu šūnās (59,60).

Kaveolīna atkarīgajai endocitozei ir raksturīga kaveolu veidošanās. Kaveola (*caveola*) ir alai līdzīga plazmatiskās membrānas invaginācija. Kaveolas pieskaita lipīdu plostu (*lipid raft*) paveidam, balstoties uz bioloģisko līdzību (augsts holesterola un sfingolipīdu saturs), bet tā kā kaveolu veidošanās ir atkarīga no kaveolīna, šo endocitozes paveidu izdala un apskata atsevišķi no lipīdu plostu ierosinātās endocitozes. Kaveolīns-1 ir proteīns, kas endocitozes gadījumā ir rekrutēts pie plazmatiskās membrānas un kura polimerizācija izsauc membrānas deformāciju un invagināciju, veidojot kaveolu. Kaveola kopā ar uzņemto vielu veidos endocitozes vezikulu, kuras atšķelšanu veicina dinamīns, līdzīgi kā klatrīna atkarīgās endocitozes gadījumā (61). Dinamīna darbību ir iespējams inhibēt ar dainazoru (*dynasore*) palīdzību. Dainazoru izmanto kaveolīna atkarīgās endocitozes inhibēšanai. Bet tā kā dinamīns piedalās gan klatrīna, gan kaveolīna atkarīgajā endocitozē, nevar viennozīmīgi secināt par dainazora selektīvo darbību kaveolīna atkarīgās endocitozes gadījumā (62,63). Selektīvi samazinot *CAVI* gēna ekspresiju, mazinājās arī kaveolīna-1 translācija. Rezultātā zinātnieki novēroja EV uzņemšanas inhibēšanu kaveolīna atkarīgās endocitozes ceļā (64). Bet citā pētījumā ir iegūts pretējs rezultāts: samazinot *CAVI* gēna ekspresiju peles embrija fibroblastos, EV uzņemšana palielinājās (65). No tā zinātnieki izdarīja secinājumus, ka, iespējams, kaveolīns atbild nevis par kaveolas veidošanu, bet par kaveolas stabilizāciju un endocitoze var notikt arī bez kaveolīna līdzdalības (61).

EV var tikt uzņemtas arī caur lipīdu plostu (*lipid raft*) ierosināto endocitozi. Lipīdu plosti ir plazmatiskās membrānas mikrodomēni, kuriem ir raksturīgs paaugstināts sfingolipīdu un holesterola saturs. Ir izpētīts, ka daļa no vīrusiem nonāk šūnās lipīdu plostu ierosinātās endocitozes ceļā. Šajā endocitozes ceļa līdzdarbojas proteīni flotilīni (*flotillins*), veicinot plazmatiskās membrānas invagināciju (56).

Pētījumos, lai noskaidrotu, kādā endocitozes paveidā ir uzņemtas ekstracelulārās vezikulas, izmanto dažādus endocitozes inhibitorus, piemēram, EIPA, hlorpromazīnu, dainazoru, nistatīnu, citohalazīnu D.

5-(N-etil-N-izopropil) amilorīds jeb EIPA inhibē  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apmaiņu, tādā veidā apstādinot makropinocitozi (66). Hlorpromazīns pārvieto klatrīnu un AP2 proteīnu no šūnu virsmas uz intracelulārajām endosomām, inhibējot klatrīna apvalkotās vezikulas veidošanos un nobloķējot klatrīna atkarīgo endocitozi. Citohalazīns D veicina aktīna depolimerizāciju, apturot fagocitozi un makropinocitozi. Dainazors inhibē dinamīna GTPāzes darbību, tādā veidā apstādinot klatrīna un kaveolīna atkarīgās endocitozes. Nistatīns saistās pie holesterola, kas ir viena no plazmatiskās membrānas sastāvdaļām, un nobloķē lipīdu plostu ierosināto endocitozi, kā arī samazina kaveolīna atkarīgo endocitozi (67).

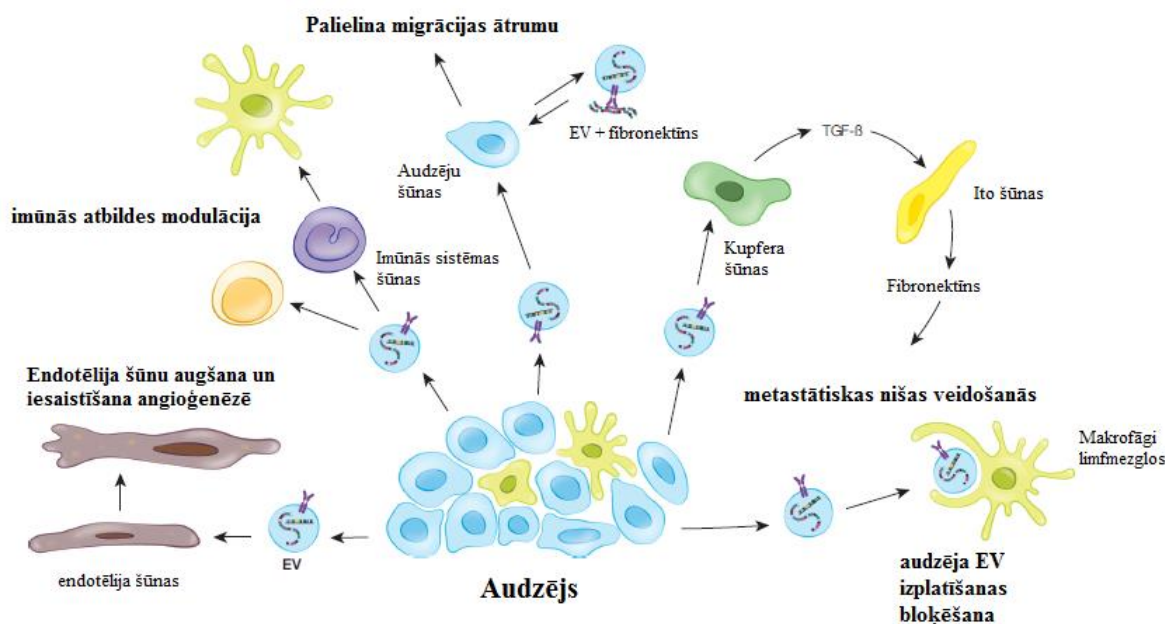


- 1 - Saistība ar virsmas receptoru
- 2 - Saplūšana ar plazmatisko membrānu
- 3 - Fagocitoze
- 4 - Makropinocitoze
- 5 - Klatrīna atkarīgā endocitoze
- 6 - Kaveolīna atkarīgā endocitoze
- 7 - Lipīdu plostu (*lipid raft*) ierosinātā endocitoze

1.4.att. EV mijiedarbība ar mērķšūnu. Attēls ar izmaiņām (50)

EV uzņemšanas ceļa noskaidrošana ir svarīga, ja zinātnieki grib apturēt EV ietekmi uz šūnu procesiem. Šūnu izdalītās EV piedalās daudzos fizioloģiskos procesos: šūnu migrācijā,

imūnas atbildes nodrošināšanā, grūtniecībā, organisma attīstībā, nervu sistēmas šūnu komunikācijā un asins koagulācijā. Bet EV ir sava loma arī patoloģiskos procesos: neurodeģenerācijā un audzēju attīstībā. Neurodeģeneratīvajās slimībās EV veicina defektīvo proteīnu izplatīšanos: prionu slimības gadījumā ar EV palīdzību izplātās un uzkrājas prioni, Alcheimera slimībā – beta amiloīds, Parkinsona slimībā – alfa sinukleīns. Vēža gadījumā izdalītās EV spēj ietekmēt audzēju mikrovidē un arī attālumā esošās šūnas, izmainot to funkcionālo darbību (1.5. attēls) (3).



1.5.att. Audzēju EV iedarbība uz citām šūnām. Attēls ar izmaiņām (3)

EV veicina monocītu un makrofāgu diferenciāciju par M2 makrofāgiem (vēža makrofāgiem). Šo parādību novēroja, inkubējot monocītu šūnas kopā ar ekstracelulārajām vezikulām, izolētām no glioblastomas. Makrofāgiem samazinās fagocitozes spēja un notiek izmaiņas virsmas marķieru ekspresijā un citokīnu sekrēcijā (68). Ir atklāts, ka EV ietekme uz makrofāgiem ir atkarīga no makrofāgu atrašanās attāluma attiecībā pret audzēju. Melanomas *in vivo* modelī makrofāgi, kas atrodas limfmezglos, spēj saistīt ekstracelulārās vezikulas un pasargāt B limfocītus no EV ietekmes, tādā veidā nepieļaujot imūnsupresijas attīstību (69). Hipoksijas apstākļos izdalītās audzēju EV satur vielas (proteīnus un mRNS), kas sekmē angiogēnēzi. EV ietekmē endotēlija šūnās palielinās VEGF līmenis, un VEGF receptors 2 tiek iedarbināts autokrīnā veidā (70). Hipoksisko audzēju EV aktivē ekstracelulārā signāla regulējošās proteīnkināzes 1 un 2 (*extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2* - ERK1/2), fosfoinozītīd-3-kināzes/serīna-treonīna proteīnkināzes (PI3K/AKT) un fokusa pielipšanas kināzes (*focal adhesion kinase* - FAK) ceļus endotēlija šūnās, kas rezultējas ar

endotēlija šūnu augšanu (*sprouting*) un iesaistīšanos jaunu asinsvadu veidošanā (71). *In vitro* pētījumā ir konstatēts, ka prostatas audzēja izdalītās EV satur TGF- $\beta$ 1, kas veicina fibroblastu pārveidošanu par vēža fibroblastiem (72). Bet *in vivo* pētījumā prostatas audzēja EV un fibroblastu mijiedarbība nebija novērota. Zinātnieki to izskaidro ar gēna *Rab27a*, kas atbild par proteīna Rab27a sintēzi, samazinātu ekspresiju. Pētnieki uzskata, ka Rab27a ir potenciālais regulējošais proteīns, kas prostatas audzēja šūnās atbild par EV izdalīšanos (3). Citos pētījumos ir pierādīts, ka audzēju EV iniciē apoptozi CD8+ T šūnās un veicina CD4+ T šūnu (T helperu) diferenciaciju par T reg, kas savukārt inhibē citotoksisko T šūnu darbību (73). Audzēju izdalītās EV sekmē vēža šūnu migrāciju un metastātiskās nišas veidošanos. Piemēram, aizkuņģa dziedzera adenokarcinomas EV ar migrācijas inhibējošo faktoru (*migration inhibitory factor* - MIF) palīdzību iedarbojas uz Kupfera šūnām aknās. Kupfera šūnas MIF ietekmē sekretē TGF- $\beta$ , kuru iedarbības rezultātā Ito šūnas jeb aknu zvaigžņveida šūnas (*hepatic stellate cells*) sintezē fibronektīnu. Fibronektīns veicina makrofāgu un neitrofilu infiltrāciju aknās, veidojot piemērotu vidi metastāzēšanai (74). EV no vēža šūnām paātrina citu vēža šūnu migrāciju, kas ir ļaundabīgas mazākā pakāpē, bet darbības mehānisms vēl nav pilnīgi izskaidrots. Ir novērots, ka vēža šūnas spēj uz EV virsmas nostiprināt fibronektīnu, kas veicina atvieglotu adhēziju un ātrāku migrāciju (3). Apkopojot audzēju EV ietekmi uz citām šūnām, var secināt, ka EV ir liela loma audzēju attīstībā un izplatīšanā.

#### 1.4. Makrofāgi un monocīti

Audzēju mikrovidē ņem līdzdalību vairākas šūnas, tajā skaitā arī makrofāgi. Pēc savas būtības makrofāgi ir leukocītu paveids, kuram piemīt fagocitāras īpašības. Pirmais makrofāgus aprakstīja krievu zinātnieks Iļja Mečņikovs, kurš 1908. gadā saņēma Nobela prēmiju par fagocitozes teoriju (75).

Makrofāgi ir sastopami visos audos, kur tie procentuāli var veidot 10-15% no visu šūnu skaita. Iekaisuma laikā makrofāgu skaits audos var palielināties. Atkarībā no atrašanās vietas makrofāgiem var būt specifiski nosaukumi: aknās tos sauc par Kupfera šūnām, kaulaudos – par osteoklastiem, centrālajā nervu sistēmā – par mikroglijas šūnām, ādā un elpceļos – par Langerhansa šūnām, saistaudos – par histiocītiem (76). Atšķirība pastāv ne tikai nosaukumos, bet arī šūnu morfoloģijā, un katrs audu veids ietekmē makrofāgu funkcionālās īpašības (1.3.tabula). Bet galvenās funkcijas visos audos makrofāgiem ir vienādas: fagocitoze, imūno reakciju iniciēšana un modulēšana, audu homeostāzes uzturēšana (77).

**Makrofāgu funkcijas un patoloģijas, saistītas ar makrofāgu netipisko darbību audos. Tabula ar izmaiņām (77)**

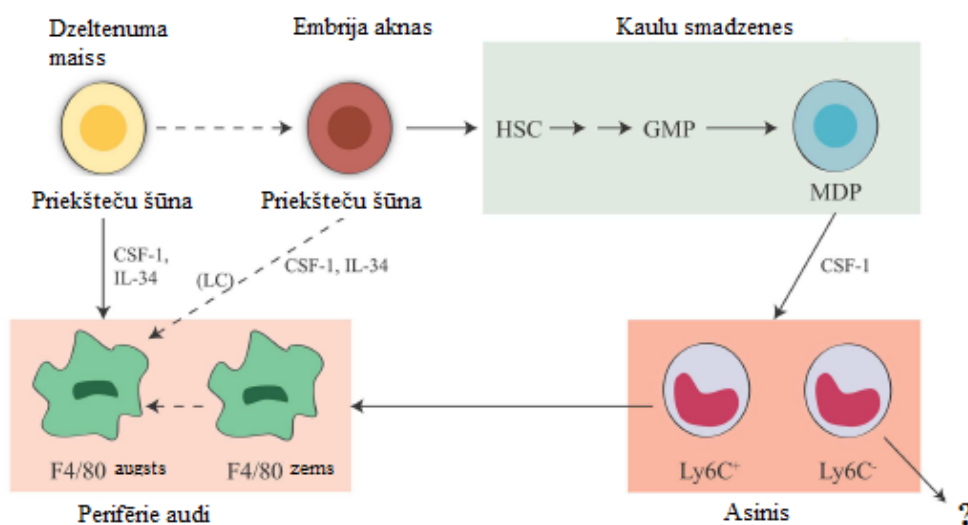
<b>Makrofāgi</b>	<b>Atrašanas vieta</b>	<b>Funkcijas</b>	<b>Patoloģija</b>
mikroglīja	CNS	smadzeņu attīstība, imūna uzraudzība, sinapses pārveidošanās	neirodeģenerācija
osteoklasti	kaulaudi	kaulaudu resorbcija, kaulaudu pārveidošanās	osteoporoze, artrīts, marmora kaulu slimība
sirds makrofāgi	sirds, asinsvadi	imūna uzraudzība	ateroskleroze
Kupfera šūnas	aknas	toksīnu izvadīšana, lipīdu metabolisms, dzelzs pārstrāde, eritrocītu klīrenss, mikrobu izvadīšana, šūnu atlieku aizvākšana no asinīm	aknu fibroze, samazināts eritrocītu klīrenss
alveolārie makrofāgi	plaušas	surfaktanta klīrenss, ieelpotu patogēnu uzraudzība	Alveolāra proteinoze
taukaudu makrofāgi	taukaudi	metabolisms, adipoģenēze, adaptīvā termoģenēze	aptaukošanās, diabēts, insulīna rezistence
kaulu smadzeņu makrofāgi	kaulu smadzenes	monocītu krātuve, atkritumu likvidēšana	hematopoēzes izjaukšana
zarnu makrofāgi	zarnas	tolerance pret mikrofloru, aizsardzība pret patogēniem, intestinālā homeostāze	iekaisīgas zarnu slimības
Langerhansa šūnas	āda	imūna uzraudzība	nepietiekama dzīšana, fibroze
sarkanas pulpas makrofāgi, marginālās zonas makrofāgi	liesa	eritrocītu klīrenss, dzelzs pārstrāde, mikrobu saistīšana no asinīm	samazināta dzelzs pārstrāde, samazināts eritrocītu klīrenss

iekaisuma makrofāgi (M1)	visos audos	aizsardzība pret patogēniem, aizsardzība pret bīstamiem stimuliem	hroniskais iekaisums, audu bojājums, autoimūnās slimības
sadzišanas makrofāgi (M2)	visos audos	angioģenēze, iekaisuma mazināšana, dzišana	audzēji, fibroze, epitēlija hiperplāzija

Pastāv atšķirības arī makrofāgu veidošanās procesā. 1968. gadā Nīderlandes zinātnieks van Furth izvirza teoriju par makrofāgu veidošanos no monocītiem. Teorija apgalvo, ka monocīti ar asins cirkulācijas plūsmu nokļūst audos, kur notiek monocītu diferenciācija par makrofāgiem (78).

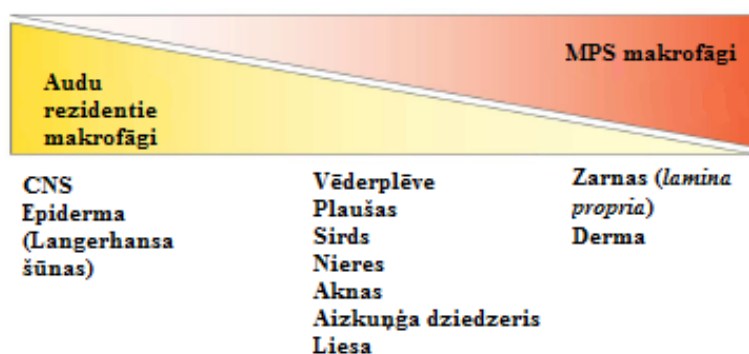
Monocīti ir lielākās pēc izmēra asins šūnas un skaitliski sastāda 10% no cilvēka leukocītiem un 2 – 4 % no leukocītiem pelēm. Monocīti veidojas kaulu smadzenēs no hematopoētiskajām cilmes šūnām (HSCs) vairākās stadijās: no sākumā HSCs šūnām diferenciējoties par mieloidālajām cilmes šūnām, kuras pēc tam pārvēršas par granulomonocītu priekštečiem. Tie diferenciējas par monoblastiem. Monoblasti attīstības gaitā veido promonocītus, kuri tālākajā attīstības posmā diferenciēsies par monocītiem (79). Monocīti kaulu smadzenēs neveido lielu rezervi. Nonākot asins cirkulācijā, monocīti pārvietojas ar asins plūsmu, ar kuru nonāk perifērajos audos, saņemot noteiktus signālus, kur diferenciējas par makrofāgiem. Zinātnieki monocītus iedala pēc virsmas marķieru ekspresijas 3 grupās. Pirmajā grupā ir monocīti ar augstu CD14 ekspresiju, un tiem nav raksturīga CD16 marķiera ekspresija uz šūnu virsmas. Tādus monocītus sauc par klasiskiem monocītiem un apzīmē  $CD14^{++}CD16^{-}$ . Ja monocītiem ir augsta CD16 ekspresija un maz izteikta CD14 ekspresija uz šūnu virsmas, tādus monocītus pieskaita pie neklasiskiem monocītiem, un to ir pieņemts apzīmēt  $CD14^{+}CD16^{++}$ . Daļa no monocītiem, kurus varētu pieskaitīt trešajā grupā, nelielā skaitā ekspresē uz šūnas virsmas CD16 marķieru, bet CD14 marķiera ekspresija ir tādā pašā līmenī kā klasiskajiem monocītiem. Trešo monocītu grupu apzīmē  $CD14^{++}CD16^{+}$  (80). Klasiskajiem monocītiem piemīt augsta fagocitēšanas spēja un augsta peroksidāzes aktivitāte, atbildē uz lipopolisaharīdiem tie sekretē IL-10 (81). Neklasiskie monocīti DNS un RNS daļiņu ietekmē izdala IL-1 $\beta$  un TNF $\alpha$ , un  $CD14^{+}CD16^{++}$  monocīti līdzdarbojas autoimūnās slimībās, piemēram, veicina reimatoīdo artrītu (82). Trešajai monocītu grupai piemīt iekaisumu veicinoša darbība.  $CD14^{++}CD16^{+}$  monocītiem ir zemāka peroksidāzes aktivitāte, un uz lipopolisaharīdu stimuliem tie izdala IL-1 $\beta$  un TNF $\alpha$ . Šie monocīti veic antigēna prezentāciju uz savas virsmas, un tādā veidā aktivē T šūnas (83).

Uzskats, ka makrofāgi cilvēka organismā veidojas tikai no monocītiem, pastāvēja vairākus gadus, kamēr netika atklāts, ka daļa no makrofāgiem neveidojas tieši no monocītiem, bet diferencējas no embrionāliem priekštečiem. Tagad makrofāgus, kas attīstās no monocītiem, pieskaita pie mononukleārās fagocītu sistēmas (MPS), bet makrofāgus, kas veidojas no embrionāliem priekštečiem, izdala atsevišķā grupā. Modelis, kas izskaidro makrofāgu attīstību organismā, bija izstrādāts uz pelēm. Tālākos pētījumos apstiprinājās, ka cilvēkiem makrofāgu diferencēšanas mehānisms atbilst aprakstītajam mehānismam uz pelēm (84). Modeļa pamatā ir secinājums no pētījumiem, ka makrofāgi var veidoties trijos ceļos: no dzeltenuma maisa šūnām embrionālajā periodā, no embrija aknu šūnām vai no monocītiem pēc piedzimšanas (1.6.attēls) (85). Pirmie makrofāgi veidojas no dzeltenuma maisa šūnām agrajā embrionālajā attīstības periodā – 6,5 embrionālajā dienā (pēc peļu embrionālās klasifikācijas E6.5–E8.5). Šajā periodā dzeltenuma maisa priekšteču šūnas interleikīna 34 (IL-34) un koloniju stimulējoša faktora 1 (CSF-1) ietekmē diferencējas par makrofāgiem ar augstu F4/80 ekspresiju uz šūnām. Ir atklāts, ka tāds diferencēšanas ceļš ir raksturīgs centrālās nervu sistēmas (CNS) mikroglījai. Nākamajā posmā (E10.5) kā makrofāgu galvenais producējošais orgāns iesaistās aknas. Embrija aknās no priekšteču šūnām veidojas cirkulējošie monocīti un Langerhansa šūnas. Šobrīd ir izpētīts, ka Langerhansa šūnas ir veidotas gan no dzeltenuma maisa šūnām, gan no embrija aknu šūnām. Atšķirībā no MPS makrofāgiem makrofāgi, kas veidojas embrionālajā attīstības laikā no dzeltenuma maisa un no aknu šūnām, spēj patstāvīgi dalīties bez monocītu starpniecības. Pēc piedzimšanas par galveno asinsrades orgānu pārvēršas kaulu smadzenes. Kaulu smadzenēs pelēm veidojas Ly6C<sup>+</sup> un Ly6C<sup>-</sup> monocīti, kas nonāk asins plūsmā. Ly6C<sup>+</sup> monocīti nonākot audos iekaisuma laikā pārvēršas par makrofāgiem, bet Ly6C<sup>-</sup> monocītu loma vēl pilnībā nav izpētīta (77).



1.6. attēls. Makrofāgu diferencēšana pelēm. Attēls ar izmaiņām (77)

F480 pelēm (cilvēkiem EMR1) ekspresijas līmenis uz makrofāgu virsmas var kalpot kā marķieris makrofāgu izcelsmes noteikšanai: makrofāgi ar augsto F480 līmeni uz šūnu virsmas ir veidoti no priekšteču šūnām embrionālajā attīstības laikā, bet šūnas ar zemu F480 līmeni ir diferencētas no cirkulējošiem monocītiem. Audos divu diferenciācijas veidu makrofāgi ir sastopami dažādās proporcijās – epidermā un CNS atrodas makrofāgi, kas nāk no embrionālām priekšteču šūnām, dermā un zarnās makrofāgi ir diferencēti no monocītiem, bet vairākos audos, piemēram, vēderplēvē, plaušās, nierēs, ir sastopami abu veidu makrofāgi (1.7.attēls) (86).



1.7. att. Audu rezistentu makrofāgu un MPS makrofāgu izplatība dažādos audos. Attēls ar izmaiņām (77)

## 1.5. Makrofāgu heterogenitāte

Audos makrofāgi, saņemot dažādus signālus, spēj aktivēties. Aktivētos makrofāgus iedala klasiski aktivētajos makrofāgos jeb M1 un alternatīvi aktivētajos makrofāgos jeb M2 (87). M1 un M2 makrofāgiem ir atšķirīgi virsmas marķieri, kā arī ir individuāls sekretēto vielu profils (1.4.tabula) (88). Aktivētajiem makrofāgiem piešķir nosaukumus pēc analogijas ar T helperu apakštipiem: M1 makrofāgiem ir līdzīga funkcija (iekaisumu veicinoša) ar Th1 šūnām, bet M2 makrofāgi, līdzīgi kā Th2 šūnas, darbojas pret iekaisumu (89).

Makrofāgu aktivēšanu par M1 apakštipu veicina interferons gamma (IFN- $\gamma$ ), kuru izdala CD8<sup>+</sup> T šūnas, Th1 šūnas un dabīgās galētājšūnas (NK). M1 polarizāciju stimulē arī patogēnu-asociētās molekulārās struktūras (PAMP's), piemēram, lipopolisaharīdi (LPS), kuri darbojas kā Toll-like (TLR) un NOD-like (NLR) receptoru agonisti. Uz savas virsmas makrofāgi ekspresē galvenā audu saderības kompleksa II klases (MHC II) molekulas, kā arī CD80 un CD86. Klasiski aktivētie makrofāgi producē pro-iekaisuma citokīnus - interleikīnus

1 $\beta$ , 12, 23 (IL-1  $\beta$ ; IL-12; IL-23) un tumora nekrozes faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), kā arī hemokīnus (90). M1 makrofāgi papildus vēl izdala reaktīvas skābekļa molekulas (ROS) un slāpekļa (II) oksīdu (91). Klasiski aktivētajiem makrofāgiem piemīt imunitāti stimulējoša un pretaudzēju darbība: M1 veic audzēju šūnu fagocitozi un makrofāgu izdalītas vielas citotoksiski iedarbojas uz vēža šūnam. Ir konstatēts, ka klasiski aktivētie makrofāgi spēj pārveidoties par citu veidu makrofāgiem nepieciešamības gadījumā, saņemot noteiktus signālus (90).

M2 makrofāgus iedala apakštipos (a, b, c, un d) atkarībā no vielām, kas veic makrofāgu aktivēšanu (92).

Th2 šūnas producē interleikīnus 4 un 13 (IL-4; IL-13), kuri sekmē makrofāgu polarizāciju par M2a apakštipu. Šim makrofāgu tipam ir raksturīgi tādi virsmas marķieri kā IL-4R, CD163, CD206, CD209, Fc $\epsilon$ R un Dectin-1 (93).

M2b makrofāgi veidojas IL-1, LPS, un imūnā kompleksa (IC) ietekmē un uz savas virsmas, līdzīgi kā M1, ekspresē MHC II molekulas un CD86. Starpšūnu vidē alternatīvi aktivēto makrofāgu b apakštips sekretē IL-1, IL-6 un TNF $\alpha$  (94).

IL-10 un transformējošais augšanas faktors beta (TGF- $\beta$ ) veicina makrofāgu aktivēšanu par M2c apakštipu. Uz trešā alternatīvi aktivēto makrofāgu paveida virsmas zīnātnieki konstatēja RAGE, CD163 un CD206 virsmas marķierus. M2c makrofāgi sekretē IL-10 un TGF-b – tās pašas vielas, kuras veicina šo makrofāgu apakštīpa polarizāciju (92).

Pēdējais alternatīvi aktivēto makrofāgu veids (d apakštīps) veidojas audzēju šūnu un IL-6, leukocītu inhibējošā faktora (LIF) ietekmē (95). Zinātnes literatūrā M2d apakštīpu sauc par vēža makrofāgiem (TAMs). Daži autori asociē TAMs ar visiem M2 apakštīpiem, citi autori izdala tikai M2d makrofāgus kā TAM veidojošo vienību. Ir sastopams arī uzskats, ka TAM ir atsevišķs aktivizēto makrofāgu paveids, kas ir līdzīgs M2, bet ietver sevī arī specifiskas atšķirības (96,97).

Apkopojot informāciju par M1 un M2 makrofāgiem, var secināt, ka tiem piemīt pretējas darbības. Klasiski aktivētie makrofāgi veic pretvēža darbību, citotoksiski iedarbojoties uz audzēju šūnām vai fagocitējot tās. Bet alternatīvi aktivētie makrofāgi veic audu reparāciju un sekmē audzēja attīstību (98).

Aktivēto makrofāgu salīdzinājums. Tabula ar izmaiņām (90)

	Aktivēto makrofāgu veidi				
	M1	M2a	M2b	M2c	M2d
<b>Stimulē (aktivizē)</b>	IFN- $\gamma$ LPS GM-CSF	IL-4 IL-13 Sēnīšu infekcijas	IC IL-1R	IL-10 TGF- $\beta$ GC	IL-6 LIF Adenozīns
<b>Virsmas marķieri</b>	CD86 CD80 CD68 MHC II IL-1R TLR2 TLR4 iNOS SOCS3	CD163 MHC II SR MMR/CD206 CD200R TGM2 DecoyR IL-1R II Ym1/2 Fizz1 Arg-1	CD86 MHC II	CD163 TLR1 TLR8	VEGF
<b>Sekretētie citokīni</b>	TNF IL-1 $\beta$ IL-6 IL-12 IL-23	IL-10 TGF- $\beta$ IL-1ra	IL-1 IL-6 IL-10 TNF- $\alpha$	IL-10 TGF- $\beta$	IL-10 IL-12 TNF- $\alpha$ TGF- $\beta$
<b>Sekretētie hemokīni</b>	CCL10 CCL11 CCL5 CCL8 CCL9 CCL2 CCL3 CCL4	CCL17 CCL22 CCL24	CCL1	CCR2	CCL5 CXCL10 CXCL16

## 1.6. TAMs

Vēža makrofāgiem ir noteikta loma audzēju attīstībā – tie stimulē audzēju šūnu augšanu, veicina imūnsupresiju un vēža metastāžu veidošanos, sekmē angiogēnēzi.

Pētot TAMs ietekmi uz audzēju šūnu augšanu, zinātnieki atklāja sakarību, ka interleikīni 23 un 17 (IL-23 un IL-17), kurus izdala vēža makrofāgi, korelē ar audzēju progresiju (99). Kupfera šūnas spēj apkārtējā vidē izdalīt mitogēnus, kas caur kodola faktora  $\kappa B$  (*nuclear factor  $\kappa B$*  - NF- $\kappa B$ ) signālceļu veicina hepatocelulāras karcinomas attīstību (100).

Cits veids, kā TAMs spēj iedarboties uz hepatocelulāru karcinomu, ir interleikīna 6 (IL-6) izdala. IL-6 stimulē signāla pārveidotāja un transkripcijas aktivatora 3 (*signal transducer and activator of transcription 3* - STAT3) signālceļu. Tas arī rezultējas ar hepatocelulāras karcinomas šūnu pastiprinātu proliferāciju (101). Gliomas gadījumā audzēju šūnu tiešais kontakts ar TAMs iniciē gliomas šūnu proliferāciju, aktivējot STAT3 signālceļu (102). Aprakstītie pētījumi liecina par vēža makrofāgu līdzdalību audzēju augšanā un vēža šūnu proliferācijā.

Vairākas šūnas audzēju mikrovidē veicina imūnsupresiju, un vēža makrofāgi ir to šūnu skaitā. Imūnsupresiju TAMs panāk, inhibējot citotoksisko T limfocītu (CTL jeb CD8+) darbību. Vienā pētījumā zinātnieki novēroja, ka vismaz daļēji CTL šūnu darbības supresija ir izskaidrojama ar L-arginīna metabolismu: vēža makrofāgu inducēta slāpekļa (II) oksīda sintāze (iNOS) vai argināze 1 pastiprināti veido reaktīvas skābekļa molekulas, kas negatīvi ietekmē CD8+ darbību (103). TAMs vēl izdala interleikīnu 10 (IL-10), kas palielina PD-L1 molekulas ekspresiju monocītiem, un PD-L1 papildus inhibē CTL darbību (104). Papildus imūnsupresiju nodrošina  $T_{reg}$  ar savo darbību audzēju mikrovidē. Vēža makrofāgi izdala hemotakses faktorus CCL17, CCL18 un CCL22, kuru ietekmē audzēju mikrovidē papildus infiltrējas  $T_{reg}$ . TAMs sekretē arī prostaglandīnu E2 (PGE2), IL-10 un indolamīna 2,3-dioksigenāzi, kas aktivē rekrutētos  $T_{reg}$  (105).

Vēža makrofāgi spēj sekmēt audzēja metastāzēšanu un pirmsvēža nišas (*pre-malignant niche*) veidošanos. TAMs izdala vairākas proteāzes, piemēram, katepsīnu B (cathepsin B), matriksa metalopeptidāzi 2 (MMP2), MMP7 un MMP9, kas sašķel ekstracelulāra matriksa (ECM) struktūru, tādā veidā atbrīvojot ceļu audzēju šūnām (106). Vēža makrofāgi sekretē TNF- $\alpha$ , VEGF un TGF- $\beta$ , kuri ar asins plūsmu nonāk audos un orgānos, kur notiks metastātiskās nišas formēšana. Nonākot mērķvietā, izdalītās vielas liek apkārtesošajiem makrofāgiem sekretēt S100A8 proteīnu un seruma amiloīdu A3, kas rekrutēs makrofāgus un arī audzēju šūnas uz mērķvietu, pēc laika tur formējas jaunā metastātiskā niša (107).

Audzēju attīstībai ir nepieciešama barības vielu piegāde, kuru nodrošina angiogēnēze. Zinātnieki novēroja, ka gliomas un krūts audzēja gadījumā pastāv korelācija starp jauno asinsvadu skaitu audzēja audos un TAMs skaitu (108,109). It īpaši vēža makrofāgi akumulējas hipoksiskos audzēju rajonos. Hipoksijas ietekmē TAMs sekretē vielas, kas veicina angiogēnēzi - VEGF, TNF- $\alpha$ , matriksa metalopeptidāzes, IL-1 $\beta$ , IL-8, timidīna fosforilāzi (110). Ir atklāts, ka angiogēnēzē īpaši aktīvi iesaistās makrofāgi, kas ekspresē uz savas virsmas tirozīnkināzes endotēlija receptoru 2 (TIE2), pie kura saistās angiogēnēzes regulētājs

– angiopoetīns (111). Angiopoetīna inhibēšana ar monoklonālu antivielu palīdzību apstādina audzēja progresiju olnīcu vēža gadījumā (112).

Apkopojot visu informāciju par vēža makrofāgiem, var secināt, ka tiem ir liela loma audzēju attīstībā un izplatīšanās. Inhibējot TAMs darbību vai nobloķējot makrofāgu polarizāciju par vēža makrofāgiem, iespējams, zinātnieki spētu panākt pozitīvo rezultātu audzēja augšanas apturēšanā un ārstēšanā. Zinātnes literatūrā ir aprakstīts, ka viens no veidiem, kas veicina makrofāgu polarizāciju par vēža makrofāgiem, ir audzēju ekstracelulāro vezikulu uzņemšana makrofāgos. Bet EV iedarbības mehānisms vēl nav pilnīgi izpētīts. Tāpēc šajā bakalaura darbā tiks pētīta kolorektālā audzēja SW480 un SW620 normoksijas un hipoksijas apstākļos sekretēto EV uzņemšana THP-1 šūnās un ietekme uz monocītu diferenciāciju. Cerams, ka pētījuma rezultāti palīdzēs detalizētāk izpētīt procesu un tie varētu noderēt audzēju ārstēšanas piemeklēšanas procesā.

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Izmantotie materiāli un iekārtas

#### Iekārtas :

1. Laminārās plūsmas skapis Flow Fast V 12 P, Faster
2. Fāžu kontrasta mikroskops Evos XL, AMG (*Advanced Microscopy Group*)
3. Ūdens vanna-krafitājs (*Shaking water bath*) Stuart SBS40
4. Inkubators, Memmert
5. Centrifūga LMC-3000, Biosan
6. Vorteksa maisītājs (Vortex) V-1 plus, Biosan
7. Plūsmas citometrijas aparāts Guava EasyCyte 8HT, Millipore
8. Ledusskapis, Arctiko
9. Šūnu skaitīšanas aparāts Luna-II™ Automated Cell Counter, Logos Biosystems
10. Mikroskops Eclipse Ti, Nikon Instruments Inc.
11. Automātiskās mikropipetes Proline Plus :
  - 0,5 - 10 µl, kataloga Nr. 728020, Sartorius
  - 2 - 20 µl, kataloga Nr. 725030, Sartorius
  - 5 -50 µl, kataloga Nr. 728040, Sartorius
  - 10 – 100 µl, kataloga Nr. 728050, Sartorius
  - 20 – 200 µl, kataloga Nr. 728060, Sartorius
  - 100 – 1000 µl, kataloga Nr. 728070, Sartorius

#### Materiāli:

1. Šūnu kultivēšanas plate (24 lauciņi), kataloga Nr. 30024, SPL Life Sciences
2. Šūnu kultivēšanas plate (96 lauciņi), kataloga Nr. 2356082, Sarstedt
3. Seroloģiskās vienreizējās pipetes
  - 2 ml, kataloga Nr. 86.1252.001, Sarstedt
  - 5ml, kataloga Nr. 86.1253.001, Sarstedt
  - 10 ml, kataloga Nr. 86.1254.001, Sarstedt
  - 25 ml, kataloga Nr. 86.1685.001, Sarstedt
4. Šūnu skaitīšanas stikliņi - Luna Cell Counting Slides, kataloga Nr. L12001, Logos Biosystems
5. Exosome Spin Columns MW 3000, kataloga Nr. 4484449, Invitrogen

6. *Eppendorf* tipa stobriņi 1,5 ml, kataloga Nr. 72.690.001, Sarstedt.
7. Adhēzijas priekšmetstikliņi (*adhesion slides*), kataloga Nr. 0810401, Marienfeld
8. Stobriņi 50 ml, 114x28 mm, PP, kataloga Nr. 62.547.254, Sarstedt
9. Šūnu kultivēšanas standarta flakons T75, kataloga Nr. 83.3911.02, Sarstedt
10. Mikropipešu uzgaļi :
  - 10 µl, kataloga Nr. 70.1130.210, Sarstedt
  - 20 µl, kataloga Nr. 70.760.213, Sarstedt
  - 100 µl, kataloga Nr. 70.760.212, Sarstedt
  - 200 µl, kataloga Nr. 70.760.211, Sarstedt

### **Reaģenti:**

1. BD Pharmigen Human BD Fc Block 0.5 mg/ml 0.5 mL, kataloga Nr. 564220, BD Biosciences
2. BD Pharmigen PE Mouse Anti-Human CD206 2 mL, kataloga Nr. 555954, BD Biosciences
3. BD Pharmigen, PE Mouse Anti-Human CD14 1mL, kataloga Nr. 557154, BD Biosciences
4. BD Pharmigen PerCP-Cy 5.5 Mouse Anti-Human HLA-DR 0.25mL, kataloga Nr. 560652, BD Biosciences
5. StemPro Accutase 100mL, kataloga Nr. 15070, Gibco
6. RPMI 1640 Medium ar L-glutamīnu un nātrija hidrogēnkarbonātu 500 mL, kataloga Nr. R8758, Sigma
7. PBS (1x) bez Ca<sup>2+</sup> vai Mg<sup>2+</sup> 500ml, kataloga Nr. E504-500ML, Amresco
8. FBS (*fetal bovine serum*) 500 mL, kataloga Nr. F9665, Sigma-Aldrich
9. Penicilīna 100 AV/streptomicīna 100 µg/ml šķīdums 100mL, kataloga Nr. P4333, Sigma
10. DMSO – kataloga Nr. RNBC0311, Sigma
11. EIPA, kataloga Nr. 14406, Cayman Chemical
12. Hlorpromazīns, kataloga Nr. C8138, Sigma
13. Dainasors, kataloga Nr. D7693-5MG, Sigma
14. Nistatīns, kataloga Nr. N6261-5MU, Sigma
15. Citohalazīns-D, kataloga Nr. C8273, Sigma
16. Syto RNaselect, fluorescentā iezīme, kataloga Nr. S32703, Invitrogen
17. ProLong® Gold Antifade Mountant ar DAPI, kataloga Nr. P36931, Invitrogen
18. Forbola 12-miristāta 13-acetāts (PMA), kataloga Nr. 524400, Calbiochem

19. Rekombinants cilvēka interferons gamma (IFN- $\gamma$ ), kataloga Nr. 285-IF, R&D Systems
20. Rekombinants cilvēka interleikīns 4 (IL-4), kataloga Nr. 204-IL, R&D Systems
21. Rekombinants cilvēka interleikīns 13 (IL-13), kataloga Nr. 213-ILB, R&D Systems
22. Lipopolisaharīdi (LPS) no *Escherichia coli*, kataloga Nr. L2880, Sigma-Aldrich

### **Šūnu līnijas :**

1. SW480 un SW620 šūnu līniju normoskijas un hipoksijas apstākļos sekretētās EV, saņemtas no prof. A.Linē grupas (Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs)
2. THP-1 šūnu kultūra, iegādāta no Eiropas šūnu kultūru kolekcijas (*European Collection of Authenticated Cell Cultures -ECACC*)

### **2.2. Šūnu kultivēšana**

Pētījumā izmanto monocītu šūnas no THP-1 šūnu līnijas. THP-1 šūnu līnija ir izdalīta no monocitārās leikozes pacienta asinīm. Salīdzinot ar citām mieloīdajām šūnu līnijām (HL-60, U937, KG-1, HEL), makrofāgi, kas ir diferencēti no THP-1 šūnu līnijas, pēc savām funkcionālām pazīmēm ir vairāk līdzīgi *in vivo* diferencētajiem veselajiem makrofāgiem. Atšķirībā no vesela cilvēka makrofāgiem, THP-1 šūnu līnijai ir raksturīga homogēna šūnu populācija, kas atvieglo pētījuma veikšanu (113). Pateicoties aprakstītajām pazīmēm, eksperimentam ir izvēlēta tieši THP-1 šūnu kultūra. Šūnu kultūra tika saņemta sasaldētā veidā. Pēc šūnu atkausēšanas ūdens vannā (Stuart SBS40), šūnas kultivē RPMI-1640 medium (Sigma) barotnē ar 10% liellopa embrija serumu (*fetal bovine serum - FBS*) (Sigma-Aldrich) un penicilīna 100 AV/streptomocīna 100  $\mu\text{g/ml}$  (Gibco) piedevu. Kultivēšanai ir nepieciešami noteikti apstākļi - 37°C temperatūra, 5% CO<sub>2</sub> un 95% mitruma, kurus nodrošina inkubators (Mettler).

### **2.3. EV iezīmēšana**

Pētījumā tiek izmantoti 4 ekstracelulāro vezikulu vadi:

- SW480 šūnu līnijas normokijas apstākļos sekretētās EV
- SW480 šūnu līnijas hipoksijas apstākļos sekretētās EV
- SW620 šūnu līnijas normokijas apstākļos sekretētās EV
- SW620 šūnu līnijas hipoksijas apstākļos sekretētās EV

EV ir saņemtas no prof. A.Linē grupas (Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs). Ekstracelulāro vezikulu iezīmēšanai izmanto 1 µl Syto RNaselect (Invitrogen) šķīdumu. Syto RNaselect ir zaļā fluorescentā krāsviela, kuras absorbcijas maksimums ir pie 490/530 nm viļņa garuma. Fluorescentā krāsviela saistās pie RNS, kas atrodas ekstracelulārajās vezikulās. EV iezīmēšanas reakcijas maisījuma pagatavošanai izmanto 1 µl Syto RNaselect (1mM), EV un PBS. Kopējais maisījuma tilpums ir 100 µl. Tā kā četros eksperimentos EV tilpums, kas tika izmantots EV endocitozes ceļa noteikšanai monocītos, bija atšķirīgs (atkarīgs no proteīnu koncentrācijas EV paraugā), PBS daudzumu aprēķina pēc formulas:

$$V_{\text{PBS}} = 100 \mu\text{l} - V_{\text{Syto RNaselect}} - V_{\text{EV}}$$

$$V_{\text{PBS}} = 100 \mu\text{l} - 1 \mu\text{l} - V_{\text{EV}}.$$

Pagatavoto maisījumu inkubē 20 minūtes inkubatorā (Mettler) pie 37°C temperatūras, 5% CO<sub>2</sub>. Pēc inkubēšanas atbrīvojas no krāsvielas, kas nesaistījās ar RNS ekstracelulārajās vezikulās, izmantojot Exosome Spin Columns MW 3000 (Invitrogen).

Gelam, kas atrodas Exosome Spin kolonnās, pievieno 650 µl PBS samitrināšanai, samaisa ar vorteksa palīdzību un atstāj istabas temperatūrā. Pēc 10 minūtēm kolonnas ievieto 2 ml stobriņos, kurus centrifugē 2 minūtes ar ātrumu 2200 apgriezieni/ minūtē ar mērķi atbrīvoties no pārpalikušā šķidrums. No inkubatora izņem pagatavotus EV un krāsvielas maisījumus un uzklāj tos gela centrā. SytoRNA kontroles paraugu arī uzliek uz gēla. Nākamajā solī ir nepieciešams ievietot kolonnas 1,5 ml stobriņos un centrifugēt 2 minūtes ar ātrumu 2200 apgriezieni/ minūtē. Beigās ir iegūts EV saturošs eluāts, kuru izmanto nākamajā pētījuma posmā.

#### **2.4. EV uzņemšanas un endocitozes ceļa noteikšana THP-1 šūnu līnijā**

Pētot EV uzņemšanu un endocitozes ceļas noteikšanu monocītu šūnās, izmanto plūsmas citometrijas metodi. Rezultātu apstiprināšanai izmanto fluorescentās mikroskopijas metodes.

##### **2.4.1. EV uzņemšanas un endocitozes ceļa noteikšana THP-1 šūnu līnijā ar plūsmas citometrijas metodi**

Pētījumam ir nepieciešama 96 lauciņu plate (Sarstedt). 9 lauciņus piepilda ar 50 µl THP-1 šūnu suspensiju (šūnu koncentrācija suspensijā ir 2 milj. šūnu uz 1ml). Šūnas pirms tam bija kultivētas RPMI-1640 medium (Sigma) barotnē ar 10% fetālo liellopa serumu

(Sigma-Aldrich) un penicilīna 100 AV/streptomicīna 100 µg/ml (Gibco) piedevu. Pirmie četri lauciņi ir paredzēti kontroles paraugiem, pēdējos piecos lauciņos notiks inhibitoru iedarbības pārbaude.

Kopumā sanāk aizpildīti 9 lauciņi. Ja numurē lauciņus pēc kārtas, tajos atrodas:

1. THP-1 šūnas
2. THP-1 šūnas ar šķīdinātāju DMSO
3. THP-1 ar filtrētu Syto RNaselect iezīmi (Invitrogen)
4. EV iezīmētas ar Syto RNaselect – pozitīva kontrole
5. THP-1 šūnas + EIPA + iezīmētas ar Syto RNaselect EV
6. THP-1 šūnas + hlorpromazīns + iezīmētas ar Syto RNaselect EV
7. THP-1 šūnas + dainazors + iezīmētas ar Syto RNaselect EV
8. THP-1 šūnas + nistatīns + iezīmētas ar Syto RNaselect EV
9. THP-1 šūnas + citohalazīns D + iezīmētas ar Syto RNaselect EV

Šajā pētījumā tiks izmantoti 5 izvēlētie endocitozes inhibitori: EIPA, hlorpromazīns, dainazors, nistatīns un citohalazīns D. EIPA inhibē makropinocitozi, hlorpromazīns nobloķē klatrīna atkarīgo endocitozi, dainazoru izmanto kaveolīna atkarīgās endocitozes inhibēšanai, bet dainazoram ir ietekme arī uz klatrīna atkarīgo endocitozi un lipīdu plostu ierosināto endocitozi. Nistatīns inhibē kaveolīna atkarīgo endocitozi un lipīdu plostu ierosināto endocitozi, bet citohalazīns D nobloķē fagocitozi un makropinocitozi.

Katrā no 9 ailītēm pievieno šūnu barotni, nepieciešamo barotnes daudzumu aprēķina pēc formulas:

$V_{\text{šūnu barotne}} = V_{\text{reakcijas kopējais}} - V_{\text{šūnu suspensija}} - V_{\text{EV, kas atbilst 1 mikrogramam}} - V_{\text{endocitozes inhibitors}}$

$V_{\text{šūnu barotne}} = 100 \mu\text{l} - 50 \mu\text{l} - V_{\text{EV, kas atbilst 1 mikrogramam}} - V_{\text{endocitozes inhibitors}}$

Sākotnējā EV koncentrācija katrā no četriem EV veidiem (normoksijas un hipoksijas apstākļos sekretētās SW480 un SW620 šūnu līniju EV) ir dažāda. Tāpēc katrā pētījumā (kopumā četri pētījumi ar katru EV veidu) EV tilpums, kas atbilst vienam mikrogramam, ir aprēķināts individuāli. Lai dabūt inhibitoru vajadzīgo koncentrāciju, izmanto tādus inhibitoru tilpumus, kas ir norādīti 2.1. tabulā.

**Pētījumā izmantotie inhibitori, to koncentrācijas un nepieciešamie inhibitoru tilpumi**

Inhibitora nosaukums	Ražotājs, kataloga Nr.	Izejas koncentrācija	Vēlamā koncentrācija	Nepieciešamais tilpums uz 100 $\mu$ l
EIPA	Cayman Chemical, 14406	320 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1,6 $\mu$ l
Hlorpromazīns	Sigma, C8138	320 $\mu$ M	10 $\mu$ M	3,1 $\mu$ l
Dainazors	Sigma, D7693-5MG	320 $\mu$ M	80 $\mu$ M	25,0 $\mu$ l
Nistatīns	Sigma, N6261-5MU	320 $\mu$ M	20 $\mu$ M	6,3 $\mu$ l
Citohalazīns D	Sigma, C8273	320 $\mu$ M	20 $\mu$ M	6,3 $\mu$ l

Pēc šūnu barotnes pievienošanas pievieno endocitozes inhibitorus 5.-9. ailītēs tādos tilpumos, kādi ir norādīti 2.1. tabulā. Veic DMSO šķīduma pagatavošanu tā, lai šķīduma koncentrācija būtu 20.6  $\mu$ l uz 1 ml šūnu barotnes. Pievieno DMSO šķīdumu otrajā kontroles lauciņā. Šūnu plati novieto inkubatorā uz 30 minūtēm. Izņemot no inkubatora, visās ailītēs, izņemot pirmās trīs kontroles ailītes, pievieno iepriekšpagatavotas iezīmētas Syto RNaselect ekstracelulārās vezikulas (pēc aprēķināta tilpuma). Trešajā ailītē pievieno atbilstošo Syto RNaselect tilpumu. Tas ir nepieciešams, lai varētu noteikt nesaistītas iezīmes iespējamo reakciju. Veic inkubēšanu vienu stundu.

Kamēr notiek inkubēšana, var samarķēt 1,5 ml stobriņus. Pēc inkubēšanas stobriņos pārnes katras attiecīgās ailītes saturu. Šūnu skalošanai visos stobriņos pievieno 1ml PBS. Stobriņus ievieto centrifūgā un ieslēdz aparātu uz 2000 apgriezieniem minūtē. Pēc 5 minūšu centrifugēšanas nolej supernatantu, palikušajām šūnām pievieno PBS līdz 200  $\mu$ l. Samaisa ar vorteksa palīdzību.

Veic plūsmas citometriju ar Guava easyCyte 8HT aparāta palīdzību. Plūsmas citometrs izmēra Syto RNaselect fluorescenci zaļajā kanālā. No sākumā notiek Syto RNaselect ierosināšana pie 490 nm viļņa garuma, bet emisija notiek pie 530 nm viļņa garuma. Datu analīzei izmanto Millipore Guava programmu Express Pro. Iegūtie dati tiek eksportēti uz programmu Microsoft Excel.

#### 2.4.2. EV uzņemšanas noteikšana THP-1 šūnās ar fluorescentās mikroskopijas palīdzību

THP-1 šūnu līnijas monocītus iesēj 96 lauciņu platē (Sarstedt). Iesēšanas blīvums ir  $1 \times 10^5$  šūnu uz 100  $\mu$ l barotnes. Pēc ekstracelulāro vezikulu (10  $\mu$ g/ml) pievienošanas inkubē 1 stundu pie 37° C temperatūtas. Izņemot plati no inkubatora, ir nepieciešama šūnu skalošana ar 1 ml PBS (Amresco), šūnas pārvieto *Ependorfa* tipa stobriņos. Nākamajā posmā seko 5 minūšu šūnu centrifugēšana ar ātrumu 2000 apgriezieni/minūtē. Supernatantu nolej, bet šūnas apstrādā ar ar 4% paraformaldehīda šķīdumu. Atstāj istabas temperatūrā uz 20 minūtēm. Pēc tam 2 reizes veic šūnu skalošanu ar 1ml PBS. Pēc skalošanas šūnas centrifugē 5 minūtes ar ātrumu 2000 apgriezieni/minūtē. Supernatantu nolej, šūnu šķīdumu uztriepj uz adhēzijas priekšmetstikliņa (Marienfeld). Uztriepes izžūšanai pie istabas temperatūras ir nepieciešamas 12 stundas. Šūnu kodolu iezīmēšanai izmanto ProLong Gold Antifade Mountant ar DAPI (Invitrogen). Kad paraugs ir gatavs, mikroskopēšanu veic ar Eclipse Ti mikroskopu (Nikon Instruments Inc.), izmantojot Nikon S Plan Fluor ELWD 40x/0.60 objektīvu. Syto RNaselect ierosināšanai izmanto 488 nm lāzera viļņa garumu, bet DAPI ierosināšanai - 405 nm lāzera viļņa garumu. Syto RNaselect fluorescences uztveršanai izmanto 525/50 nm frekvenču joslas filtru (*band pass filter*) (Nikon Instruments Inc.), DAPI fluorescences uztveršanai - 447/60 nm frekvenču joslas filtru (Nikon Instruments Inc.). Fluorescence katrā kanālā tika reģistrēta atsevišķi, lai izvairītos no spektrālās pārklāšanās. Attēlu apstrādei izmanto Nis-Elements C 4.13 programmatūru (Nikon Instruments Inc.).

#### 2.5. Monocītu diferenciacija un EV pievienošana

Monocītu šūnas (THP-1 šūnu līnija), kas kultivētas kopā ar barotni RPMI-1640 (Sigma) ar 10% FBS (Sigma-Aldrich) un antibiotiku piedevu (Gibco), izsēj 24 lauciņu platē (SPL Life Sciences). Izsēšanas blīvums ir  $0,5 \times 10^6$  šūnu vienā lauciņā uz 0,5 ml barotnes. Šūnu skaitu nosaka ar Luna Cell Counting Slides palīdzību. Uz šūnu skaitīšanas priekšmetstikliņa novieto šķīduma paraugu un, priekšmetstikliņu ievietojot šūnu skaitīšanas aparātā Luna-II™ (Logos Biosystems), aparāts pats automātiski nosaka šūnu skaitu noteiktajā tilpumā.

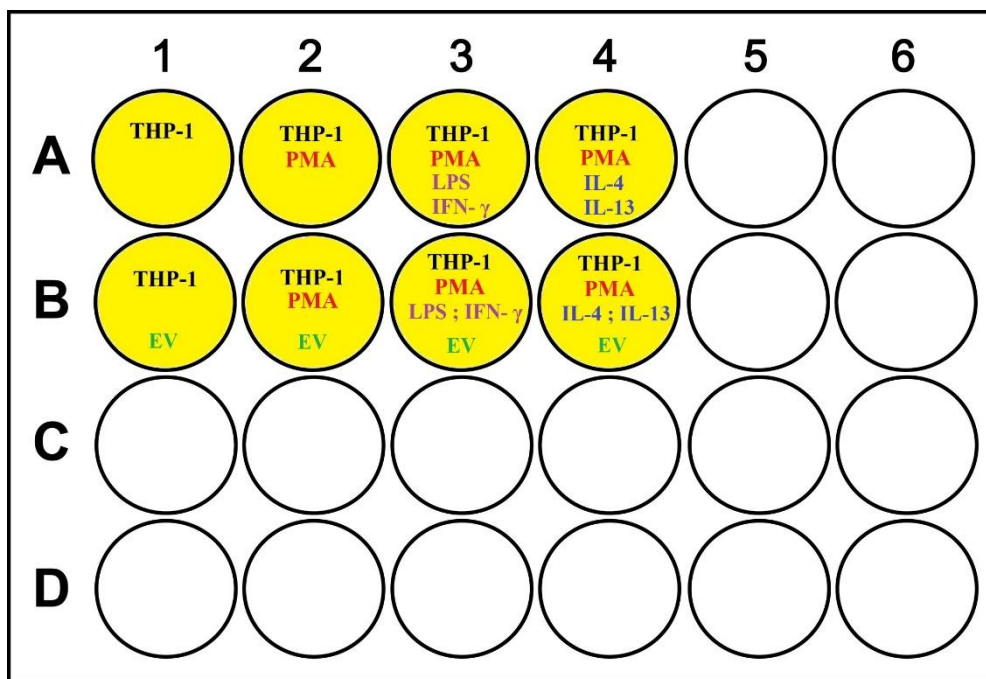
Pēc shēmas pievieno 150 nM forbola 12-miristāta 13-acetātu (PMA) monocītu diferencēšanai par neaktīviem (M0) makrofāgiem. Uz 0,5 ml izmanto 0,6  $\mu$ l no 0,125 mM izejas standartšķīduma (*stock solution*). Plati novieto inkubatorā uz 24 stundām. Pēc inkubācijas diferenciacijas barotni nomaina ar 0,5 ml RPMI-1640 barotni. Veic inkubāciju 24

stundu garumā. Izņemot plati no inkubatora, šūnām pēc shēmas pievieno ekstracelulārās vezikulas.

Pēc vienas stundas pievieno pēc shēmas polarizācijas reaģentus: 10 pg/ml LPS (R&D Systems) (1 µl no 5 ng/ml LPS rezerves standartšķīduma) un 20ng/ml IFN- γ (R&D Systems) (0,5 µl no 20 µg/ml IFN- γ rezerves standartšķīduma), kas veicina makrofāgu polarizāciju par M1 makrofāgiem, un 20 ng/ml interleikīnu 4 (R&D Systems) un 20 ng/ml interleikīnu 13 (R&D Systems). Abus interleikīnus ņem pa 1 µl no 10 µg/ml izejas standartšķīduma. IL-4 un IL-13 polarizē makrofāgus par M2 makrofāgiem. Ailišu saturs ir shematiski atainots 2.1. attēlā. Šūnas inkubē 48 stundas. Diferenciācijas rezultātā makrofāgiem izmainās:

- šūnu morfoloģija
- citokīnu sekrēcija
- virsmas marķieru ekspresija uz šūnu virsmas

Pētījuma gaitā katras 24 stundas tika veikta mikroskopēšana ar fāžu kontrasta mikroskopa Evos XL (AMG) palīdzību ar mērķi konstatēt šūnu morfoloģiskās pārmaiņas diferenciācijas rezultātā. Virsmas marķieru analīzi veic ar plūsmas citometrijas metodi. Izdalīto citokīnu paraugi tika savākti un sasaldēti, bet pētījumā ietvaros netika analizēti.



2.1.att. Plates shēma

## 2.6. EV ietekmes noskaidrošana uz monocītu diferenciāciju ar plūsmas citometrijas palīdzību

Pēc inkubācijas monocītu šūnas atsūc, pārvieto uz 1,5 ml *Ependorf* tipa stobriņiem. Šķīdumu stobriņos centrifugē 5 minūtes ar centrifūgas aparātu LMC-3000 ar ātrumu 1200 apgriezieni minūtē. Pabeidzot centrifugēšanu, supernatantus pārvieto (nolej) citos stobriņos. Stobriņus ar supernatantu atliek kastē.

Ailītēs, kur atrodas makrofāgi, atsūc šķīdumu atsevišķos stobriņos, kur arī pievieno šķīdumu no skalošanas, kuru veic ar 0,5 ml PBS katrā ailītē. Stobriņus ar šķīdumiem ieliek kastē, kur jau atrodas 2 stobriņi ar monocītu centrifugēšanas supernatantiem. Šos stobriņus izmantos citokīnu analīzei, lai secināt par makrofāgu diferenciāciju (makrofāgu apakštipiem atšķiras sekretēto citokīnu profils). Kasti novieto saldētavā Arctiko, kur temperatūra ir  $-80^{\circ}\text{C}$ . Šī bakalaura darba ietvaros citokīnu analīze netika veikta.

Nākamajā posmā pievieno katrā ailītē 0,2 ml *Accutase*. Akutāzi pirms tam sasilda ūdens vannā Stuart SBS40. Akutāze ir nepieciešama, lai atrautu makrofāgu šūnas no plates virsmas, jo atšķirībā no monocītiem, kas brīvi pārvietojas šķīdumā, makrofāgi ir adherentās šūnas un piestiprinās pie plates virsmas, tā ir viena no pazīmēm par monocītu veiksmīgo diferenciāciju makrofāgos. Lai akutāze iedarbotos, nepieciešams plati ar šūnām un akutāzi inkubēt 20 minūtes  $37^{\circ}\text{C}$  inkubatorā Memmert. Pēc 20 minūtēm fāžu kontrasta mikroskopā Evos XL (AMG) pārbauda šūnu atraušanos, ja nepieciešams, šūnu atraušanos var saudzīgi mehāniski stimulēt. Ailīšu saturu pārnes uz ml *Ependorf* tipa stobriņiem. Katru ailīti skalo ar 500  $\mu\text{l}$  PBS, arī to šķīdumu pievieno attiecīgajiem stobriņiem. Stobriņus centrifugē 5 minūtes ar ātrumu 1200 apgriezieni/minūtē. Pēc centrifugēšanas nolej supernatantus un uzmanīgi atsūc atlikušo šķīdumu. Visos stobriņos (arī stobriņos ar monocītu nogulsniem, kurus dabūjam pētījuma sākumā) ir nepieciešams resuspendēt šūnu nogulsnes ar 100  $\mu\text{l}$  1% FBS/PBS palīdzību. 50 ml 1% FBS/PBS šķīdumu iepriekš pagatavo, pie 49,5 ml PBS pievienojot 0,5 ml FBS. Pēc tam katrā stobriņā pievieno 3  $\mu\text{l}$  Fc Receptor block (BD Pharmingen), lai izvairītos no antivielu nespecifiskās saistīšanās pie Fc receptoriem. Viegli vorteksē. Inkubē 10 minūtes istabas temperatūrā. Nākamajā solī ir nepieciešams katrā stobriņā esošo šķīdumu sadalīt 4 pēc tilpuma vienādās daļās. 3 paraugos pievienosim antivielas, bet ceturtais paraugs ir negatīvais paraugs. Sadalām paraugus stobriņos. Katrā stobriņā pievieno 1% FBS/PBS līdz 100  $\mu\text{l}$ . Pievieno antivielas: 10  $\mu\text{l}$  PE Mouse Anti-Human CD14 (BD Pharmingen), 10  $\mu\text{l}$  PE Mouse Anti-Human CD206 (BD Pharmingen) un 5  $\mu\text{l}$  PerCP-Cy 5.5 Mouse Anti-Human HLA-DR (BD Pharmingen). Viegli vorteksē. Visus stobriņus saliek plastmasas statīvā.

Stafīvu aptin ar foliju un atstāj uz 30 minūtēm inkubēties istabas temperatūrā. Pēc inkubācijas pievieno 1 ml PBS katrā stobriņā. Visus paraugus centrifugē 5 minūtes ar ātrumu 2000 apgriezieni/minūtē. Supernatantu nolej, nogulsnes resuspendē ar 150 µl PBS. Viegli vorteksē. Veic plūsmas citometrijas analīzi. Analīzei izmanto Guava EasyCyte (Millipore) aparātu. Plūsmas citometrijas dati tika analizēti ar FlowJo 10. versijas programmatūru (Tree Star Inc.).

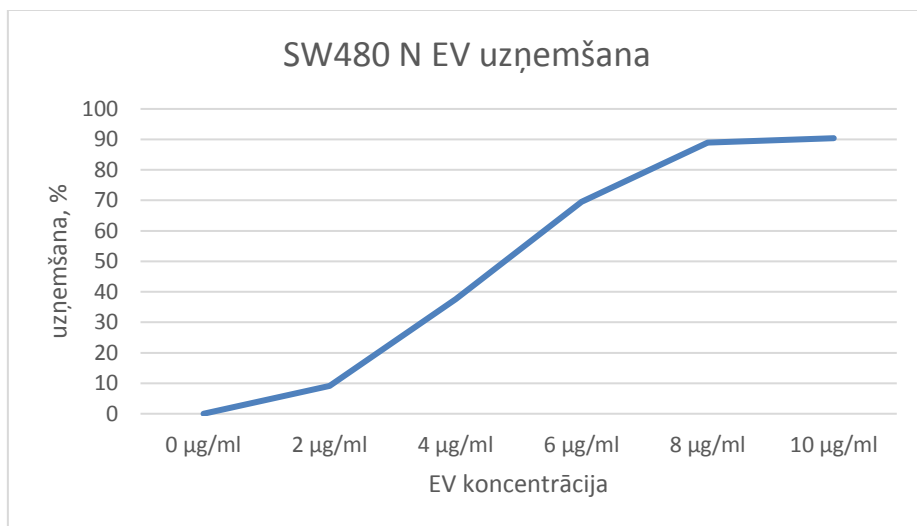
## **2.7. Datu apstrāde un statistiskā analīze**

Dati tika apstrādāti Microsoft Excel 2013 un GraphPad Prism 7 programmās. GraphPad Prism programmā izmantoja Anova testu (*ordinary one-way Anova*). Atšķirību uzskata par statistiski ticamu pie  $p < 0,05$ .

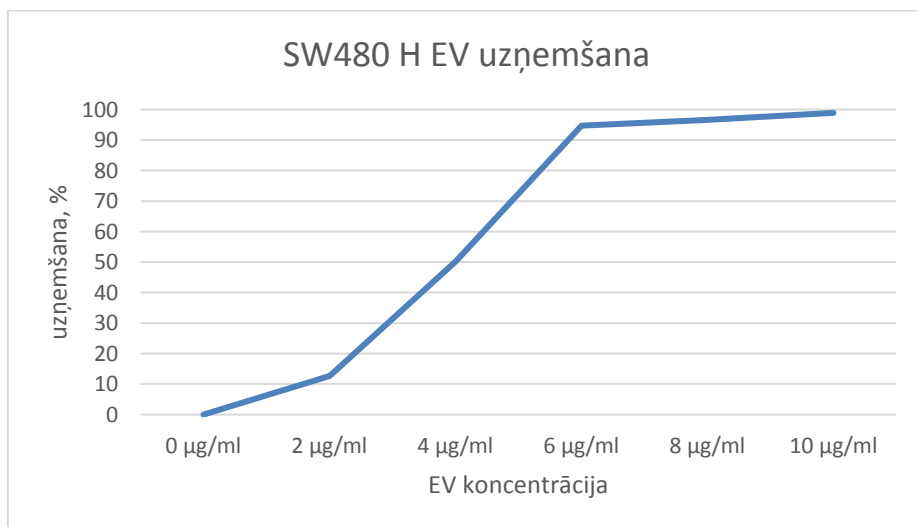
### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1. EV uzņemšanas noteikšana THP-1 šūnās ar plūsmas citometrijas metodi un ar fluorescentās mikroskopijas palīdzību

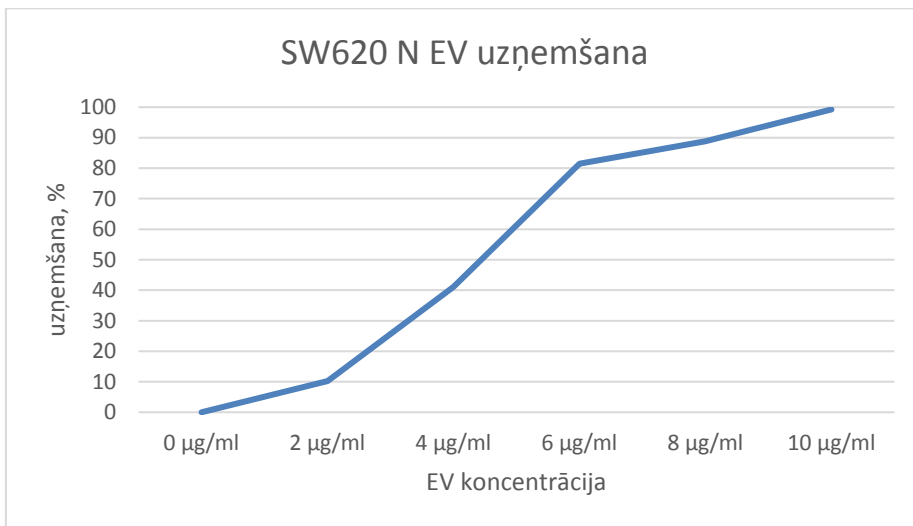
Lai būtu iespējams veikt pētījumu par ekstracelulāro vezikulu uzņemšanu un to ietekmi uz monocītiem, no sākuma ir nepieciešams izrēķināt optimālo EV koncentrāciju, pie kuras notiek visefektīvākā ekstracelulāro vezikulu uzņemšana THP-1 šūnās, lai to koncentrāciju varētu izmantot pētījumos. Rezultāti par EV koncentrācijas ietekmi uz EV uzņemšanu monocītu šūnās ir atspoguļoti 3.1., 3.2., 3.3. un 3.4. attēlos.



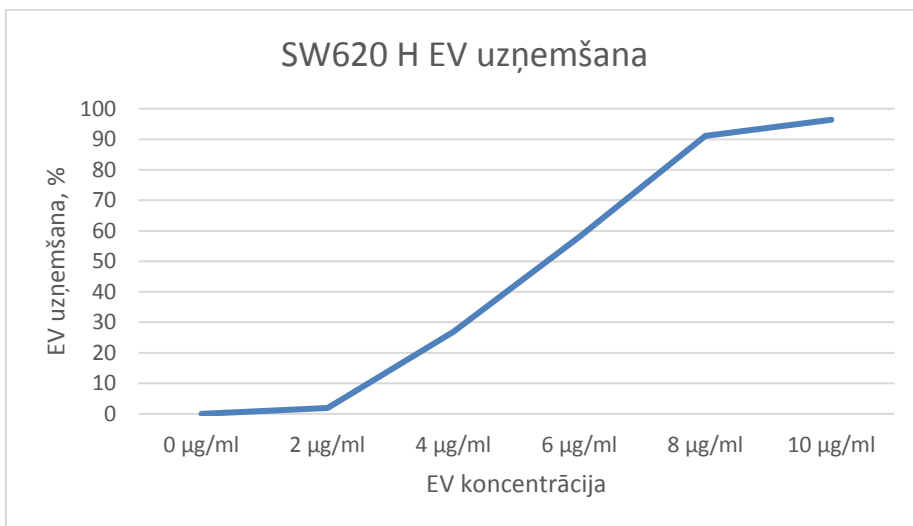
3.1. att. SW480 N EV koncentrācijas ietekme uz EV uzņemšanu THP-1 šūnās



3.2. att. SW480 H EV koncentrācijas ietekme uz EV uzņemšanu THP-1 šūnās



3.3. att. SW620 N EV koncentrācijas ietekme uz EV uzņemšanu THP-1 šūnās

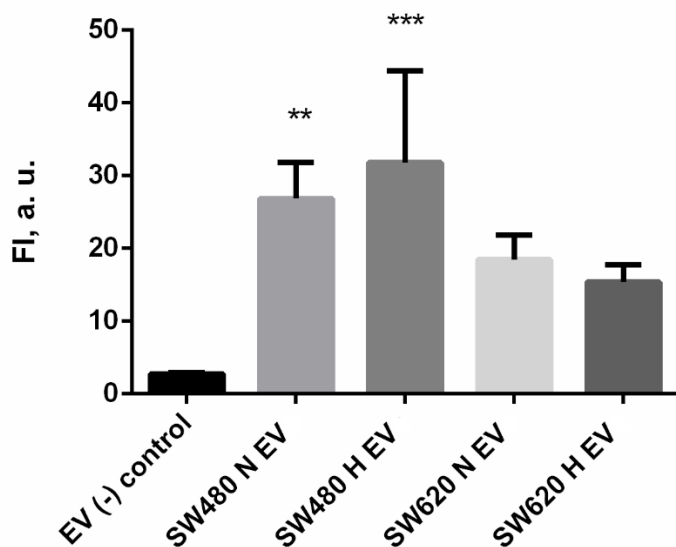


3.4. att. SW620 N EV koncentrācijas ietekme uz EV uzņemšanu THP-1 šūnās

Izanalizējot iegūtos grafikus, tika izlemts pētījumos izmantot 10 µg/ml SW480 N EV, SW480 H EV, SW620 N EV un SW620 H EV koncentrācijas, jo pie 10 µg/ml EV koncentrācijas bija novērota vislielākā (%) EV uzņemšana THP-1 šūnās: SW480 N EV tika uzņemtas 90% monocītos, SW480 H EV – 99% monocītos, SW620 N EV – 99% šūnās un SW620 H EV – 96% monocītos.

Iezīmētās ekstracelulārās vezikulas kultivēja kopā ar THP-1 šūnu līnijas monocītiem. Lai noskaidrotu, vai monocītu šūnas uzņem EV, tika pielietota plūsmas citometrijas metode. Analizējot šūnas, plūsmas citometrs Guava easyCyte 8HT reģistrē Syto RNaselect iezīmes fluorescenci, no sākuma ierosinot Syto RNaselect pie 490 nm viļņa garuma, pēc tam detektējot emisiju pie 530 nm viļņa garuma. Ja monocītu šūnai aparāts uztvēra fluorescenci pie 530 nm, tas nozīmē, ka RNS, pie kura saistās Syto RNaselect, no ekstracelulārajām

vezikulām nonāca monocītu šūnā, kas ļauj secināt par EV uzņemšanu THP-1 šūnās. Uztverot fluorescenci, datus var atspoguļot, izmantojot divus parametrus: fluorescences intensitāti un pozitīvo šūnu skaitu, kuram detektēja fluorescenci. Pētījumā iegūtie rezultāti ir atainoti 3.5. un 3.6. attēlos.



3.5. att. THP-1 šūnu, kas inkubētas ar SW480 un SW620 šūnu līniju normoksijas un hipoksijas apstākļos sekretētām EV, fluorescences intensitāte. Rezultāti ir iegūti 5 atkārtojumos. Stabiņi uzrāda vidējo vērtību  $\pm$  SEM. Apzīmējumi: N - normoksijas apstākļos sekretētās EV, H – hipoksijas apstākļos sekretētās EV, \*\* -  $p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p \leq 0.001$ . Analīze tika veikta ar Anova testu (*One-way ANOVA*).

3.5. attēlā ir atspoguļotas THP-1 šūnu, kultivēto kopā EV, fluorescences intensitātes salīdzinājumā ar kontroles grupu (THP-1 šūnas kultivētas bez EV). Ir analizēti 4 paraugi:

1. THP-1 šūnas, inkubētas kopā ar SW480 šūnu līnijas normoksijas (N) apstākļos sekretētām EV
2. THP-1 šūnas, inkubētas kopā ar SW480 šūnu līnijas hipoksijas (H) apstākļos sekretētām EV
3. THP-1 šūnas, inkubētas kopā ar SW620 šūnu līnijas normoksijas (N) apstākļos sekretētām EV
4. THP-1 šūnas, inkubētas kopā ar SW620 šūnu līnijas hipoksijas (H) apstākļos sekretētām EV

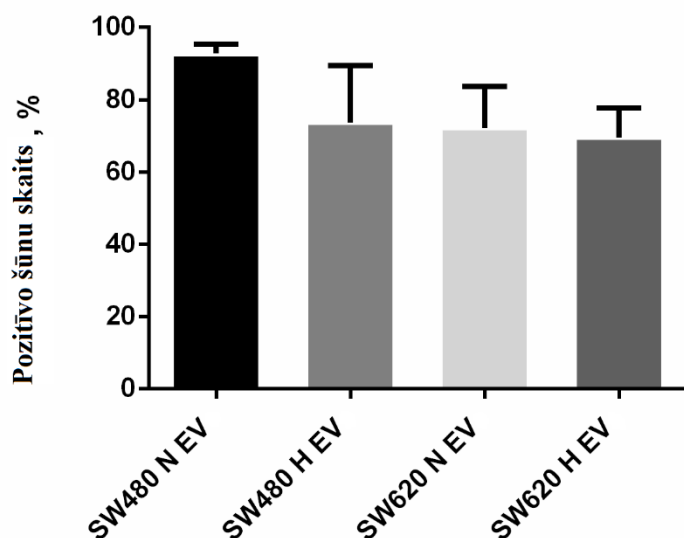
3.5. attēls uzrāda, ka visiem četriem THP-1 šūnu paraugiem ir paaugstināta fluorescences intensitāte salīdzinājumā ar kontroles grupu:

- THP-1 šūnām, inkubētām ar SW480 N EV, fluorescences intensitāte ir 10 reizes augstāka nekā kontroles grupai
- THP-1 šūnām, inkubētām ar SW480 H EV, fluorescences intensitāte ir 12 reizes augstāka nekā kontroles grupai
- THP-1 šūnām, inkubētām ar SW620 N EV, fluorescences intensitāte ir 7 reizes augstāka nekā kontroles grupai
- THP-1 šūnām, inkubētām ar SW620 H EV, fluorescences intensitāte ir 6 reizes augstāka nekā kontroles grupai

Statistiski ticama atšķirība pastāv starp THP-1 šūnām, inkubētām kopā ar SW480 N EV, un kontroles grupu ( $p \leq 0.01$ ) un starp THP-1 šūnām, inkubētām kopā ar SW480 H EV, un kontroles grupu ( $p \leq 0.001$ ). Vislielāko fluorescences intensitāti (vidēji 31,80 a.u.) uzrādīja THP-1 šūnas, kultivētas kopā ar SW480 H EV. Vismazākā fluorescences intensitāte (vidēji 15,40 a.u.) bija detektējama THP-1 šūnām, inkubētām ar SW480 N EV. Tā kā fluorescences intensitāte ir paaugstināta visiem četriem THP-1 šūnu paraugiem, var secināt, ka THP-1 šūnu līnijas monocīti uzņem visus četrus EV paraugus.

Salīdzinot EV uzņemšanu no SW480 un SW620 šūnu līnijām, ir redzams, ka pastāv statistiski ticama atšķirība fluorescences intensitātē starp THP-1 šūnām, inkubētām ar SW480 N EV un SW480 H EV, un kontroles grupu, bet statistiski ticama atšķirība fluorescences intensitātē starp THP-1 šūnām, inkubētām ar SW620 N EV un SW620 H EV, un kontroles grupu nebija konstatēta. Tas nozīmē, ka dotajā pētījumā THP-1 monocīti uzņem labāk EV no SW480 šūnu līnijas, nekā no SW620 šūnu līnijas.

Salīdzinot hipoksijas apstākļos sekretēto EV uzņemšanu un normoksijas apstākļos sekretēto EV uzņemšanu, ir konstatēts, ka THP-1 šūnām, inkubētām kopā ar SW480 H EV, fluorescences intensitāte ir 1,2 reizes augstāka nekā THP-1 šūnām, kultivētām kopā ar SW480 N EV. Tas varētu liecināt par to, ka no SW480 šūnu līnijas augstāka uzņemšana ir hipoksiskos apstākļos sekretētām EV, nekā normoksijas apstākļos sekretētām EV. SW620 šūnu līnijas EV uzrādīja pretēju rezultātu - THP-1 šūnām, kultivētām kopā ar SW620 H EV, fluorescences intensitāte ir 1,2 reizes zemāka nekā THP-1 šūnām, kultivētām kopā ar SW620 N EV. Tas liecina, ka no SW620 līnijas augstāka uzņemšana ir normoksijas apstākļos sekretētām EV. Vispārinot rezultātus, nevar izdarīt kopēju secinājumu par normoksijas un hipoksijas apstākļos sekretēto EV uzņemšanas salīdzinājumu, jo pastāv atšķirības starp šūnu līnijām, no kurām izdalīja EV.



3.6. att. THP-1 šūnu, kas inkubētas ar EV, procentuālais daudzums (%), kuram detektēja fluorescenci. Rezultāti ir iegūti 5 atkārtojumos. Stabiņi uzrāda vidējo vērtību  $\pm$  SEM. Analīze tika veikta ar Anova testu (*One-way ANOVA*).

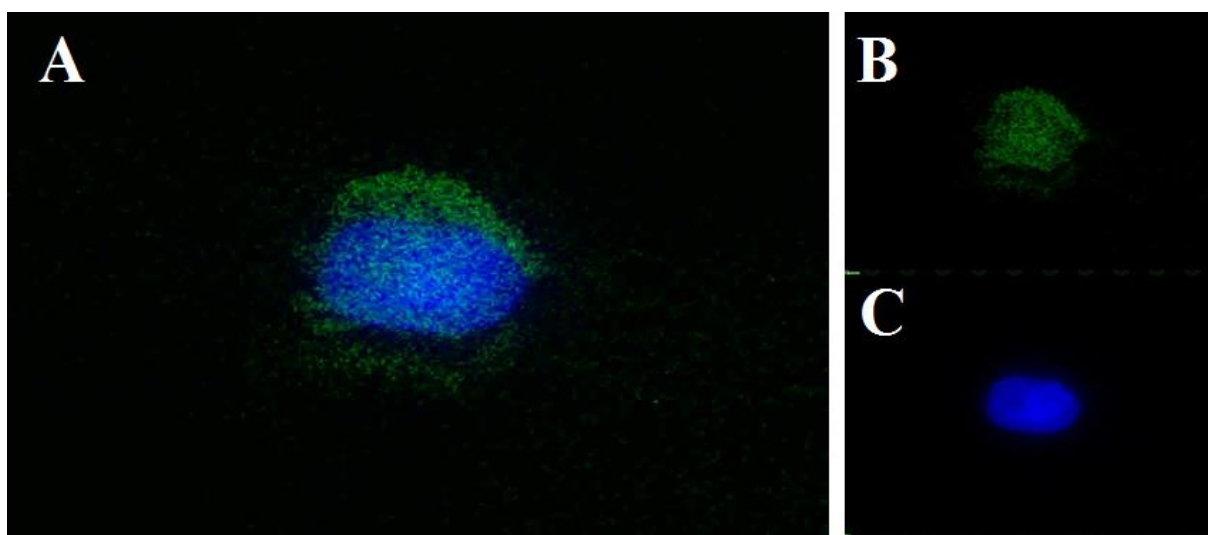
Tā kā otrs rezultātu uzrādīšanas veids ir fluorescences pozitīvo šūnu skaita (%) atainošana, 3.6. attēlā ir atspoguļoti dati par THP-1 šūnu, inkubētu kopā ar četriem EV veidiem, daudzumu (%), kuram detektēja fluorescenci. Attiecība ir ņemta pret monocītu kopējo skaitu paraugā. Pētījumā fluorescenci uzrādīja vidēji 93 % no THP-1 šūnām, kultivētām ar SW480 N EV, vidēji 74 % no THP-1 šūnām, kultivētām ar SW480 H EV, vidēji 72% no THP-1 šūnām, kultivētām ar SW620 N EV, vidēji 70 % no THP-1 šūnām, kultivētām ar SW620 H EV. Kopumā var pateikt, ka dati, kas ir redzami 3.2. attēlā, arī apliecina, ka procentuāli lielākā daļa no THP-1 šūnām uzņem visus četrus EV veidus. Salīdzinot savā starpā, lielāks procentuālais fluorescences pozitīvo šūnu daudzums ir THP-1 šūnām, kultivētām ar SW480 N EV, kas varētu liecināt par to, ka monocītu šūnas labāk uzņem SW480 N EV, bet tas ir pretrunā ar informāciju no 3.1. attēla, kurā parādītie dati liecina, ka visaugstākā fluorescences intensitāte ir THP-1 šūnām, kultivētām kopā ar SW480 H EV.

Par EV uzņemšanu THP-1 šūnās vizuāli var pārlicināties, izmantojot fluorescento mikroskopiju. Sagatavojot pētāmo paraugu, RNS, kas atrodas ekstracelulārajās vezikulās, tika iezīmētas ar Syto RNaselect, bet DNS iezīmēšanai monocītu kodolos izmantoja DAPI. Veicot analīzi, Syto RNaselect ierosināšanai izmanto 488 nm lāzera viļņa garumu, bet DAPI ierosināšanai - 405 nm lāzera viļņa garumu. Syto RNaselect fluorescences uztveršanai izmanto 525/50 nm frekvenču joslas filtru (*band pass filter*), DAPI fluorescences uztveršanai

- 447/60 nm frekvenču joslas filtru. Fluorescence katrā kanālā tika reģistrēta atsevišķi, lai izvairītos no spektrālās pārklāšanās. Rezultāti ir atspoguļoti 3.7. attēlā.

3.7.B attēlā ir uzņemta SW620 N ekstracelulāro vezikulu RNS bilde. RNS ir iespējams saskatīt, pateicoties iezīmei Syto RNaselect, kas fluorescē zaļā krāsā pie 525 nm viļņa garuma. 3.7.C attēlā ir saskatāms monocītu kodola DNS sakopojums, kas ir iezīmēts ar DAPI. DAPI fluorescē zilā krāsā pie 447 nm viļņa garuma. 3.7. A attēlā ir pārklātas B un C bildes. 3.7.A attēlā ir redzams, kas RNS no Syto RNaselect EV nonāk monocītu šūnās un koncentrējas ap šūnas kodolu. Tas vizuāli apstiprina EV uzņemšanu THP-1 šūnās.

Fluorescentā mikroskopija ir veikta ar visiem četriem EV veidiem, bet 3.7. attēlā ir atspoguļoti rezultāti tikai no SW620 N EV uzņemšanas pētījuma monocītos. Ar pārējiem EV veidiem bija novērots līdzīgs rezultāts.



**3.7. att. SW620 N EV uzņemšanas noteikšana THP-1 šūnās ar fluorescentās mikroskopijas palīdzību. A – pārklāti attēli, B – RNS no EV, C – monocītu kodola DNS**

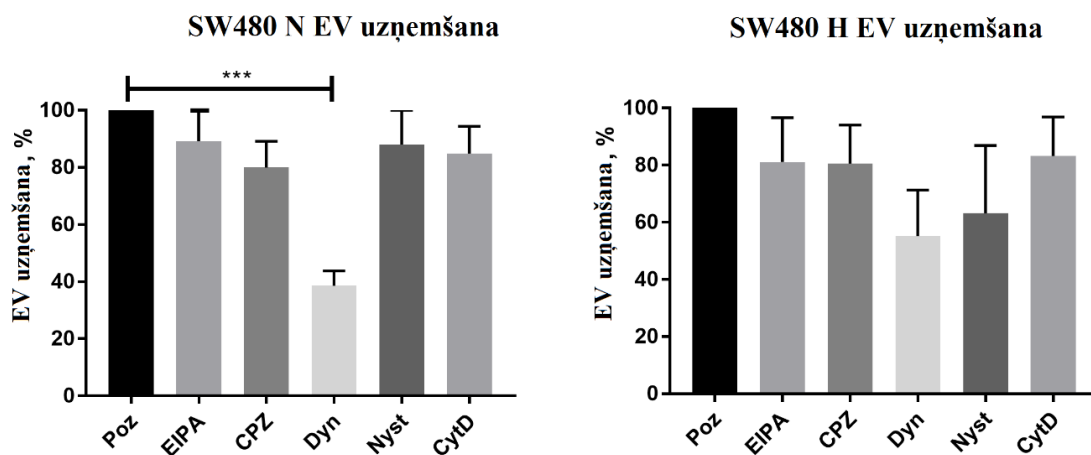
Apkopojot iegūtos rezultātus, var secināt, ka THP-1 šūnas uzņem visus četrus EV veidus. Novērojums, ka monocītu šūnas uzņem EV, atbilst citiem pasaulē veiktajiem pētījumiem. 2012. gadā eksperimentā ir pierādīts, ka monocīti, kas bija izolēti no Zviedrijas Sahlgrenska Universitātes slimnīcas pacientu asinīm, uzņem siRNA no plazmas eksosomām (114). Citā pētījumā ar plūsmas citometriju un konfokālās mikroskopijas palīdzību ir konstatēts, ka THP-1 un U937 šūnu līniju monocīti uzņem cilvēka embrionālo aknu šūnu HEK293T sekretētās EV (115). Arī ir izpētīts, ka hroniskās limfocitāzes MEC-1 šūnu līnijas sekretētās EV tiek uzņemtas monocītu šūnās (116).

Secinājums, ka monocīti uzņem EV, ļauj tālāk veikt pētījumu par EV endocitozes ceļas noteikšanu THP-1 šūnās un par EV ietekmi uz monocītu diferenciaciju.

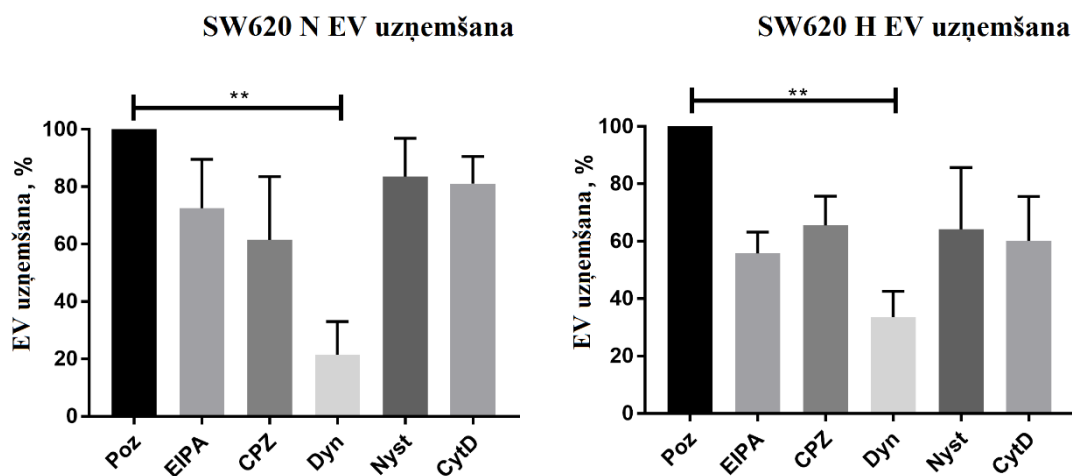
### **3.2. EV endocitozes ceļa noteikšana THP-1 šūnu līnijā ar plūsmas citometrijas metodi**

Izmantojot plūsmas citometrijas metodi, tika nolasīta fluorescences intensitāte THP-1 šūnām, kultivētām kopā ar EV, kas kalpo par pozitīvo kontroles paraugu, un THP-1 šūnām, kultivētām kopā ar EV un inhibitoriem. Pētījumā izmantoja 5 inhibitorus: EIPA (5  $\mu$ M), hlorpromazīns (10  $\mu$ M), dainazors (80  $\mu$ M), nistatīns (20  $\mu$ M) un citohalazīns D (20  $\mu$ M). Katra parauga uzņemto fluorescences intensitāti salīdzināja ar pozitīvas kontroles fluorescences intensitāti (FI parauga / FI kontroles). Attiecību pārveido procentuālajā attiecībā. Iegūtā attiecība attēlo EV uzņemšanu (%) katrā paraugā, salīdzinot ar kontroles paraugu, kuru uzņemšanu pieņem par 100%. Inhibīcijas spēja ir izskaitļota, no 100% atņemot konkrētā parauga EV uzņemšanas spēju (%). Iegūtie rezultāti par inhibitoru ietekmi uz EV uzņemšanu THP-1 šūnās ir atspoguļoti 3.8. un 3.9. attēlos.

3.8. attēlā ir parādīta inhibitoru ietekme uz SW480 šūnu līnijas normoksijas (N) un hipoksijas (H) apstākļos sekretēto EV uzņemšanu THP-1 šūnās. Rezultāti uzrāda, ka visos paraugos ar inhibitoriem samazinājās gan hipoksijas, gan normoksijas apstākļos SW480 šūnu līnijas sekretēto EV uzņemšana. Bet statistiski ticama atšķirība ( $p \leq 0.001$ ) pastāv tikai SW480 N EV uzņemšanā starp kontroles grupu un THP-1 šūnām, kurām pievienoja inhibitoru dainazoru. Šajā paraugā EV uzņemšana vidēji sastādīja tikai 39%, kas nozīmē, ka dainazors samazināja SW480 N EV uzņemšanu par 61%. Dotajā grafikā arī ir redzams, ka SW480 N EV uzņemšanu EIPA vidēji samazināja par 11%, hlorpromazīns – par 20%, nistatīns – par 12%, citohalazīns D – par 15%. Hipoksijas apstākļos sekretēto EV uzņemšanai inhibitoru ietekmē nebija statistiski ticamas atšķirības no kontroles grupas. SW480 H EV uzņemšanu EIPA samazināja par 19%, hlorpromazīns – par 19%, dainazors – par 45%, nistatīns – par 37%, citohalazīns D – par 17%. Arī šajā gadījumā vislielākā EV uzņemšanas inhibīcija ir novērojama dainazoram.



3.8. att. Inhibitoru ietekme uz SW480 šūnu līnijas sekretēto EV uzņemšanu THP-1 šūnās. Rezultāti ir iegūti 4 atkārtojumos. Stabiņi uzrāda vidējo vērtību ± SEM. Apzīmējumi: N – normoksijas apstākļi, H – hipoksijas apstākļi, Poz - pozitīva šūnu kontrole, EIPA - EIPA inhibitors, CPZ - hlorpromazīns, Dyn - dainazors, Nyst – nistatīns, CytD - citohalazīns D, \*\*\*-  $p \leq 0.001$ . Analīze tika veikta ar Anova testu (*One-way ANOVA*).



3.9. att. Inhibitoru ietekme uz SW620 šūnu līnijas sekretēto EV uzņemšanu THP-1 šūnās. Rezultāti ir iegūti 4 atkārtojumos. Stabiņi uzrāda vidējo vērtību ± SEM. Apzīmējumi: N – normoksijas apstākļi, H – hipoksijas apstākļi, Poz - pozitīva šūnu kontrole, EIPA - EIPA inhibitors, CPZ - hlorpromazīns, Dyn - dainazors, Nyst – nistatīns, CytD - citohalazīns D, \*\* -  $p \leq 0.01$ . Analīzi veica ar Anova testu (*One-way ANOVA*).

3.9. attēlā ir atainota inhibitoru ietekme uz SW620 šūnu līnijas sekretēto EV uzņemšanu THP-1 šūnās. Arī kā iepriekšējā attēlā, ir pamanāms, ka visi inhibitori samazina gan hipoksijas, gan normoksijas apstākļos sekretēto EV uzņemšanu. Statistiski ticama atšķirība ( $p \leq 0.01$ ) pastāv EV uzņemšanā starp pozitīvo kontroli un THP-1 šūnām, kultivētām kopā ar

dainazoru - dainazors samazina SW620 N EV uzņemšanu vidēji par 78% un SW620 H EV uzņemšanu vidēji par 66%. EIPA samazina SW620 N EV uzņemšanu vidēji par 27%, hlorpromazīns – par 39%, nistatīns – par 16%, citohalazīns D – par 19%. Hipoksijas apstākļos sekretēto SW620 šūnu līnijas EV uzņemšanu THP-1 šūnās EIPA samazināja par 44%, hlorpromazīns – par 34%, nistatīns – par 36%, citohalazīns D – par 40%. Šajā gadījumā ir redzams, ka visi inhibitori ievērojami samazināja SW620 H EV uzņemšanu THP-1 šūnās.

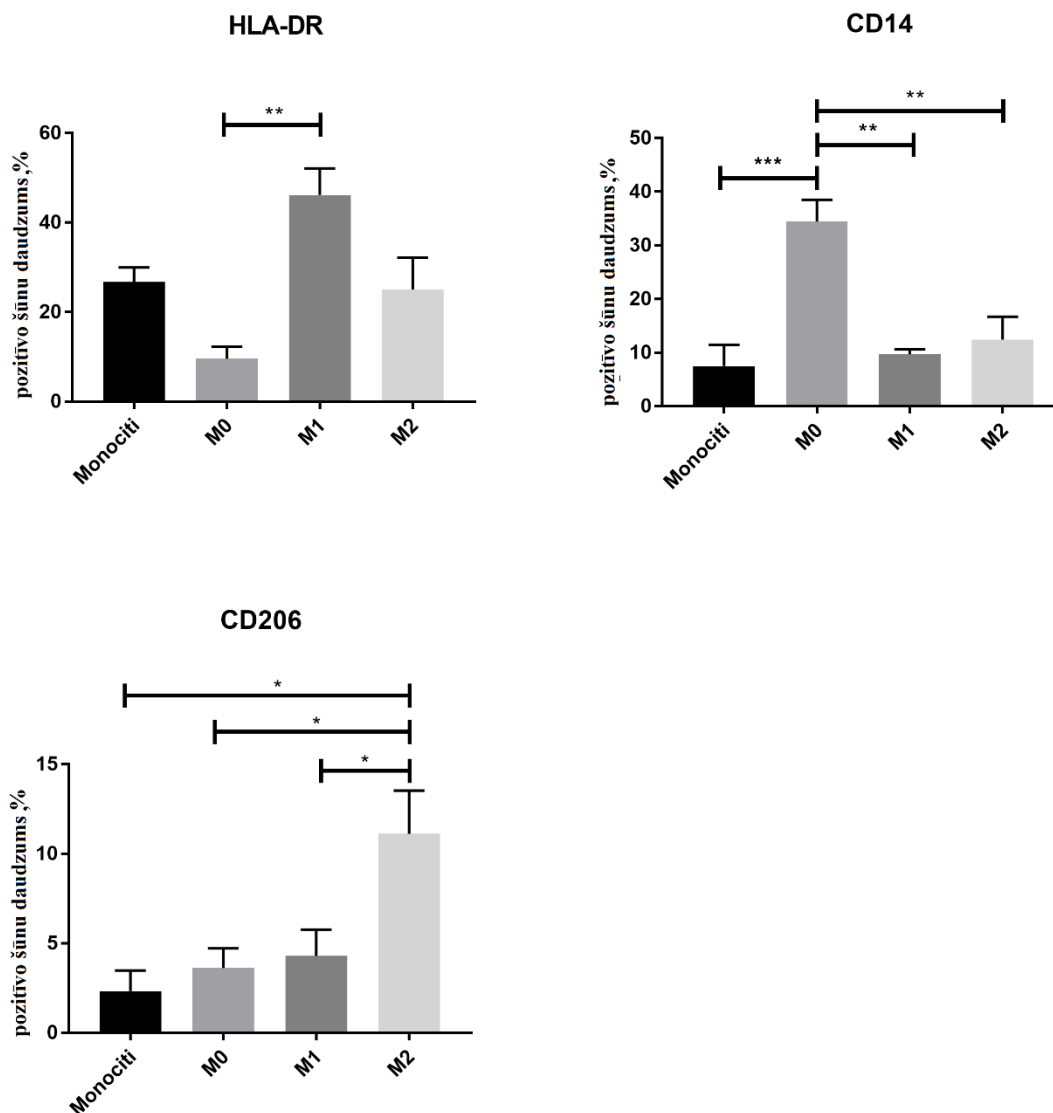
Kopumā var secināt, ka dainazors statistiski ticami samazina visu EV uzņemšanu, izņemot SW480 H EV. Dainazors inhibē dinamīna-1 un dinamīna-2 GTPāzes darbību, tādā veidā nobloķējot endocitozes veidus, kur iesaistās dinamīns. Dinamīns līdzdarbojas klatrīna un kaveolīna atkarīgajās endocitozēs. Klatrīna atkarīgo endocitozi selektīvi inhibē hlorpromazīns. Tā kā hlorpromazīna ietekmē EV uzņemšana statistiski ticami nesamazinājās, tas varētu liecināt par to, ka tomēr dainazors veiktajā pētījumā inhibē tieši kaveolīna atkarīgo endocitozi. Iegūtie rezultāti sakrīt ar Latvijas Universitātē iepriekš veiktā pētījuma rezultātiem par SW480 un SW620 sekretēto EV endocitozes ceļa noskaidrošanu THP-1 šūnās (117). Bet citā pētījumā, izmantojot inhibitorus hlorpromazīnu un dansilkadaverīnu (*dansylcadaverine*) ar plūsmas citometrijas metodi, bija konstatēts, ka no THP-1 šūnu diferencētie makrofāgi uzņem laktoferrīnu klatrīna atkarīgās endocitozes ceļā (118). Neskatoties uz to, ka laktoferrīns un EV ir pilnīgi atšķirīgas vielas, kopīgais pētījumiem ir tas, ka ir atklāta dinamīna tieša līdzdalība vielu uzņemšanā THP-1 šūnās.

Tā kā ir pierādīts, ka audzēju ekstracelulārās vezikulas spēj iedarboties uz veseliem monocītiem un sekmēt vēža attīstību, ir svarīgi uzzināt EV uzņemšanas ceļu monocītos. Noskaidrojot EV uzņemšanas ceļu, zinātnieki varētu radīt mehānismu, kā varētu inhibēt šo uzņemšanas ceļu un pasargāt monocītus no EV iedarbības. Tāpēc es uzskatu, ka ir svarīgi nākotnē veikt vairāk pētījumus, lai pārliecinātos, ka audzēju EV uzņemšana monocītos notiek pa kaveolīna atkarīgās endocitozes ceļu. To ir iespējams veikt, izmantojot citus kaveolīna atkarīgās endocitozes inhibitorus vai citā veidā nobloķējot dinamīna darbību monocītu šūnās.

### **3.3. Monocītu diferenciacija**

Tā kā iepriekš mēs pārliecinājāmies, ka THP-1 šūnās uzņem ekstracelulārās vezikulas, nākamā pētījuma mērķis ir noskaidrot audzēju EV ietekmi uz monocītu diferenciaciju. Lai būtu ar ko salīdzināt rezultātus, no sākuma ir jāveic THP-1 šūnu diferenciacija bez

ekstracelulārajām vezikulām ar nolūku izstrādāt modeli par virsmas marķieru ekspresiju dažādu apakštipu makrofāgiem. Diferencēšanas protokols tika izstrādāts, balstoties uz Genin *et al* publicētajiem datiem (119). Monocītu diferenciācijas noteikšanai izmantoja plūsmas citometrijas metodi. Pievienojot fluorescentās iezīmes (antivielas), kas saistās ar šūnu virsmas marķieriem, tika noteikts monocītu, M0, M1, M2 makrofāgu pozitīvo šūnu skaits attiecība uz CD14, CD206 un HLA-DR marķieru ekspresiju uz šūnas virsmas. Iegūtie rezultāti ir atspoguļoti 3.10. attēlā.



3.10. att. HLA-DR, CD14 un CD206 virsmas marķieru ekspresija uz monocītu, M0, M1 un M2 makrofāgu šūnu virsmas. Rezultāti ir iegūti 4 atkārtojumos. Stabiņi uzrāda vidējo vērtību  $\pm$  SEM. Apzīmējumi: \*-  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p \leq 0.001$ . Analīze tika veikta ar Anova testu (*One-way ANOVA*).

Analizējot CD14 marķiera ekspresiju uz monocītu, M0, M1 un M2 makrofāgu šūnu virsmām, rezultāti uzrāda, ka visaugstākā virsmas marķiera ekspresija ir novērota M0 makrofāgiem (vidēji 34% M0 makrofāgu šūnu ir pozitīvas uz CD14 ekspresiju). Ir statistiski ticamā atšķirība ( $p \leq 0.01$ ) starp M0 šūnu skaitu, kas ir pozitīvas uz CD14 ekspresiju, un M1 un M2 šūnu skaitu, kas uz savas virsmas ekspresē analizēto marķieri. Vēl lielāka statistiskā atšķirība ( $p \leq 0.001$ ) pastāv starp M0 un monocītu CD14 virsmas marķiera pozitīvo šūnu skaitu. Apsverot rezultātus, var pieņemt, ka paaugstināta CD14 virsmas marķiera ekspresija ir viena no M0 makrofāgu pazīmēm.

Visaugstāko ekspresiju attiecībā pret CD206 marķieri uzrādīja M2 makrofāgi – vidēji 11% no M2 makrofāgu šūnām paraugā ekspresē uz savas virsmas CD206 marķieri. Rezultātos ir novērojama statistiski ticamā atšķirība ( $p \leq 0.05$ ) starp M2 makrofāgu skaitu (%), kas ekspresē CD206 virsmas marķieri, un monocītu, M0 un M1 makrofāgu procentuālo skaitu, kuram tika konstatēts CD206 marķieris uz šūnu virsmas. Rezultāti attēlo, ka M2 makrofāgiem ir raksturīga paaugstināta CD206 virsmas marķiera ekspresija.

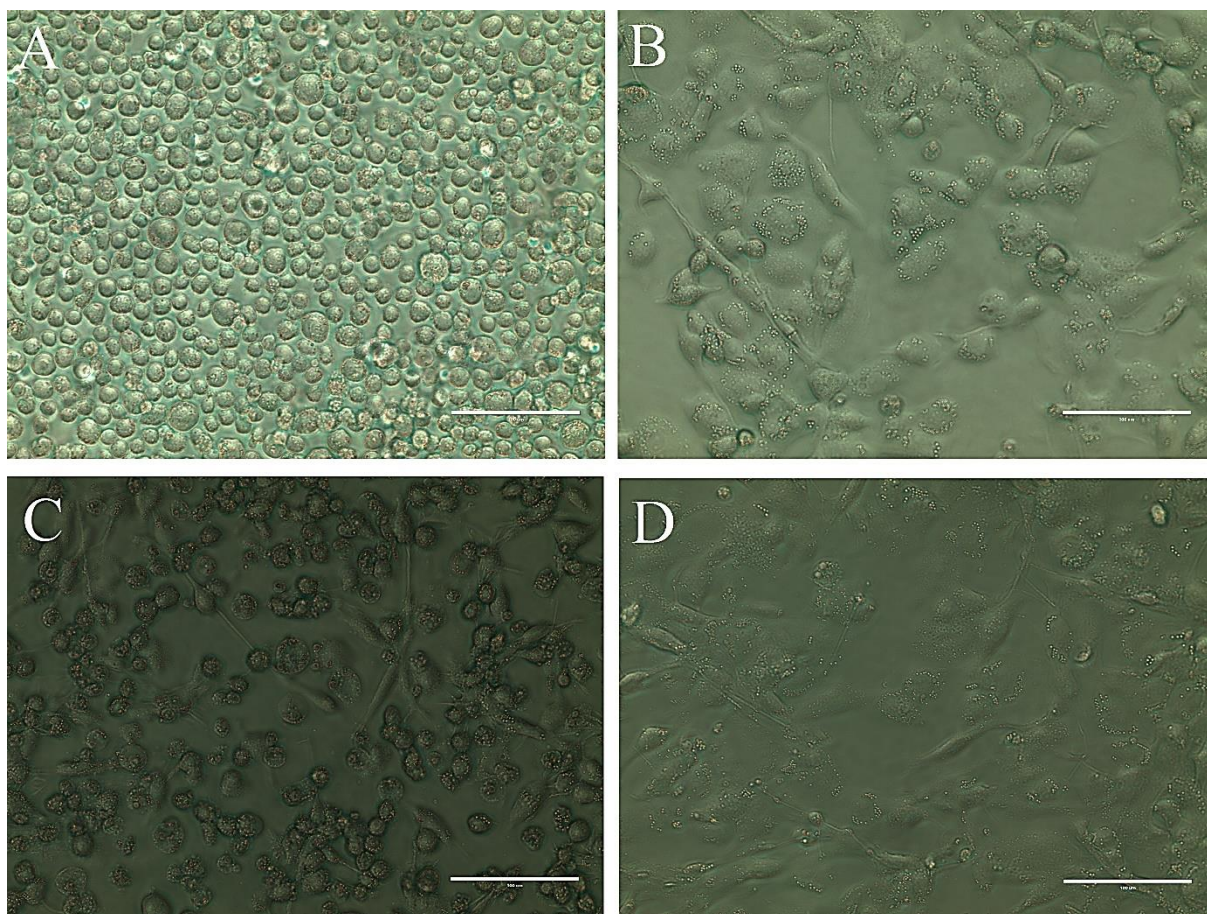
Ar lielo šūnu skaitu, kas ekspresē uz virsmas HLA-DR marķieri, atšķiras M1 makrofāgi – vidēji 46% M1 makrofāgiem uz šūnu virsmas atrodas HLA-DR marķieris. Pastāv statistiski ticamā atšķirība ( $p \leq 0.01$ ) starp M1 un M0 makrofāgu HLA-DR virsmas marķiera ekspresējošo šūnu procentuālo skaitu. Iespējams secināt, ka HLA-DR paaugstināta ekspresija ir raksturīga M1 makrofāgiem.

Iegūtie rezultāti sakrīt ar pasaules literatūrā sastopamo informāciju par marķieru ekspresiju uz makrofāgu virsmas. Ir izpētīts, ka alternatīvi aktivētajiem makrofāgiem ir raksturīga CD206 marķiera jeb mannozes receptora ekspresija uz šūnu virsmas (120). HLA-DR marķieru pētnieki izmanto M1 makrofāgu atpazīšanai audos (121). Citā pētījumā ir konstatēts, ka M0 makrofāgiem, kas ir diferencēti no THP-1 šūnu līnijas ar PMA palīdzību, ir paaugstināta CD14 marķiera ekspresija uz šūnu virsmas (122).

Veicot monocītu diferencēšanu par makrofāgiem, pētījuma gaitā tika pielietota arī mikroskopēšana ar fāžu kontrasta mikroskopa Evos XL (AMG) palīdzību ar mērķi konstatēt šūnu morfoloģiskās pārmaiņas diferenciacijas rezultātā. Iegūtās bildes ir redzamas 3.11. attēlā.

3.11. A attēlā ir saskatāmi nediferencēti monocīti no THP-1 šūnu līnijas. Monocīti ir šķīduma brīvi peldošas šūnas, kurām piemīt neregulāra, ieapaļa forma. Galvenā pazīme, kura morfoloģiski liecina par monocītu veiksmīgo diferenciaciju makrofāgos, ir pārvietošanās

spējas zaudēšana. Šūnas paliek adherentas un tām palielinās šūnu izmērs. Makrofāgu populācijai ir raksturīga lielāka šūnu morfoloģiskā heterogenitāte, salīdzinot ar monocītu šūnām. Visas diferenciācijas pazīmes ir redzamas M0 makrofāgiem 3.11. B attēlā. Neskatoties uz to, ka klasiski aktivētajiem makrofāgiem ir heterogēna šūnu populācija, 3.11. C attēlā var pamanīt, ka lielākajam M1 šūnu skaitam ir apaļa forma, kuru zinātnes literatūrā sauc par “pankūkas” vai “ceptas olas” formu. 3.11. D attēlā var saskatīt, ka M2 makrofāgiem ir vairāk izstiepta forma, salīdzinot ar M1 makrofāgiem.

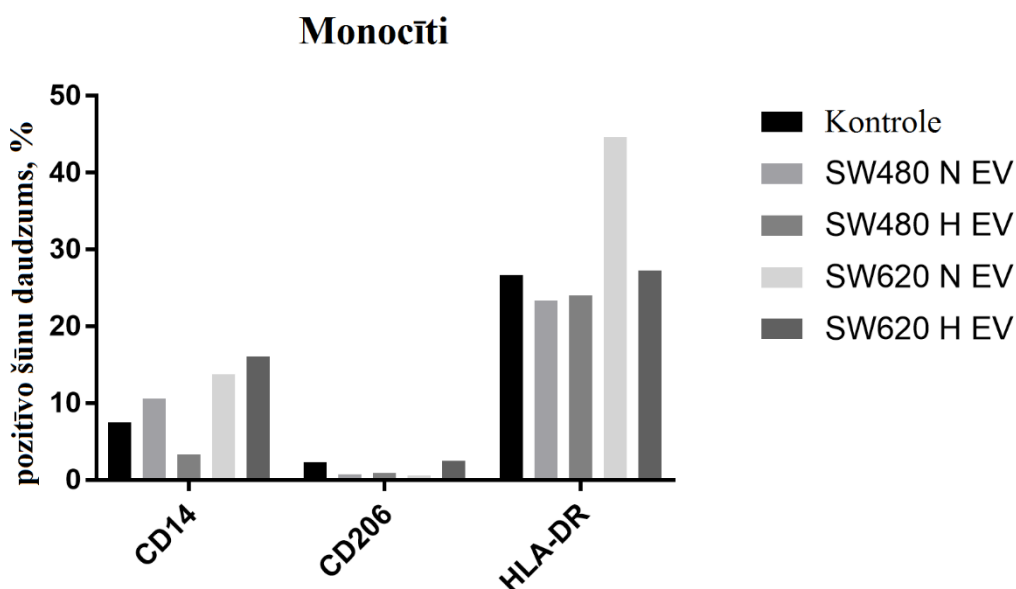


3.11. att. **Monocītu diferenciācija par makrofāgiem.** A - monocīti, B - M0 makrofāgi, C - M1 makrofāgi, D - M2 makrofāgi. Bilde uzņemta ar fāžu kontrasta mikroskopa Evos XL (AMG) palīdzību.

Fāžu kontrasta mikroskopēšanas rezultāti sakrīt ar pasaules literatūrā aprakstīto informāciju. 2013. gadā bija veikts pētījums, kur kaulu smadzeņu makrofāgus polarizēja par M1 un M2 makrofāgiem. Šūnām pievienojot LPS un IFN- $\gamma$ , makrofāgus diferencēja par M1 makrofāgiem. Fāžu kontrasta mikroskopā bija novērots, ka M1 makrofāgiem ir raksturīga ieapaļa forma. Makrofāgus polarizējot par M2 makrofāgiem, pievienojot IL-4 un IL-13, šūnu forma izstiepjās (123). 2013. gada pētījuma rezultāti pilnībā sakrīt ar mūsu pētījumā iegūtajiem rezultātiem.

### 3.4. EV ietekmes noskaidrošana uz monocītu diferenciāciju ar plūsmas citometrijas palīdzību

Veicot plūsmas citometriju, tika analizēta SW480 N, SW480 H, SW620 N, SW620 H sekretēto ekstracelulāro vezikulu ietekme uz CD14, CD206, HLA ekspresiju uz monocītu, M0, M1 un M2 makrofāgu virsmas. Katrā paraugā ir izskaitļots pozitīvo šūnu skaits (%) attiecībā uz noteikto virsmas marķiera ekspresiju uz šūnu virsmas. Dati tiek salīdzināti ar kontroles paraugiem, kuriem nebija pievienotas EV. Iegūtie rezultāti ir apkopoti 3.12., 3.13., 3.14. un 3.15. attēlos. Tā kā pētījums ar katru no EV veidiem ir veikts tikai vienu reizi, nav iespējams secināt, vai pastāv statistiski ticamas atšķirības starp paraugiem.

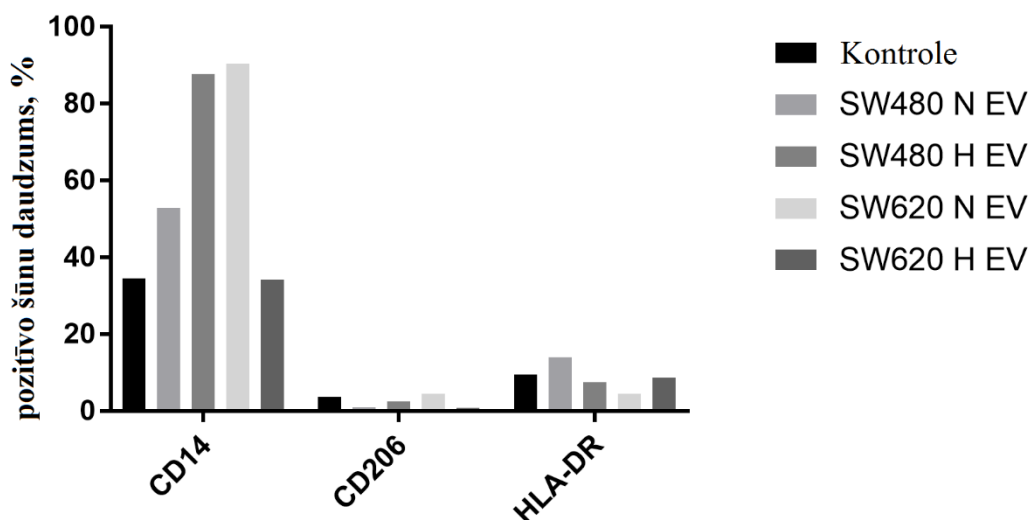


3.12.att. Četru EV veidu ietekme uz CD14, CD206, HLA-DR marķieru ekspresiju uz monocītu virsmas. Rezultāti ir iegūti vienā atkārtojumā. Analīze tika veikta ar Anova testu (*One-way ANOVA*).

Monocītu šūnām EV ietekmē paaugstinājās šūnu skaits, kas uz savas virsmas ekspresē CD14 marķieru. SW480 N EV ietekmē CD14 pozitīvo šūnu skaits pieauga par 3%, SW620 N EV ietekmē – par 6%, SW620 H EV ietekmē – par 9%. SW480 H EV samazināja CD14 pozitīvo šūnu skaitu par 4% salīdzinājumā ar kontroles paraugu. CD206 ekspresija EV ietekmē samazinājās par 1-2%, salīdzinājumā ar kontroles grupu, tikai SW620 H EV neietekmēja CD206 ekspresiju, un THP-1 šūnas, kultivētas kopā ar SW620 H EV, ekspresē CD206 līdzīgā procentuālajā attiecībā kā kontroles grupa. SW480 N un H EV samazināja HLA-DR ekspresiju par 3%. Paraugam, kur bija THP-1 šūnas kopā ar SW620 N EV, par 18%

paaugstinājās HLA-DR pozitīvo šūnu skaits. SW620 H EV būtiski neietekmēja HLA-DR ekspresiju uz monocītu virsmas. Virsmas marķieru ekspresijas izmaiņas ir atainotas 3.12. attēlā.

### M0 makrofāgi



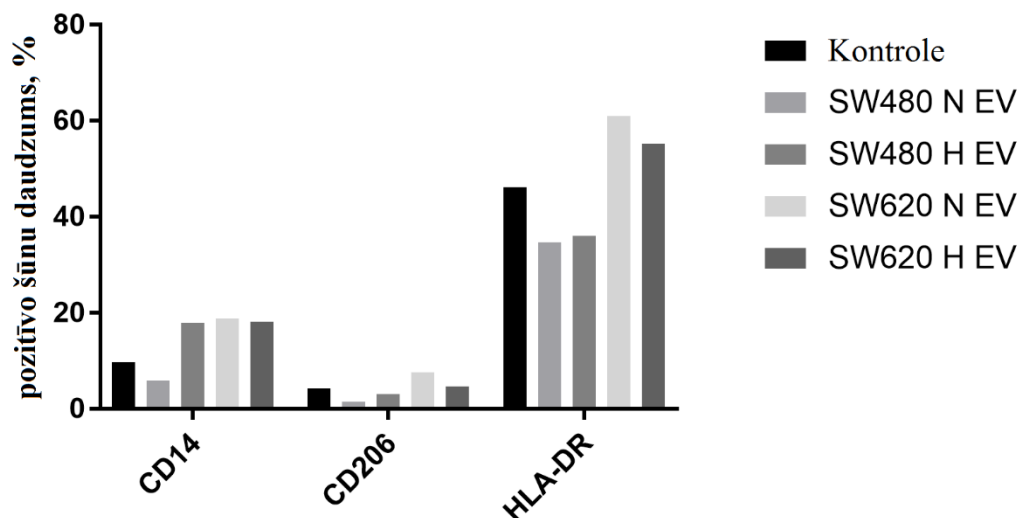
3.13.att. Četru EV veidu ietekme uz CD14, CD206, HLA-DR marķieru ekspresiju uz M0 makrofāgu virsmas. Rezultāti ir iegūti vienā atkārtojumā. Analīze tika veikta ar Anova testu (*One-way ANOVA*).

3.13. attēlā ir redzamas izmaiņas M0 virsmas marķieru ekspresijā EV ietekmē. M0 makrofāgiem, arī kā monocītiem ir ļoti izteikta CD14 ekspresijas palielināšanās uz šūnu virsmas. SW480 N EV palielināja CD14 ekspresiju par 18%, SW480 H EV – par 53%, SW620 N EV – par 56%, bet SW620 H EV neizmainīja CD14 ekspresiju uz M0 makrofāgu virsmas. SW480 N EV, SW480 H EV un SW620 H EV ietekmē CD206 marķiera ekspresija samazinājās par 1-3%, bet SW620 N EV palielināja pozitīvo CD206 šūnu skaitu par 1%. SW480 N EV palielināja HLA-DR ekspresiju par 4%, citi EV veidi samazināja HLA-DR ekspresiju: SW480 H EV samazināja par 2%, SW620 N EV – par 5%, SW620 H EV – par 1%.

3.14. attēlā ir atspoguļota EV ietekme uz M1 makrofāgu virsmas marķieru ekspresiju. Līdzīgi kā monocītiem un M0 makrofāgiem klasiski aktivētajiem makrofāgiem EV ietekmē palielinājās šūnu skaits, kas uz savas virsmas ekspresē CD14 marķieru. SW620 N EV palielināja marķiera ekspresiju par 9%, SW480 H EV un SW620 H EV - par 8%. Bet SW480 N EV samazināja CD14 ekspresiju par 4%. EV ietekmē uz CD206 un HLA-DR ekspresiju

bija atkarīga no šūnu kultūras veida, no kura bija izolētas EV. SW480 N un H EV samazināja CD206 ekspresiju: SW480 N EV samazināja par 3%, bet SW480 H EV – par 1%. SW480 N un H EV samazināja HLA-DR ekspresiju par 10-11%. SW620 N EV palielināja CD206 ekspresiju par 3%, bet SW620 H EV neizmainīja CD206 pozitīvo šūnu skaitu. SW620 N EV palielināja HLA-DR ekspresiju par 15%, bet SW620 H EV ietekmē HLA-DR pozitīvo šūnu skaits pieauga par 9%.

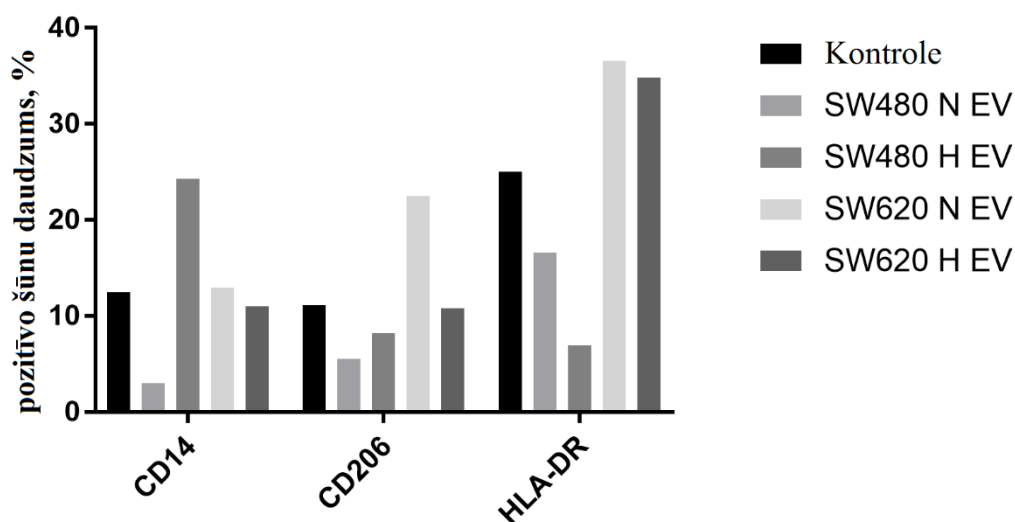
### M1 makrofāgi



3.14.att. Četru EV veidu ietekme uz CD14, CD206, HLA-DR marķieru ekspresiju uz M1 makrofāgu virsmas. Rezultāti ir iegūti vienā atkārtojumā. Analīze tika veikta ar Anova testu (*One-way ANOVA*).

3.15. attēls uzrāda, ka EV ietekme uz virsmas marķieru ekspresiju M2 makrofāgiem ir ļoti variabla un nav iespējams izdalīt vienu kopējo tendenci. Atšķirībā no iepriekšējiem 3 šūnu veidiem alternatīvi aktivētajiem makrofāgiem nav raksturīga izteikta CD14 marķiera ekspresijas paaugstināšanās EV ietekmē. CD14 marķiera ekspresiju paaugstināja par 12% SW480 H EV, bet SW620 N un H šūnu līnijas EV īpaši neietekmē CD14 ekspresiju. SW480 N EV samazina CD14 ekspresiju par 9%. SW480 N un H šūnu līniju EV samazina CD206 ekspresiju par 3-6%, SW620 H EV neizmaina CD206 ekspresiju, bet SW620 N EV paaugstina to par 11%. SW480 N EV samazina HLA-DR ekspresiju uz alternatīvi aktivēto makrofāgu virsmas par 8%, SW480 H EV samazina par 18%. Bet SW620 N un H šūnu līniju EV otrādi, paaugstina par 10-12% HLA-DR ekspresiju uz M2 makrofāgu virsmas.

## M2 makrofāgi



3.15.att. Četru EV veidu ietekme uz CD14, CD206, HLA-DR marķieru ekspresiju uz M2 makrofāgu virsmas. Rezultāti ir iegūti vienā atkārtojumā. Analīze tika veikta ar Anova testu (*One-way ANOVA*).

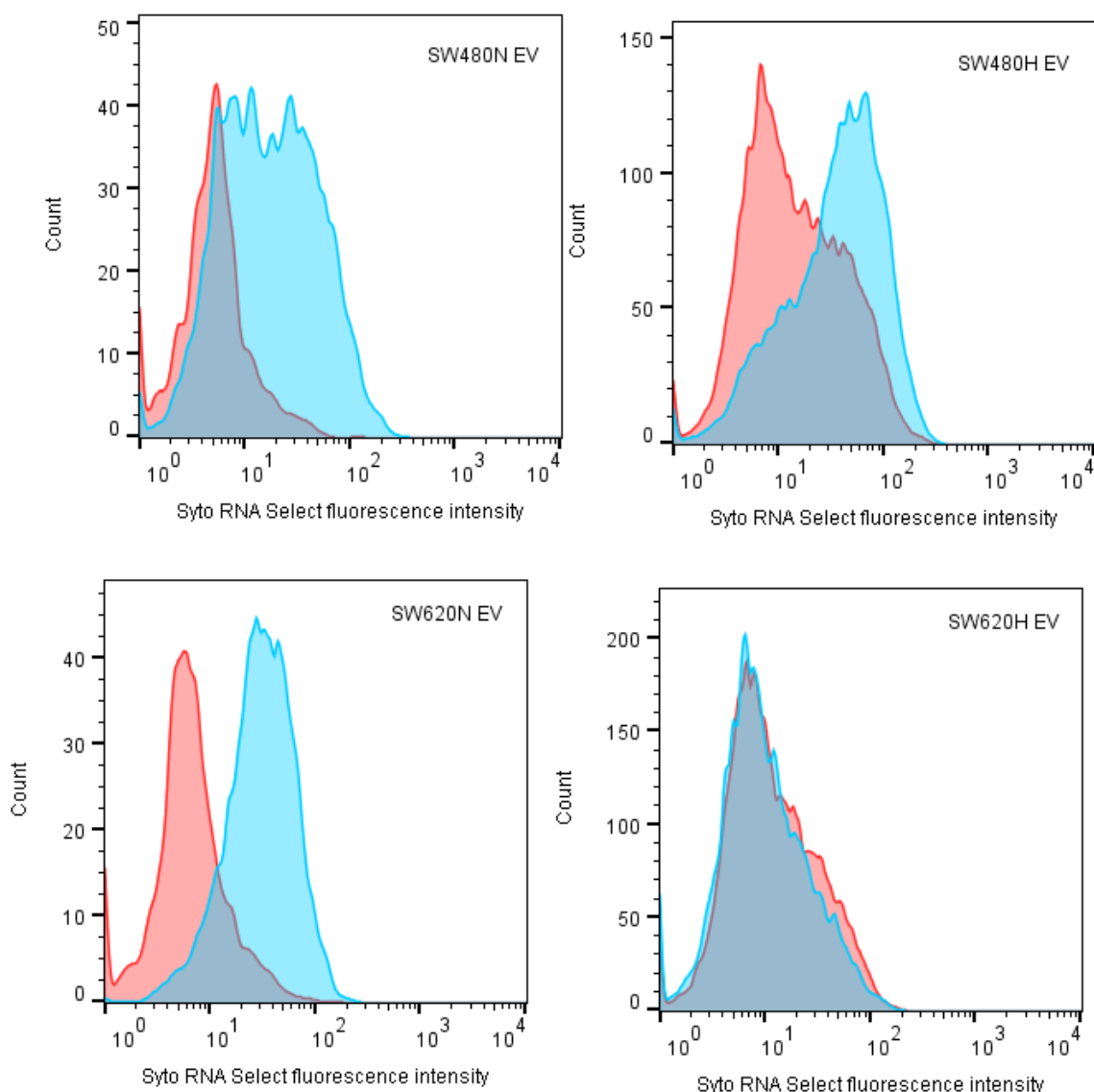
Apkopojot rezultātus par visiem šūnu veidiem, var secināt, ka EV ietekmē virsmas marķieru ekspresiju uz monocītu un makrofāgu virsmas.

EV ietekme uz CD206 ekspresiju bija ļoti variabla – monocītos un M0 makrofāgos CD206 ekspresija lielākoties samazinājās, bet M1 un M2 makrofāgos CD206 ekspresija bija atkarīga no EV šūnu līnijas veida. SW480 EV samazināja CD206 ekspresiju, bet SW620 EV vai nu neizmainīja CD206 ekspresiju, vai arī paaugstināja to.

Monocītos un M0 makrofāgos nevar izdalīt kopējo tendenci par EV ietekmi uz HLA-DR ekspresiju. M1 un M2 makrofāgos HLA-DR ekspresija bija atkarīga no EV sekretējušo šūnu veida: SW480 EV samazināja HLA-DR ekspresiju M1 un M2 makrofāgos, bet SW620 EV paaugstināja HLA-DR ekspresiju aktivētajos makrofāgos.

Neskatoties uz to, ka CD206 un HLA-DR marķieru ekspresijā bija novērojamas izmaiņas EV ietekmē, tomēr visvairāk EV iespaido CD14 ekspresiju uz monocītu, M0 un M1 makrofāgu virsmas. CD14 ekspresijas pieaugums bija izteikts – pozitīvo šūnu skaits attiecībā uz CD14 marķieri palielinājās 1,5-2,6 reizes salīdzinājumā ar kontroles grupu. Vislielākais

EV iespāids uz CD14 ekspresiju bija novērojams M0 makrofāgiem (3.13. un 3.16. attēls).



**3.16. att. M0 makrofāgu fluorescences intensitātes histogramma (attiecībā uz CD14 marķieri).**

Apzīmējumi: sarkanajā krāsā ir redzama kontroles grupas fluorescences intensitāte, zilajā krāsā – analizējamo paraugu (M0 + EV) fluorescences intensitāte.

Salīdzinot hipoksijas apstākļos sekretēto EV ietekmi un normoksijas apstākļos sekretēto EV ietekmi uz virsmas marķieru ekspresiju monocītiem un makrofāgiem, atšķirības nav konstatētas. Bet pastāv atšķirība SW480 un SW620 šūnu līniju EV ietekmē uz CD206 un HLA-DR virsmas marķieru ekspresiju uz M1 un M2 makrofāgu virsmas.

Pasaulē arī ir veikti vairāki pētījumi ar mērķi noskaidrot EV ietekmi uz monocītu diferenciāciju.

Vienā pētījuma bija konstatēts, ka EV no primārās gioblastomas palielina CD14 un HLA-DR ekspresiju uz monocītu virsmas (68). Mūsu pētījumā arī bija novērota pastiprināta CD14 ekspresija uz monocītu virsmas, bet HLA-DR ekspresija nebija izmainījusies (palielinājās tikai THP-1 šūnām, inkubētām kopā ar SW620 N EV).

Citā pētījumā aizkuņģa dziedzerā adenokarcinomas HPC-4, kolorektālās adenokarcinomas DeTa un plaušu karcinomas A549 šūnu līniju izdalītām mikrovezikulām (mikrovezikulas ir viens no EV paveidiem) ir pierādīta ietekme uz monocītiem: tiem izmainījās citokīnu sekrēcija un paaugstinājās HLA-DR marķiera ekspresija uz monocītu virsmas. CD14 ekspresijā nebija novērojamas izmaiņas (124). Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti nesakrīt ar dotajiem rezultātiem.

Vēl vienā pētījumā bija analizēta 4 kolorektālā audzēja šūnu līniju (Caco-2, LoVo, SW620 un SW480) sekretēto mikrovezikulu ietekme uz monocītu-makrofāgu diferenciāciju. Monocītus izolēja no veselīgiem Zviedrijas donoriem. Monocītu kultivēšanu veica kolorektālā audzēja mikrovezikulu klātbūtnē. Pētījuma ilgums bija 7 dienas un atkarībā no tā, kurā dienā pievienoja mikrovezikulas, izšķīr 3 monocītu grupas. Pirmajai grupai mikrovezikulas pievienoja pirmajā pētījuma dienā, otrajai grupai – pirmajā, trešajā un sestajā dienā, pēdējai grupai – tikai sestajā dienā. Rezultāti uzrāda, ka pēdējā monocītu grupā bija ievērojami paaugstināts šūnu saturs (2 reizes lielāks, salīdzinot ar kontroles grupu) ar CD14 marķiera ekspresiju uz šūnu virsmas. Pirmajā grupā bija konstatēta statistiski ticama atšķirība ( $p < 0,05$ ) šūnu skaita, kas ekspresē uz šūnu virsmas CD206 marķieri. Otrajā grupā šūnām CD206 ekspresija statistiski ticami ( $p < 0,05$ ) palielinājās tikai šūnām, kultivētām kopā ar Caco-2, LoVo un SW480 šūnu līniju sekretētām mikrovezikulām (125). Pirmās grupas rezultāti atbilst mūsu pētījumā iegūtajiem rezultātiem par CD14 palielināto ekspresiju. Izteiktas CD206 ekspresijas izmaiņas mūsu pētījumā netika novērotas.

Ir atklāts, ka lipopolisaharīdi un endotoksīni, kas saistās ar makrofāgu CD14 receptoru, sekmē kolorektālā vēža šūnu augšanu. Tas izskaidrojams ar to, ka aktivētie makrofāgi izdala TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 un IL-18. Sekretētie citokīni veicina iekaisuma procesu kolorektālajā apvidū, un hroniskais iekaisums sekmē audzēja attīstību. Tāpēc ir iespējams, ka SW480 un SW620 šūnu līniju hipoksijas un normoksijas apstākļos izdalītas EV, kas paaugstina CD14 marķiera ekspresiju uz monocītu un makrofāgu virsmas, tādā veidā veicina iekaisuma procesu apkārtējos audos un sekmē audzēja augšanu un attīstību (126).

Pētījumos iegūtie rezultāti par audzēju EV ietekmi uz monocītu un makrofāgu virsmas marķieru ekspresiju ir atšķirīgi. Iespējams, audzēju EV iedarbība ir atkarīga no šūnu kultūras,

kas sekretē EV. Dažāda ietekme var būt izskaidrojama ar dažādiem EV veidiem (eksosomas, mikrovezikulas un apoptiskie ķermenīši), kas iedarbojas uz mērķšūnām. Pētījums ar četrām kolorektālā audzēja šūnu līnijām EV pierāda, ka EV ietekmi iespaido arī EV iedarbības laiks un tas, kurā diferenciacijas dienā pievienoja EV. Tāpēc ir vērts veikt vairākus papildus pētījumus par dažādu audzēju šūnu kultūru sekretēto EV ietekmi uz monocītu diferenciaciju. Viens no galvenajiem uzdevumiem tuvākajā nākotnē, manuprāt, ir šajā pētījumā iegūto citokīnu analīze. Tas dos papildus rezultātus par SW480 EV un SW620 EV ietekmi uz monocītu diferenciaciju.

#### 4. SECINĀJUMI

1. THP-1 šūnas uzņem SW480 un SW620 šūnu līniju normoksijas un hipoksijas apstākļos sekretētās ekstracelulārās vezikulas.
2. Dainazors statistiski ticami inhibē SW480 N EV, SW620 N EV un SW620 H EV uzņemšanu THP-1 šūnās. Visticamāk, monocīti uzņem SW480 EV un SW620 EV kaveolīna atkarīgās endocitozes ceļā.
3. Paaugstinātā CD14 virsmas marķiera ekspresija ir raksturīga M0 makrofāgiem, paaugstinātā CD206 ekspresija – M2 makrofāgiem, paaugstinātā HLA-DR ekspresija – M1 makrofāgiem.
4. SW480 un SW620 šūnu līniju normoksijas un hipoksijas apstākļos sekretētās EV paaugstina CD14 virsmas marķiera ekspresiju uz monocītu, M0 un M1 makrofāgu virsmas.

## PATEICĪBAS

Vēlētos izteikt pateicību darba vadītājam Mag. Pharm. Inetai Popēnai par sniegto palīdzību bakalaura darba izstrādē. Vēlētos pateikties arī Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātei par iespēju iesaistīties pētnieciskajā projektā. Atsevišķa pateicība par atbalstu izsakāma maniem vecākiem.

Pētījums izstrādāts ar LU Akadēmiskās attīstības projekta ZD2016/AZ136 finansiālu atbalstu.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. *World Health Organization*. Cancer (Fact sheet No. 297) - [atsauce 10.04.2017].  
Pieejams: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
2. **Hajdu S.I.** Greco-Roman thought about cancer. *Cancer*. 2004;15;100(10):2048-51.
3. **Maas S.L., Breakefield X.O., Weaver A.M.** Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* 2017;27(3):172-188.
4. **Stīvs P.** *Cilvēka ķermenis*. Rīga: Zvaigzne ABC, 2009. 256 lpp.
5. **Baba A.I., Câtoi C.** *Comparative Oncology*. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
6. *National Cancer Institute*. Normal And Cancer Cells Structure - [atsauce 10.04.2017].  
Pieejams: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2512>
7. **Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Flower R.J., Henderson G.** *Rang and Dale's Pharmacology*. 7th ed., Churchill Livingstone, 2012. 792 p.
8. **Hanahan D., Weinberg R.A.** Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5): 646–674.
9. **Chial H.** Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education*. 2008;1(1):33.
10. **Garnett M.J., Marais R.** Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6(4):313–319.
11. **Bertram J.S.** The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. 2000;21(6):167-223.
12. *Slimību profilakses un kontroles centrs*. Statistikas dati par 2015. gadu. Onkoloģija. [atsauce 19.04.2017].  
Pieejams: <https://www.spkc.gov.lv/lv/statistika-un-petijumi/statistika/veselibas-aprupes-statistika1/get/nid/1>
13. **Baltiņa D.** *Organizētā vēža skrīninga pakalpojuma veikšanas principi agrīnai onkoloģisko saslimšanu diagnosticēšanai. Mācību materiāls*. Nacionālais apgāds, 2009. 28 lpp.
14. *Public Health England*. Culture Collections. Colorectal Cell Lines - [atsauce 19.04.2017].  
Pieejams: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/colorectal.jsp?d-49653-p=4>
15. **Ahmed D., Eide P.W., Eilertsen I.A., et al.** Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013;2(9):e71.
16. **Leibovitz A., Stinson J.C., McCombs W.B. 3rd, McCoy C.E., Mazur K.C., Mabry N.D.** Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res*. 1976;36(12):4562-9.

17. **Kerkar S.P., Restifo N.P.** Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2012;72(13):3125-30.
18. **De Wever O., Demetter P., Mareel M., Bracke M.** Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer.* 2008;123(10):2229-38.
19. **Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R.A.** Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-63.
20. **Shiga K., Hara M., Nagasaki T., Sato T., Takahashi H., Takeyama H.** Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers.* 2015;7(4):2443-2458.
21. **Nagasaki T., Hara M., Nakanishi H., Takahashi H., Sato M., Takeyama H.** Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour–stroma interaction. *British Journal of Cancer.* 2014;110(2):469-478.
22. **Pavlidis S, et al.** The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle.* 2009;8(23):3984-4001.
23. **Chiarugi P.** Cancer-associated fibroblasts and macrophages: Friendly conspirators for malignancy. *Oncoimmunology.* 2013;2(9):e25563.
24. **Shi C., Pamer E.G.** Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews Immunology.* 2011;11(11):762-774.
25. **Fridman W.H., Pagès F., Sautès-Fridman C., Galon J.** The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):298-306.
26. **Bronte V., Serafini P., Mazzoni A., Segal D.M., Zanovello P.** L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol.* 2003;24(6):302-6.
27. **Kusmartsev S., Nefedova Y., Yoder D., Gabrilovich D.I.** Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol.* 2004;172(2):989-99.
28. **Huang B., Pan P.Y., Li Q., Sato A.I., Levy D.E., Bromberg J., Divino C.M., Chen S.H.** Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006;66(2):1123-31.
29. **Sinha P., Clements V.K., Bunt S.K., Albelda S.M., Ostrand-Rosenberg S.** Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol.* 2007;179(2):977-83.

30. **Kusmartsev S., Gabrilovich D.I.** STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol.* 2005;174(8):4880-91.
31. **Campbell D.J., Koch M.A.** Treg cells: patrolling a dangerous neighborhood. *Nat Med.* 2011;17(8):929-30.
32. **Bates G.J., Fox S.B., Han C., Leek R.D., Garcia J.F., Harris A.L., Banham A.H.** Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006;24(34):5373-80.
33. **Fu J., Xu D., Liu Z., et al.** Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2328-39.
34. **Frey D.M., Droeser R.A., Viehl C.T., et al.** High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2010;126(11):2635-43.
35. **Fridman W.H., Pagès F., Sautès-Fridman C., Galon J.** The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):298-306.
36. **Coussens L.M., Zitvogel L., Palucka A.K.** Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet ? *Science.* 2013;339(6117):286-291.
37. **Carmeliet P.** VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005;69:4-10.
38. **Dvorak H.F.** Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1835-42.
39. **Kim Y., Lin Q., Glazer P.M., Yun Z.** Hypoxic Tumor Microenvironment and Cancer Cell Differentiation. *Current molecular medicine.* 2009;9(4):425-434.
40. **Li H., Fan X., Houghton J.** Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem.* 2007;101(4):805-15.
41. **Smith T.G., Robbins P.A., Ratcliffe P.J.** The human side of hypoxia-inducible factor. *British Journal of Haematology.* 2008;141(3):325-334.
42. **Zomer A., van Rheenen J.** Implications of Extracellular Vesicle Transfer on Cellular Heterogeneity in Cancer: What Are the Potential Clinical Ramifications? *Cancer Res.* 2016;76(8):2071-5.
43. **Pan B.T., Johnstone R.M.** Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983;33(3):967-78.
44. **Harding C., Heuser J., Stahl P.** Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol.* 1984;35(2):256-63.

45. **Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W., et al.** B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996;183(3):1161-1172.
46. **Lee H., Zhang D., Minhas J., Jin Y.** Extracellular Vesicles Facilitate the Intercellular Communications in the Pathogenesis of Lung Injury. *Cell & developmental biology*. 2016;5(2):175.
47. **Xu R., Greening D.W., Zhu H.-J., Takahashi N., Simpson R.J.** Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *The Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(4):1152-1162.
48. **Moon H.-G., Cao Y., Yang J., Lee J.H., Choi H.S., Jin Y.** Lung epithelial cell-derived extracellular vesicles activate macrophage-mediated inflammatory responses via ROCK1 pathway. *Cell Death & Disease*. 2015;6(12):e2016.
49. **EL Andaloussi S., Mäger I., Breakefield X.O., Wood M.J.** Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):347-57.
50. **French K.C., Antonyak M.A., Cerione R.A.** Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Semin Cell Dev Biol*. 2017. pii: S1084-9521(17)30003-4.
51. **Montecalvo A., Larregina A.T., Shufesky W.J., et al.** Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012;119(3):756-766.
52. **Allen L.A., Aderem A.** Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol*. 1996;8(1):36-40.
53. **Flannagan R.S., Canton J., Furuya W., Glogauer M., Grinstein S.** The phosphatidylserine receptor TIM4 utilizes integrins as coreceptors to effect phagocytosis. Gruenberg JE, ed. *Molecular Biology of the Cell*. 2014;25(9):1511-1522.
54. **Miyaniishi M., Tada K., Koike M., Uchiyama Y., Kitamura T., Nagata S.** Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*. 2007;450(7168):435-9.
55. **Lim J.P., Gleeson P.A.** Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(8):836-43.
56. **Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R.F.** Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3.
57. **Fitzner D, et al.** Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci*. 2011;124:447-58.
58. **McMahon H.T., Boucrot E.** Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(8):517-33.

59. **Escrevente C., Keller S., Altevogt P., Costa J.** Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*. 2011;11:108.
60. **Feng D., et al.** Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*. 2010;11(5):675-87.
61. **Nabi I.R., Le P.U.** Caveolae/raft-dependent endocytosis. *The Journal of Cell Biology*. 2003;161(4):673-677.
62. **Newton A.J., Kirchhausen T., Murthy V.N.** Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(47):17955-17960.
63. **Orth J.D., Krueger E.W., Cao H., McNiven M.A.** The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(1):167-172.
64. **Nanbo A., Kawanishi E., Yoshida R., Yoshiyama H.** Exosomes Derived from Epstein-Barr Virus-Infected Cells Are Internalized via Caveola-Dependent Endocytosis and Promote Phenotypic Modulation in Target Cells. *Journal of Virology*. 2013;87(18):10334-10347.
65. **Svensson K.J., Christianson H.C., Wittrup A., et al.** Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(24):17713-17724.
66. **Masereel B., Pochet L., Laeckmann D.** An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. *Eur J Med Chem*. 2003;38(6):547-54.
67. **Dutta D., Donaldson J.G.** Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cellular Logistics*. 2012;2(4):203-208.
68. **de Vrij J., Maas S.L., Kwappenberg K.M., Schnoor R.** Glioblastoma-derived extracellular vesicles modify the phenotype of monocytic cells. *Int J Cancer*. 2015;137(7):1630-42.
69. **Pucci F., Garris C., Lai C.P., et al.** SCS macrophages suppress melanoma by restricting tumor-derived vesicle–B cell interactions. *Science (New York, NY)*. 2016;352(6282):242-246.
70. **Al-Nedawi K., Meehan B., Kerbel R.S., Allison A.C., Rak J.** Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(10):3794-3799.

71. **Kucharzewska P., Christianson H.C., Welch J.E., et al.** Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(18):7312-7317.
72. **Webber J.P., Spary L.K., Sanders A.J., et al.** Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*. 2015;34(3):290-302.
73. **Wieckowski E.U., Visus C., Szajnik M., Szczepanski M.J., Storkus W.J., Whiteside T.L.** Tumor-Derived Microvesicles Promote Regulatory T Cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8+ T Lymphocytes. *Journal of immunology*. 2009;183(6):3720-3730.
74. **Costa-Silva B., Aiello N.M., Ocean A.J., et al.** Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*. 2015;17(6):816-26.
75. **Cavaillon J.M.** The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J Leukoc Biol*. 2011;90(3):413-24.
76. **Gordon S., Taylor P.R.** Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-64.
77. **Italiani P., Boraschi D.** From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:514.
78. **Van Furth R., Cohn Z.A.** The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 1968;128(3):415-435.
79. **Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K.** Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5966):656-661.
80. **Ziegler-Heitbrock L., et al.** Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.
81. **Geissmann F., Jung S., Littman D.R.** Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.
82. **Cros J., Cagnard N., Woollard K., et al.** Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity*. 2010;33(3):375-386.
83. **Wong K.L., et al.** Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5):e16-31.
84. **Tavian M., Péault B.** Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol*. 2005;49(2-3):243-50.

85. **Orkin S.H., Zon L.I.** Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132(4):631-644.
86. **Schulz C., et al.** A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. 2012;336(6077):86-90.
87. **Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M.** Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13:453-461.
88. **Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica, A.** Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23:549-555.
89. **Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M.** M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-73.
90. **Rhee I.** Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res*. 2016;39(11):1588-1596.
91. **Covarrubias A., Byles V., Horng T.** ROS sets the stage for macrophage differentiation. *Cell Res*. 2013;23:984-985.
92. **Lu J, et al.** Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2013;84(4):745-55.
93. **Nelson M.P., Christmann B.S., Dunaway C.W., Morris A., Steele C.** Experimental Pneumocystis lung infection promotes M2a alveolar macrophage-derived MMP12 production. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2012;303(5):L469-L475.
94. **Ohama H., et al.** M2b macrophage elimination and improved resistance of mice with chronic alcohol consumption to opportunistic infections. *Am J Pathol*. 2015;185(2):420-31.
95. **Cao W., Peters J.H., Nieman D., Sharma M., Watson T., Yu J.** Macrophage subtype predicts lymph node metastasis in oesophageal adenocarcinoma and promotes cancer cell invasion in vitro. *British Journal of Cancer*. 2015;113(5):738-746.
96. **Sica A., Mantovani A.** Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J. Clin. Invest*. 2012;122:787-795.
97. **Hao N.B., Lu M.H., Fan Y.H., Cao Y.L., Zhang Z.R., Yang S.M.** Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol*. 2012;2012:948098.
98. **Ruffell B., Affara N.I., Coussens L.M.** Differential Macrophage Programming in the Tumor Microenvironment. *Trends in Immunology*. 2012;33(3):119-126.

99. **Grivennikov S.I., Wang K., Mucida D., et al.** Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491(7423):254-258.
100. **Greten F.R., Karin M.** The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett.* 2004;206(2):193-9.
101. **Kong L., Zhou Y., Bu H., Lv T., Shi Y., Yang J.** Deletion of interleukin-6 in monocytes/macrophages suppresses the initiation of hepatocellular carcinoma in mice. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*. 2016;35(1):131.
102. **Komohara Y., et al.** Importance of direct macrophage-tumor cell interaction on progression of human glioma. *Cancer Sci.* 2012;103(12):2165-72.
103. **Lu T., Ramakrishnan R., Altiok S., et al.** Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(10):4015-4029.
104. **Kuang D.-M., Zhao Q., Peng C., et al.** Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(6):1327-1337.
105. **Bingle L., Brown N.J., Lewis C.E.** The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 2002;196(3):254-65.
106. **Finkernagel F., Reinartz S., Lieber S., et al.** The transcriptional signature of human ovarian carcinoma macrophages is associated with extracellular matrix reorganization. *Oncotarget*. 2016;7(46):75339-75352.
107. **Tomita T., Sakurai Y., Ishibashi S., Maru Y.** Imbalance of Clara cell-mediated homeostatic inflammation is involved in lung metastasis. *Oncogene*. 2011;30(31):3429-39.
108. **Hirano H., Tanioka K., Yokoyama S., Akiyama S., Kuratsu J.** Angiogenic effect of thymidine phosphorylase on macrophages in glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*. 2001;95(1):89-95.
109. **Leek R.D., Lewis C.E., Whitehouse R., Greenall M., Clarke J., Harris A.L.** Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56(20):4625-9.
110. **Qian B., Pollard J.W.** Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.

111. **Mazzieri R., et al.** Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell*. 2011;19(4):512-26.
112. **García S., Krausz S., Ambarus C.A., et al.** Tie2 Signaling Cooperates with TNF to Promote the Pro-Inflammatory Activation of Human Macrophages Independently of Macrophage Functional Phenotype. *PLoS One*. 2014;9(1):e82088.
113. **Auwerx J.** The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*. 1991;47(1):22-31.
114. **Wahlgren J., Karlson T.D.L, Brisslert M., et al.** Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(17):e130.
115. **Rosas L.E., Elgamal O.A., Mo X., Phelps M.A., Schmittgen T.D., Papenfuss T.L.** In vitro immunotoxicity assessment of culture-derived extracellular vesicles in human monocytes. *Journal of immunotoxicology*. 2016;13(5):652-665.
116. **Haderk F., et al.** Chronic lymphocytic leukemia-derived extracellular vesicles mediate NFκB signaling and pro-inflammatory cytokine release in monocytes. *J Immunol*. 2016;196(1):73.6.
117. **Čonka U.** Kolorektālā audzēja šūnu līniju SW480 un SW620 ekstracelulāro vezikulu endocitozes ceļa noskaidrošana monocītu šūnu līnijā THP-1: bakalaura darbs. LU Bioloģijas fakultāte. Rīga : Latvijas Universitāte, 2016. 50 lp.
118. **Florian P., Macovei A., Sima L., Nichita N., Mattsby-Baltzer I., Roseanu A.** Endocytosis and trafficking of human lactoferrin in macrophage-like human THP-1 cells. *Biochem Cell Biol*. 2012;90(3):449-55.
119. **Genin M., Clement F., Fattaccioli A., Raes M., Michiels C.** M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015;15:577.
120. **Stein M., Keshav S., Harris N., Gordon S.** Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine*. 1992;176(1):287-292.
121. **Ohri C.M., Shikotra A., Green R.H., Waller D.A., Bradding P.** Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur Respir J*. 2009;33(1):118-26.
122. **Kohro T., et al.** A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11(2):88-97.

123. **McWhorter F.Y., Wang T., Nguyen P., Chung T., Liu W.F.** Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(43):17253-17258.
124. **Baj-Krzyworzeka M., Szatanek R., Weglarczyk K., Baran J., Zembala M.** Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunol Lett*. 2007;113(2):76-82.
125. **Baj-Krzyworzeka M., Mytar B., Szatanek R., et al.** Colorectal cancer-derived microvesicles modulate differentiation of human monocytes to macrophages. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14:36.
126. **Hu Y., Yoshida K., Cologne J.B., et al.** CD14 and IL18 gene polymorphisms associated with colorectal cancer subsite risks among atomic bomb survivors. *Human Genome Variation*. 2015;2:15035.

## DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs "Audzēja ekstracelulāro vezikulu uzņemšana monocītu šūnās un ietekme uz tām" izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

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

Autors: Vera Morkovska \_\_\_\_\_  
(paraksts) (datums)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Mag. pharm. Ineta Popēna \_\_\_\_\_  
(paraksts) (datums)

Recenzents: Dr.hab.biol., prof. Ruta Muceniece \_\_\_\_\_  
(paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē \_\_\_\_\_  
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule \_\_\_\_\_  
(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas „Farmācija” Bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē \_\_\_\_\_ 2017., prot. Nr. \_\_\_\_\_.

Komisijas sekretāre: \_\_\_\_\_.

(paraksts)