

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**CILVĒKA DERMAS MEZENHIMĀLO ŠŪNU  
ILGTERMIŅA KULTŪRU RAKSTUROŠANA UN  
ILGTERMIŅA UZGLABĀŠANAS OPTIMIZĒŠANA**

Maģistra darbs

Autors: Jānis Kungs

Stud. apl. Nr.: jk06035

Darba vadītājs: Dr.biol. Jānis Ancāns

Darba konsultants: Dr.biol. Inese Čakstiņa

RĪGA 2011

## SATURS

KOPSAVILKUMS .....	4
SUMMARY .....	5
SAĪSINĀJUMI .....	6
IEVADS .....	7
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	8
1.1. Āda.....	8
1.2. Mezenhimālās cilmes šūnas.....	10
1.3. Diferenciācijas marķieri.....	11
1.3.1. Osteogēnēzes marķieri .....	12
1.3.2. Hondrogēnēzes marķieri .....	14
1.3.3. Adipogēnēzes marķieri.....	15
1.4. Šūnu novecošana un stabilitāte .....	15
1.4.1 Telomerāze .....	16
1.4.2. Apoptoze .....	16
1.5. Krioprezervācijas optimizācija .....	18
2. MATERIĀLI UN METODES.....	21
2.1. Šūnu kultūras .....	21
2.2. Dermālo šūnu izdalīšana no ādas parauga. ....	21
2.3. Šūnu pārsēšana un skaitīšana .....	21
2.4. Šūnu krioprezervācija .....	22
2.5. Kariotipa analīze .....	22
2.6. RT-PCR un laikā novērojamās PCR (qPCR) analīze .....	22
2.7. Šūnu ploīditātes noteikšana plūsmas citometrā .....	24
3. REZULTĀTI .....	25
3.1. Ādas MCŠ ģenētiskā stabilitāte ilgstošas <i>in vitro</i> pavairošanas laikā .....	25
3.2. Ādas MCŠ diferenciācijas marķieru ekspresija ilgstošas <i>in vitro</i> pavairošanas laikā ...	26
3.3. Apoptozes līmeņa izmaiņas ādas MCŠ ilgstošas <i>in vitro</i> pavairošanas laikā.....	28
3.4. Krioprezervācijas optimizācija .....	29
3.5. Publicitāte .....	31
4. DISKUSIJA .....	33
4.1. Ādas MCŠ ģenētiskā stabilitāte ilgstošas <i>in vitro</i> pavairošanas laikā .....	33
4.2. Ādas MCŠ diferenciācijas marķieru ekspresija ilgstošas <i>in vitro</i> pavairošanas laikā ...	34
4.3. Apoptozes līmeņa izmaiņas ādas MCŠ ilgstošas <i>in vitro</i> pavairošanas laikā.....	36
4.4. Krioprezervācijas optimizācija .....	37

5. SECINĀJUMI .....	39
6. PATEICĪBAS .....	40
7. LITERATŪRAS SARAKSTS .....	41

## KOPSAVILKUMS

No cilvēka ādas izdalītas mezenhimālās cilmes šūnas (MCŠ) ir multipotentas šūnas ar potenciālu pielietojumam klīniskajos pētījumos. Lai novērtētu ilgtermiņa *in vitro* pavairošanas ietekmi uz dermālo MCŠ kultūrām, tika pārbaudīta kariotipa stabilitāte, *TERT*, diferenciācijas marķieru un ar apoptozi saistītu gēnu ekspresijas izmaiņas pēc 5, 25 un 50 populācijas dalīšanās reizēm (PD). Papildus tika pilnveidota laboratorijā izmantotā ilgtermiņa krioprezervācijas metode.

Pēc PD50 šūnas saglabāja normālu kariotipu, neuzsāka *TERT* ekspresiju, bet pakāpeniski palielinājās apoptozes līmenis kultūrās. Diferenciācijas marķieru ekspresijas panelī tika novērotas ar atsevišķām MCŠ kultūrām (iegūtas no atšķirīgiem indivīdiem) saistītas variācijas. Glicerīns tika atzīts par nepiemērotu krioprotektantu ilgtermiņa krioprezervācijā.

Darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Bioanalītisko un biodozimetrisko metožu laboratorijā no 2010. gada jūnija līdz 2011. gada maijam.

Atslēgas vārdi: dermas MCŠ, ilgtermiņa šūnu kultūra, ģenētiskā stabilitāte, apoptoze, diferenciācijas marķieri, krioprezervācija

## SUMMARY

Human skin-derived mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells with a potential for applications in clinical trials. To evaluate the influence of long-term *in vitro* expansion on dermal MSC cultures, karyotype stability, *TERT*, differentiation marker and apoptosis-related gene expression changes were tested after 5, 25 and 50 population doublings (PD). In addition long-term cryopreservation method used in the laboratory was improved.

After 50 PDs cells maintained normal karyotype, did not express *TERT* gene, however apoptosis level of the cultures steadily increased. Individual MSC culture (established from different individuals) related differences were observed in differentiation marker expression panel. It was concluded that glycerol is unsuitable cryoprotectant for long-term cryopreservation.

The work was done in Laboratory of bioanalytical and biodosimetry methods, University of Latvia from july, 2010, till may, 2011

Keywords: dermis-derived MSC, long-term cell culture, genetic stability, differentiation markers, apoptosis, cryopreservation

Title: Human dermis-derived mesenchymal cell long-term culture characterization and optimization of long-term cryopreservation.

## SAĪSINĀJUMI

PD	- populācijas dalīšanās
DMSO	- dimetilsulfoksīds
MCŠ	- mezenhimālās cilmes šūnas
BGLAP	- kaulu $\gamma$ -karboksilglutamāta proteīns ( <i>bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein</i> ); pazīstams arī kā osteokalcīns
SPARC	- skābais, cisteīnbagātais sekretētais proteīns ( <i>secreted protein, acidic, cysteine-rich</i> ), pazīstams arī kā osteonektīns
RUNX2	- ar pundurismu saistītais transkripcijas faktors 2 ( <i>runt-related transcription factor 2</i> )
PPARG	- peroksisomu proliferator-aktivētais receptors $\gamma$ ( <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> ), pazīstams arī kā glitazona receptors
ADPN	- adipsīns
PLIN	- perilipīns
HAPLN1	- hialuronānu un proteoglikānu saistošais proteīns 1 ( <i>hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i> )
SOX9	- dzimumu nosakošā reģiona homeoboksa proteīns 9 ( <i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i> )
BCL-2	- B šūnu limfomas 2 proteīns, antiapoptotisks proteīns
BAX	- BCL-2 asociētais X proteīns, proapoptotisks proteīns
TERT	- Telomerāzes reversā transkriptāze
B-ACTIN	- $\beta$ -aktīns, pamatmetabolisma ( <i>housekeeping</i> ) gēns
GAPDH	- gliceraldehīda-3-fosfāta dehidrogenāze, pamatmetabolisma gēns
BAX_F	- tiešais praimeris (piemērs)
BAX_R	- apgrieztais praimeris (piemērs)

## IEVADS

Mezenhimālo šūnu *in vitro* un klīnisko pētījumu skaits pēdējos gados būtiski palielinājies. Šīs šūnas piedāvā plašu pētījumu spektru gan fundamentālās zinātnes attīstībā, gan klīniskajos pētījumos akūtu un hronisku slimību ārstēšanai.

Āda ir viegli pieejams mezenhimālo cilmes šūnu avots. Ādas virskārtas audu materiāls ir relatīvi vienkārši iegūstams, turklāt no ādas izdalītās šūnas iespējams ilgstoši kultivēt un pavairot *in vitro*. Tomēr vairums fundamentālo pētījumu balstās uz īslaicīgu šūnu kultūru izmantošanu; arī klīniskajos pētījumos pamatā tiek pielietotas šūnas, kas pavairotas ne vairāk kā 20 reizes. Šādas rīcības iemesls ir maz izpētītie procesi, kas notiek ar šūnu kultūrām ilgtermiņā, kā arī varbūtība, ka ilgstošas kaulu smadzeņu un taukaidu mezenhimālo šūnu kultūrās uzkrājas hromosomu aberācijas un tās transformējas par audzēju šūnām. Cilvēka somatiskās cilmes šūnas *in vitro* kultūrā spējīgas dalīties 50 un vairāk reizes līdz sāk novecot vai diferencējas par specializētām šūnām. Ilgtermiņa kultūras var izmantot par modeļobjektiem, piemēram, infekciju un jaunu zāļu formu pētījumos, kur būtiski novērot izmaiņas metabolismā vai šūnas funkcijās ilgākā laikā. Tomēr pirms tam ir labi jāapzinās, kādi procesi notiek šūnās ilgstoši atrodoties *in vitro* – jānovērtē šūnu ģenētiskā un funkcionālā stabilitāte. Tāpat vēlams izveidot metožu kopu, kas pietiekami izsmeljoši raksturotu mezenhimālās šūnas atkarībā no iespējamā tālākā pielietojuma.

Ilgtermiņā strādājot ar šūnu kultūrām nepieciešamas arī atbilstošas paraugu uzglabāšanas metodes. Strādājot ar ādas mezenhimālajām šūnām uzglabāšanas pamatmetode ir krioprezervācija, kuras laikā šūnu suspensijas tiek iesaldētas ultrazemās temperatūrās. Krioprezervācijā dažādas nianšes (piemēram, saldēšanas šķīduma izvēle, šūnu skaits tilpuma vienībā u.c.) variē starp laboratorijām un reizēm arī viena pētījuma ietvaros. Eiropas un pasaules vadošās institūcijas piedāvā dažādus krioprezervācijas protokolus. Krioprezervācijas faktorus nepieciešams pilnveidot arī tāpēc, ka tiek izmantotas aizvien jaunu audu izcelsmes MCŠ kultūras..

Maģistra darba mērķis bija novērtēt ilgstošas *in vitro* pavairošanas ietekmi uz ādas mezenhimālo šūnu stabilitāti un pilnveidot laboratorijā izmantotās krioprezervācijas metodes. Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši uzdevumi:

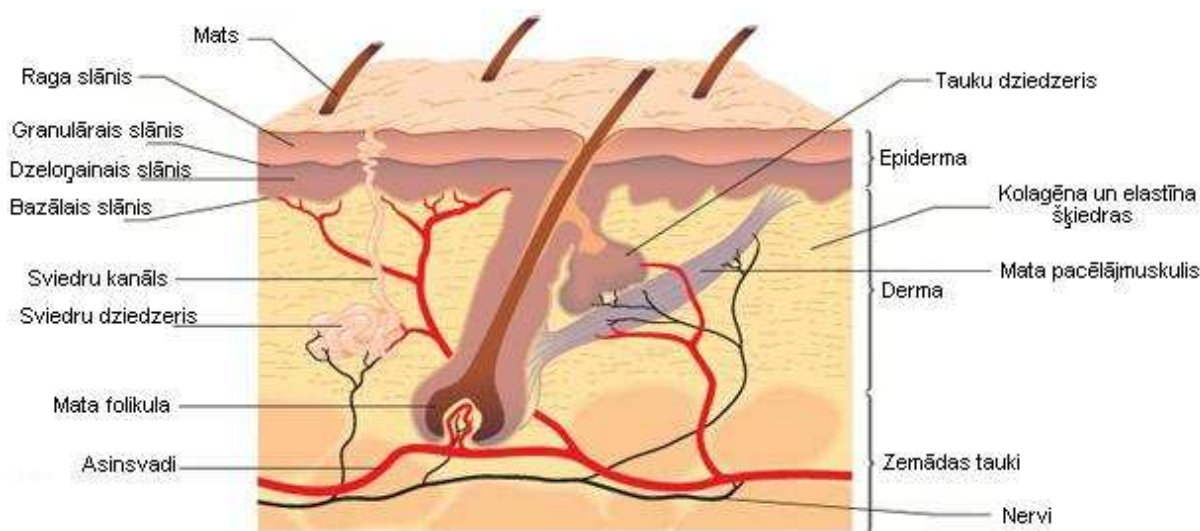
1. Novērtēt dermālo šūnu ģenētisko stabilitāti ilgstošas *in vitro* pavairošanas laikā;
2. Novērtēt gēnu ekspresijas izmaiņas ilgstošas *in vitro* pavairošanas laikā;
3. Optimizēt dermālo šūnu krioprezervāciju.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Āda

Āda ir cilvēka lielākais orgāns, kas nepārtraukti pakļauts atjaunošanās procesiem. Ādā sastopamas gan mezodermālas, gan ektodermālas izcelsmes šūnas (*Tsatmali et al. 2002 cit pēc Riekstina et al. 2008*). Tās primārā funkcija ir barjeras veidošana pret mikroorganismiem, mehāniskiem bojājumiem un sausumu (*Fawcett 1993 cit. pēc Vardaxis et al. 1997*), bet jau vairāk kā desmit gadus āda saista zinātnieku interesi kā cilmes šūnu avots. Ādā sastopami vairāki šūnu tipi, kam raksturīgas cilmes šūnu īpašības, piemēram, mata sīpola šūnas, folikula un dermas priekštečšūnas (*Blanpain and Fuchs 2006, Watt et al. 2006*). Šo šūnu piederību cilmes šūnām raksturo spēja diferencēties hondrocītu, adipocītu, miocītu un osteoblastu līnijās, kā arī mezenhīmas šūnām raksturīgie virsmas marķieri CD73, CD90 un CD105 (*Lorenz et al. 2008, Riekstina et al. 2008*). Ādas biopsijas ir vieglāk veicamas un neprasa tik invazīvas metodes, kā, piemēram, kaulu smadzeņu aspirāta iegūšana, turklāt ādai piemīt ļoti labas reģenerācijas spējas, tādēļ ādas šūnas ir kļuvušas par daudzu potenciālu terapiju modeļobjektu (*Toma et al. 2005, Hoogduijn et al. 2006*).

Ādu veido trīs kārtas: epiderma, saistaudu veidotā derma un zemādas tauku slānis (*Yu et al. 2008*). Epiderma ir veidojusies no ektodermas, kamēr dermu un zemādas slāni pamatā veido mezenhimālas izcelsmes šūnas. Epiderma galvenokārt nodrošina aizsargfunkciju un pigmentāciju, bet derma, kas ir aptuveni 10 – 13 reizes biezāka (*Rose et al. 1977 cit. pēc Vardaxis et al. 1997*), ietver asinsvadus, limfvadus un nervus, tostarp arī sāpju un termoreceptorus. Tur atrodas arī matu saknes, matu pacēlājmuskuļi, sviedru un tauku dziedzeri (1.att.). Starp šiem abiem slāņiem atrodas bazālā membrāna, kuru ķīmiski veido IV tipa kolagēns, glikoproteīni, piemēram, laminīns, entaktīns un heparāns, un proteoglikāni (perlekāns) (*Hasegawa et al. 2007*).



Ar izmaiņām no [http://www.in-vivo-health.co.uk/skin\\_structure.jpg](http://www.in-vivo-health.co.uk/skin_structure.jpg)

1.attēls. Cilvēka ādas struktūra.

Figure 1. Human skin structure.

Cilvēka epidermas biezums ir 50-120  $\mu\text{m}$  (Meyer *et al.* 1978) un tā sastāv no keratinocītiem, melanocītiem, Merkela šūnām un Langerhana šūnām. Keratinocīti sastāda aptuveni 90-95% no visas epidermas. Bazālajā membrānā atrodas keratinocītu cilmes šūnas (Toulza *et al.* 2007). Veidojoties jaunam keratinocītam, šūna tiek stumta augšup cauri pieciem epidermas slāņiem (bazālo, dzeloņaino, graudaino, spīdošo un ragslāni), kur tā iziet pakāpenisku diferenciaciju. Pamazām virzoties uz virspusi, šūnas tiek saplacinātas, zaudē kodolus un keratinizējas (keratīns sastāda līdz pat 85% no visa pārragotā keratinocīta (korneocīta) olbaltumvielu). Ar laiku korneocīti atmirst un veido blīvu epitēlija slāni ādas virskārtā, kas kalpo par efektīvu barjeru pret vides kaitējumu, ķīmiskiem bojājumiem vai bakteriālu infekciju (Presland and Jurevic 2002), bet tā nav vienīgā keratinocītu funkcija. Kā savā apskatrakstā norāda Martin (Martin 1997), brūču rašanās gadījumā norit pastiprināta keratinocītu veidošanās un virzīšanās uz ievainojuma vietu, kur tie apņem rētaudus, atjauno barjeru un pēc tam uzsākas ādas dzīšana.

Melanocīti ādā atbild par pigmentāciju un krāsojumu un epidermā ir lokalizēti tuvu bazālajai membrānai. Langerhana un Merkela šūnas attiecīgi nodrošina specifisko imunitāti pret mikroorganismu antigēniem (Kaplan *et al.* 2007) un piedalās taustes sajūtas veidošanā (Halata *et al.* 2002).

Bazālā membrāna notur epitēliju pie brīvajiem saistaudiem zem tā. Šo noenkurošanos nodrošina šūnu adhēzijas molekulas. Bazālā membrāna ietekmē tādus šūnu procesus, kā savstarpējo šūnu adhēziju, dalīšanos, migrāciju un diferenciaciju (Hasegawa *et al.* 2007). Papildus šis slānis kalpo arī kā selektīva membrāna starp kontaktējošiem audiem. Bazālā membrāna sastāv no bazālās plātnītes, ko izstrādā epiteliocīti, un retikulārās plātnītes, kuru veido fibroblasti (Hasegawa *et al.* 2007).

Dermu jeb īsto ādu veido fibroblasti un daudz citu šūnu, kas ir krietni mazāk pārstāvētas, – makrofāgi, melanocīti, Langerhana šūnas u.c. (*Yu et al. 2008*). Makrofāgi ir šūnas, kas rodas no specifiskām baltajām asins šūnām monocītiem. Gan monocīti, gan makrofāgi darbojas kā fagocīti un nodrošina organisma specifisko un nespecifisko imunitāti. Tomēr visizplatītākais šūnu tips dermā, kā arī citos dzīvnieku saistaudos, ir fibroblasti. Šīs šūnas sintezē un uztur daudzu audu strukturālo rāmi jeb stromu. Fibroblasti arīdžan piedalās brūču dziedēšanā, jo pateicoties serumā

esošajiem augšanas faktoriem spēj vairoties un diferencēties par audiem, ar kuriem aizstāt bojātos. Piemēram, vaļēju brūču vietās, veidojoties sarecējumam, fibroblasti ir tie, kas veido granulārus savienojumus starp recējumu vietām (*Martin 1997*).

Derma iedalās kārpiņu un tīklainajā slānī. Izteiktas robežas starp tiem nav, tomēr ir atšķirības starp šķiedru kūlīšu biezumu. Kārpiņu slāņa šķiedru kūlīši, ko veido III tipa kolagēns, ir plānāki, jo šajā slānī sastopamas vairāk šūnu un pamatvielas. Šādas kārpiņu slāņa īpašības nodrošina sekmīgāku šūnu difūziju un migrāšanu. Tīklaino slāni veido blīvi, neregulāri saistaudi, kur pārsvarā ir kolagēns I, kas piešķir ādai labu mehānisko izturību (*Yu et al. 2008*).

Zemādas tauku slānī dominējošās šūnas ir adipocīti, ko dēvē arī par tauku šūnām. Tās ir specializējušās enerģijas uzkrāšanā tauku formā. Uzturā uzņemtie tauki tiek noārdīti par glicerīnu un taukskābēm, tad tos nogādā līdz adipocītiem, kas nodrošina to uzkrāšanu triglicerīdu formā. Triglicerīdi var tikt izmantoti enerģijas iegūšanai. Adipocīti attīstās no mezenhimālajām cilmes šūnām un veido taukaudus (*Tan et al. 2004*).

## 1.2. Mezenhimālās cilmes šūnas

Gandrīz ikvienā cilvēka ķermeņa orgānā sastopams lielāks vai mazāks cilmes šūnu daudzums (*Morasso and Tomic-Canic 2005*). Cilmes šūnas var iedalīt pēc piederības konkrētiem orgāniem (piemēram, nervaudu vai aknu cilmes šūnas) vai arī lielākās grupās atkarībā no šūnu izcelsmes, piemēram, mezenhimālās cilmes šūnas (MCŠ). MCŠ var izdalīt no ādas, kaulu smadzenēm, nabassaites šūnām, nabassaites asinīm, taukaudiem, skeleta muskuļiem, piena zobu pulpas un citiem audiem. Ne visi šie audi ir mezenhimālas izcelsmes, tāpēc pēdējos gados zinātnieku vidū izskanējis ierosinājums plaši izmantotajā saīsinājumā MCŠ vārdu „mezenhimālas” aizstāt ar „multipotentas”, taču oficiāli tas vēl nav apstiprināts.

MCŠ ir spējīgas diferencēties osteoblastos (*Mackie 2003, Karsenty 2003*), adipocītos (*Jones et al. 2005*) un hondrocītos (*Arthur et al. 2011*), bet dažādos apstākļos tās iespējams

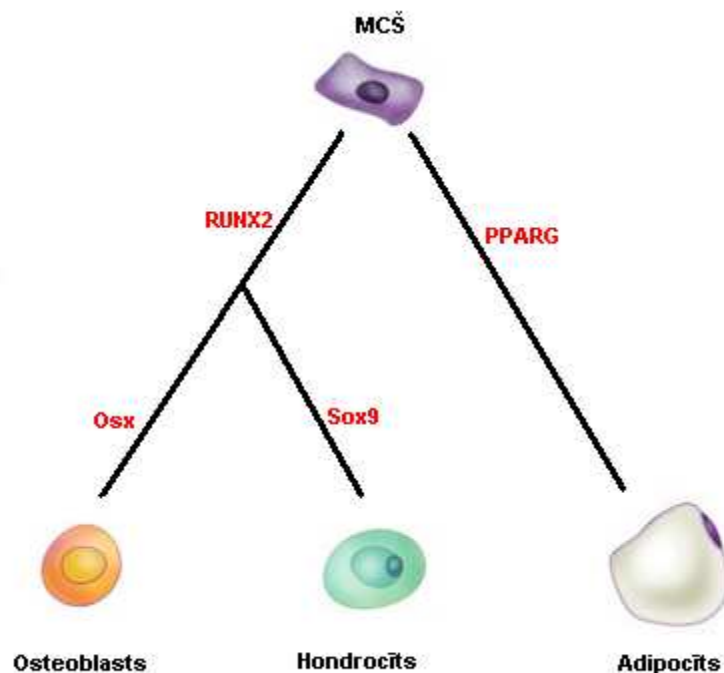
diferencēt arī citos tipos, piemēram, kardiomiocītos (Ge et al. 2009) un nervu šūnās (Kim et al. 2006).

Cilvēka MCS tiek paredzēts milzu potenciāls nākotnes šūnu terapijās pateicoties spējai pašatjaunojoši dalīties un spējai diferencēties dažādu līniju šūnās (Takeuchi et al. 2007). Pastāv vairāki kritēriji, lai šūnas pieskaitītu MCS: uz to virsmas jābūt ekspresētiem CD73, CD90 un CD105 marķieriem, tām jāveido adherents monoslānis kultūrā un jāspēj diferencēties mezenhīmālās līnijas šūnās (adipocītos, osteoblastos un hondrocītos) (Dominici et al. 2006).

Tomēr ilgstoša *in vitro* šūnu kultivēšanas laikā joprojām rodas šķēršļi šūnu terapiju klīniskam pielietojumam, piemēram, ierobežots dzīves ilgums un genomiska un funkcionāla nestabilitāte. MCS potenciālie klīniskie pielietojumi ir radījuši lielu interesi sabiedrībā – pēc mājas lapas [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) datiem, šobrīd pasaulē tiek veikti 1694 klīniskie pētījumi, kuros izmanto MCS. Tāpēc ir būtiski pareizi izvērtēt to efektivitāti un drošību ilgstoši kultivējot *in vitro* kultūrās (Guan et al. 2010). MCS izvirzītās prasības ir ļoti nespecifiskas un vāji definē šūnas, kā iespējamo medicīnas produktu. Ņemot vērā augstos standartus un prasības zāļu ieviešanai praksē, cilmes šūnas, kuras pēc būtības ir ļoti heterogēnas un ievērojami atšķiras starp donoriem un arī dzīves cikla fāzēs, diez vai varēs tikt apstiprinātas kā oficiāls medicīniskais produkts. Tādēļ Eiropas Medicīnas aģentūras attīstīto terapiju komiteja (Committee for Advanced Therapies – CAT) savā 2010.gada publikācijā rosina veidot izsmeļošus marķieru paneļus, kas varētu sniegt pēc iespējas detalizētāku priekšstatu par šūnu vai audu iespējamām reakcijām, bet konkrētus pētījumus veikt saskaņojot atbilstoši katras valsts likumdošanai.

### 1.3. Diferenciācijas marķieri

Viena no cilmes šūnas raksturojošām īpašībām ir spēja diferencēties jeb pārveidoties par specializētiem šūnu tipiem. Cilmes šūnu pāreja no nediferencētām MCS par diferencētiem šūnu tipiem notiek aktivējot vai apslāpējot noteiktus signālceļus. Šie signālceļi var būt specifiski vienam šūnu tipam, šūnu grupai, vai arī būtiski kopējam diferenciācijas procesam (Ng et al. 2008). MCS jebkādā vecumā jāspēj diferencēties par osteohondrālās un taukaudu līnijas šūnām (2.att.). Katram no šiem šūnu tipiem ir savi raksturīgie marķieri, kuru kombinācijas bieži vien ļauj pietiekami specifiski raksturot šūnas.



Ar izmaiņām no Ng *et al.* 2008.

2.attēls. Vienkāršota MCŠ diferenciācijas shēma. Ar melnu apzīmēti šūnu tipi, ar sarkanu transkripcijas faktori.

Figure 2. Simplified schematic drawing of MSC differentiation. Cell types are marked black, transcription factors are marked red.

### 1.3.1. Osteoģenēzes marķieri

Pilnvērtīgām cilvēka skeleta funkcijām nepieciešams, lai kauls būtu ciets, nedaudz lokans un viegls, tādēļ to strukturāli veido ciešs šūnu un ārpusšūnu matricas komplekss. Ārpusšūnu matricā lielos daudzumos tiek uzkrāts kalcija hidroksiapatīts, kas piešķir kaulam stingrību un spēku. Kaulā sastopami trīs šūnu tipi – kaulu veidojošie osteoblasti, noārdošie osteoklasti un osteocīti, kas ir pašu sekretētā matricā ieslēgti osteoblasti. Osteoblastu un osteoklastu funkcijas un regulācija ir cieši saistītas, lai nodrošinātu pareizu kaulu veidošanos (Ducy *et al.* 2000). Osteoblasti veic osifikāciju jeb kaulu veidošanu iekļājot jauno kaula materiālu mezenhīmas saistaudos vai skrimslī (Caetano-Lopes *et al.* 2007), savukārt kaula noārdīšana jeb rezorbcija notiek gandrīz četras reizes ātrāk kā osifikācija, tāpēc osteoblasti bez kaulu veidošanas piedalās arī osteoklastu veiktās rezorbcijas regulācijā (Harada and Rodan 2003)

Osteoģenēze ir process, kurā no mezenhīmas izcelsmes cilmes šūnām veidojas osteoblasti (Mackie 2003, Karsenty 2003). Šajā diferenciācijā un vēlāk arī osteoblastu uzturēšanā iesaistīti simtiem gēnu un ne visi procesi osteoģenēzē ir pietiekami izpētīti un saprasti, tomēr vadošie gēni ir diezgan plaši aprakstīti. MCŠ diferenciācijā par osteoblastiem ļoti būtiska ir trīs transkripcijas faktoru klātbūtne – RUNX2, Osterix (Osx) un ATF4 (Stains

and Civitelli 2003, Gronthos et al. 2003, Krane 2005, Franceschi et al. 2009). Franceschi uzsver, ka bez šiem gēniem normāla kaulu attīstība nav iespējama. Šo gēnu efektu vēlreiz uzsver arī Lee un kolēģu (Lee et al. 2011) eksperiments, kurā ar elektroporāciju ienesot taukaidu cilmes šūnās *RUNX2* un *Osx* gēnus panāca šūnu osteoģenēzi, kas specializētu audu cilmes šūnās nenotiek vienkārši.

*RUNX2* (vecākos avotos arī *CBFA1* – *core binding factor alpha 1*) jeb ar pundurismu saistītais transkripcijas faktors 2 (*runt-related transcription factor 2*) ir būtiskākais osteoblastu diferenciācijas gēns (Ghali et al. 2010). Gēna kodētais proteīns pieder *RUNX* transkripcijas faktoru saimei, jo satur *Runt* DNS-saistošo domēnu, tāpēc darbojas kā režģis (*scaffold*) nukleīnskābēm un regulatoriem elementiem, kas iesaistīti osteoblastu diferenciācijā. *RUNX2* proteīns pārveido MCŠ par osteoģenajām priekštečšūnām, tieši iedarbojoties uz vairākiem būtiskiem gēniem kaulu un skrimšļa attīstībā, piemēram, cilvēka estrogēna receptoru  $\alpha$  (Lambertini et al. 2007), osteokalcīnu (Makita et al. 2008) un jau pieminēto transkripcijas faktoru osterix (*Osx*) (Nishio et al. 2006).

Osterix, pazīstams arī kā transkripcijas faktors SP7, ir ekspresēts visos kaulos, kas attīstās. Šī gēna izslēgšana (*knock-out*) pelēs izraisa kaulu mineralizācijas trūkumu (Nakashima et al. 2002). *Osx* ekspresija noved pie terminālas osteoblastu diferenciācijas, kurpretim *RUNX2* aizsāk osteo-hondrodiferenciāciju, kas var rezultēties gan ar osteoblastu, gan skrimšļa veidošanu (Lee et al. 2003). *RUNX2* gēna izslēgšana pelēs noved pie *Osx* ekspresijas apturēšanu, tātad *Osx* ir pakļauts *RUNX2* regulācijai. Eksperimentos ir demonstrēta šo gēnu ekspresijas korelācija (Nakashima et al. 2002, Lee et al. 2003, Nishio et al. 2006), tomēr, kā tieši notiek šī mijiedarbība, pagaidām nav pierādīts.

ATF4 (aktivējošais transkripcijas faktors 4) sākotnēji tika atklāts kā cikliskā adenozinmonofosfāta (cAMP) atbildes elementu saistošais proteīns 2 (CREB2), un tikai vēlāk tika atklāta tā nozīme osteoģenēzē, kur ATF4 aktivizējas vēlīnajos kaula attīstības posmos, piedaloties matricas mineralizēšanas regulācijā (Franceschi et al. 2009, Matsuguchi et al. 2009). ATF4 ir būtisks osteoģenēzē (Franceschi et al. 2009), tomēr tas ir saistīts arī ar citiem organisma procesiem, tādēļ nevar tikt uzskatīts par vienozīmīgu osteoģenēzes marķieri.

Bez transkripcijas faktoriem ir arī citi ar kaulu veidošanos saistīti gēni. Osteokalcīns jeb kaulu  $\gamma$ -karboksigliutamāta (gla) proteīns, kuru kodē *BGLAP* gēns, ir proteīns, kas sastopams kaulos un zobos (Makita et al. 2008). Osteokalcīnu sekretē tikai osteoblasti un tas primāri atbild par kalcija jonu homeostāzi un kaulu mielinizāciju, bet jaunākie pētījumi apraksta arī osteokalcīna endokrīno lomu – tas stimulē pastiprinātu insulīna atbrīvošanu no aizkuņģa dziedzera  $\beta$ -saliņām un adiponektīna sekrēciju no taukšūnām, kas palielina šūnu jutību pret insulīnu (Lee et al. 2007). Pelēs osteokalcīna injekcijas uzlabo glikozes metabolismu un

novērš diabēta attīstību (*Ferron et al. 2011*) un varētu būt iesaistīts vīriešu fertilitātes saglabāšanā, jo atrasti pierādījumi, ka osteokalcīns pastiprina testosterona sintēzi (*Oury et al. 2011*).

SPARC (*secreted protein, acidic and rich in cysteine*), pazīstams arī kā osteonektīns ir kalciju un nātriju saistošs glikoproteīns (*Yan and Sage 1999 cit. pēc Rotllant et al. 2008*). Osteonektīns ir multifunkcionāls proteīns ar augstu afinitāti pret katjoniem un hidroksiapatītu, kas nodrošina labu saķeri ar ārpusšūnas matricu un ļauj sadarboties ar plaša spektra augšanas faktoriem (*Brekkan and Sage 2001*). Gan osteokalcīns, gan osteonektīns var tikt izmantoti kā osteogēni raksturojoši marķieri, jo to ekspresija novērojama tikai diferencētos osteoblastos un osteocītos.

### 1.3.2. Hondroģenēzes marķieri

Hondroģenēzes laikā no mezenhīmas cilmes šūnām veidojas skrimslis. Šis daudzpakāpju process sākas ar MCŠ proliferāciju, tad turpinās ar kondensāciju un pārtapšanu par nenobriedušiem hondrocītiem, kuri pārveidojas prehipertrofētos hondrocītos un visbeidzot diferencējas hipertrofētos hondrocītos (*Provot and Schipani 2005*). Agrīnās hondroģenēzes laikā aktīvi sintezējas ārpusšūnu matricas proteīni, sevišķi II un XI tipa kolagēns un agrekāns, bet vēlākajos skrimšļa veidošanās posmos vairāk sāk sintezēties X tipa kolagēns. Hondroģenēze var uzsākties, ja MCŠ sākušas ekspresēt *RUNX2*, proti kļuvušas par osteogēnām priekštečšūnām (*Eames et al. 2004, Yamashita et al. 2009*).

Transkripcijas faktors Sox9 aktivizē gēnus, kas saistīti ar skrimšļa fenotipu – agrekānu un II tipa kolagēnu (*Sekiya et al. 2000, Eames et al. 2004*). Sox9 ietekmē strauji samazinās *RUNX2* ekspresija un uzsākas agrīnā hondroģenēze. Tas rezultātējas ar osteogēno prekursoršūnu pārveidošanos par hondrocītiem, tāpēc Sox9 uzskatāms par būtiskāko hondroģenēzes iniciatoru (*Tsuchiya et al. 2003, Eames et al. 2004, Yamashita et al. 2009*).

HAPLN1 (hialuronāna un proteoglikānu saistošais proteīns 1), pazīstams arī ar vienkāršāku nosaukumu skrimšļa saistošais proteīns 1 (*CRTL1 – cartilage link protein 1*), skrimslī stabilizē agrekāna un hialuronskābes agregātus (*Kou and Ikegawa 2004*). HAPLN1 ir viens no retajiem diferencētiem hondrocītiem specifiskajiem marķieriem. Vēl par hondrocītu marķieriem uzskata II, X un XI tipa kolagēnus un agrekānu, bet tie ir plaši sastopami arī citos audos.

### 1.3.3. Adipoģenēzes marķieri

Taukaudiem un sevišķi adipocītiem nepiemīt tikai rezervju uzkrāšanas funkcija, tie darbojas arī endokrīni, sintezējot un sekretējot dažādus citokīnus, proteīnus un hormonus (*Tan et al. 2004, Ronti et al. 2006*). Process, kurā no MCS veidojas adipocīti ir pazīstams kā adipoģenēze.

Viens no nozīmīgākajiem adipoģenēzē iesaistītajiem gēniem ir *PPAR $\gamma$*  (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), kas kodē II tipa kodola receptoru, kas pazīstams arī kā glitazona receptors (*Michalik et al. 2006*). *PPAR $\gamma$*  veido heterodimēru ar retinoīdu X receptoru (RXR) un regulē vairāku gēnu ekspresiju, tostarp arī gēnus, kas atbildīgi par adipoģenēzi (*Jones et al. 2005, Michalik et al. 2006*). Pelēs ar izslēgtu *PPAR $\gamma$*  pēc diētas ar ievērojami paaugstinātu tauku daudzumu, taukaudi neveidojās (*Jones et al. 2005*)

Adipsīns (ADPN) ir serīna proteāze, kuru sekretē adipocīti. Tas pieder tripsīnu (peptidāžu) saimei, bet iesaistās ar imūnsistēmas komplementa alternatīvā ceļa kaskādēs. Imūnās darbības dēļ adipsīns literatūrā plašāk pazīstams kā faktors D (*Volanakis and Narayana 1996*).

Perilipīns (PLIN) ir proteīns, kas pārklāj lipīdu pilienus adipocītos un steroīdus sintezējošās šūnās. Adipoģenēzes laikā ievērojami paaugstinās šī gēna ekspresija (*Akter et al. 2008*). Perilipīns ir būtisks faktors lipīdu uzglabāšanas un lipolīzes regulācijā un ir paaugstināti ekspresēts tuklos (*obese*) augstākajos dzīvniekos (*Brasaemle et al. 2009*).

## 1.4. Šūnu novecošana un stabilitāte

Pirms 50 gadiem ASV zinātnieki Leonards Heifliks un Pauls Mūrheds (*Hayflick and Moorhead 1961 cit. pēc Sikora et al. 2011*) atklāja, ka normāla šūnu populācija ir spējīga ierobežoti dalīties. Heifliks demonstrēja, ka normālas cilvēka fetālās šūnas kultūrā spējīgas dalīties 40-60 reizes. Šo robežu nosauca par Heiflika limitu. Parādība, visticamākais, skaidrojama ar eikariotu hromosomu galu jeb telomēru saīsināšanos, kas noris dabīgi. Replikācijas laikā katru reizi hromosomu 3` galā DNS polimerāze nelielu fragmentu (100-150 bp) atstāj nenokopētu (*Serakinci et al. 2008*). Laika gaitā telomēri saīsinās tik ļoti, ka šūna vairs nespēj dalīties (*Olovnikov 1996*). Turklāt telomēri var tikt saīsinātas arī oksidatīvu bojājumu un ķīmisku vielu rezultātā (*Serakinci et al. 2008*) Telomēru saīsināšanās ir visbiežāk skaidrotais šūnu novecošanas iemesls (*Reddel 1999, Londono-Vallejo 2008*).

Sasniedzot Heiflika limitu, šūnu telomēri ir praktiski izzuduši, kas padara hromosomas nestabilas. Normālos apstākļos šūna, kuras telomēri saīsinājušies līdz kritiskajam līmenim, uzsāk apoptozi (*Philippi et al. 2010*). Ja kādu iemeslu dēļ apoptoze neiestājas, atklātos

hromosomu galus šūnas iekšējās kontroles sistēma interpretē kā divpavedienu DNS pārrāvumu un šādus bojājumus labo savienojot (ligējot) bojātos galus kopā. Šūnu dalīšanās laikā apvienotās hromosomas tiek pārrautas nevienmērīgi, izraisot nopietnas mutācijas un hromosomu aberācijas (*Guan et al. 2010, Sikora et al. 2011*). Organismā šādas mutācijas parasti tiek laikus detektētas un bojātās šūnas likvidētas, tomēr reizēm šādas mutācijas uzkrājas. Tās var būt neitrālas, iespējams, ierobežot šūnu turpmāko dalīšanos un funkcijas, bet var būt arī ļaundabīgas un rosināt audzēju veidošanos (*Londono-Vallejo 2008*). Šūnu kultūrās mutācijas uzkrājas daudz biežāk, jo kultūrā nepastāv ārējās kontroles mehānismi.

#### 1.4.1 Telomerāze

Embrionālās un audzēju šūnās darbojas ribonukleoproteīns telomerāze, kas pagarina 3' gala telomērus ar TTAGGG sekvenču atkārtojumiem. Tādējādi telomēri nesaīsinās un šūnas ir spējīgas neierobežoti dalīties (*Olovnikov 1996*). Telomerāzes proteīna daļa darbojas kā reversā transkriptāze (*telomerase reverse transcriptase – TERT*), bet konjugētā ribonukleīnskābe (*telomerase RNA component – TERC*) kalpo par TERT matricu (*Sekaran et al. 2010*). Telomerāze ir populārs pētījumu objekts gan savas nozīmes šūnu proliferācijā, gan savdabīgās struktūras dēļ.

Cilmes šūnas pēc definīcijas ir spējīgas neierobežoti dalīties, tāpēc loģisks būtu pieņēmums, ka tajās ir novērojama arī telomerāzes aktivitāte. Pētījumi parāda, ka telomerāzes darbība samazinās laikā gaitā, tādēļ embrionālās cilmes šūnās un gametās telomerāžu aktivitātes līmenis ir augsts, bet pieaugušo cilmes šūnās (tai skaitā ādas MCŠ) telomerāze ir ekspresēta niecīgos daudzumos, vai nav ekspresēta vispār (*Serakinci et al. 2008*). Mezenhimālo šūnu kultūrās telomerāze strauji zaudē savu aktivitāti. Suņu šūnu kultūrās jau pēc dažām pārsēšanas reizēm (pasāžām) telomerāzes aktivitāte strauji samazinās. Tāpat telomerāzes aktivitāte samazinās arī pēc krioprezervācijas (*Martinello et al. 2010*).

Telomerāzes aktivitāte ir detektēta 80-90% audzēju, tāpēc liela daļa pretvēža zāļu tiek orientētas tieši uz šī enzīma inhibēšanu (*Philippi et al. 2010*). Pastāv uzskats, ka telomerāžu reaktivācija ir galvenais iemesls ar vecumu saistīto audzēju veidošanā (*Anisimov 2003*). Tādēļ telomerāžu aktivitāte būtu būtisks marķieris, lai noteiktu šūnu spēju veidot audzēju.

#### 1.4.2. Apoptoze

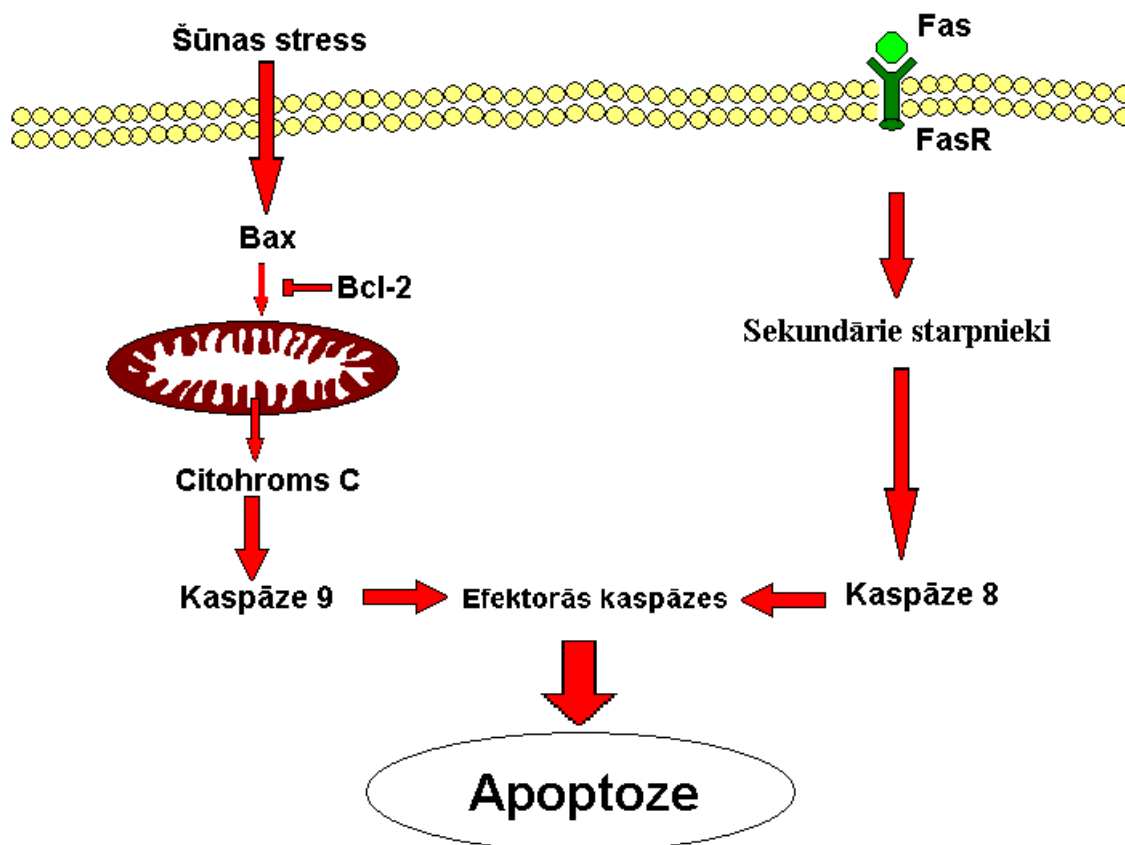
Apoptoze ir programmētās šūnu nāves paveids, kas raksturīgs daudzšūnu organismiem. Apoptozes laikā bioķīmisku reakciju rezultātā šūnas morfoloģiski izmainās, sāk veidot pūslīšus (blebus), šūnu DNS kondensējas un kodols fragmentējas. Atšķirībā no nekrozes,

apoptozes laikā veidojas apototiskie ķermeņi, kuros uzkrājas šūnu atlikumi, tostarp enzīmi, kas varētu kaitēt blakus esošām šūnām (*Kiechle and Zhang 2002*).

Apoptoze ir dabīgs process, kurā tiek likvidētas nevajadzīgas, novecojušas, bojātas vai nepareizi funkcionējošas šūnas. Piemēram, embrija attīstībā, veidojoties roku un kāju pirkstiem, šūnas starp falangām apoptotiski atmirst, un veidojas normālas pirkstu starpas (*Lallemand et al. 2009*). Tāpat apoptozi uzsāk vecas šūnas, kuru telomēri ir izzuduši (*Philippi et al. 2010*). Apoptoze saglabā audu homeostāzi un regulē fizioloģisko augšanu (*Fulda and Debatin 2006*).

Apoptoze tiek iniciēta vai nu ar ārējiem faktoriem (Fas ligandi, TNF), vai iekšēju procesu rezultātā, piemēram, šūnu stress vai telomēru garums (3.att.). Ārēji izraisītā (*extrinsic*) apoptoze sākas ar proapoptotisku ārēju signālu, citokīnu (TNF) vai imūnsistēmas šūnu membrānu proteīnu (Fas) saistīšanos pie receptoriem šūnas membrānā. Šie receptori ir konjugēti ar tā sauktajiem nāves kompleksiem, kuri aktivē kaspāzi-8 (*Fulda and Debatin 2006*). Kaspāze-8 pieder kaspāžu proteāžu saimei, kas ir galveni apoptozes izpildītāji. Kaspāze-8 tālāk aktivē efektorās kaspāzes 3, 6 un 7, kuru darbība noved pie apoptozes. Ārēji izraisītā apoptoze visbiežāk saistīta ar imūnsistēmas izsauktu šūnu bojāeju audzēju vai autoimūno saslimšanu gadījumos (*Fulda and Debatin 2006*).

Iekšēji izraisītā (*intrinsic*) apoptoze sākas šūnas iekšēju procesu, piemēram, DNS bojājumu, defektīvā šūnas cikla, hipoksijas, ārējās vides signālu trūkuma vai atdalīšanās no ārpusšūnu matricas gadījumā, tātad dažādi šūnas stresi. Iekšēji izraisītās apoptozes uzsākšanās vai nomākšana balstās uz pro- un antiapoptotisko Bcl-2 virssaimes (*superfamily*) proteīnu līdzsvaru, kas nosaka mitohondriju membrānu caurlaidību (*Rogerio et al. 2006*). Visi Bcl-2 saimes locekļi satur Bcl-2 proteīnu homologos domēnos (BH) un tiek dalīti apakšgrupās pēc domēna tipa, ko tie satur, piemēram 3.tipa domēnu saturošie proteīni ir pazīstami kā BH3, kamēr citi (vairākus BH domēnus saturoši) tiek devēti vienkārši par BH proteīniem. Proapoptotiskie BH3 proteīni (BAD, BIK, BIM u.c.) aktivē BH proteīnus ar vairākiem domēniem (BAK, BOK, BAX u.c.). Šie proteīni palielina mitohondriju membrānas caurlaidību (*Lindsay et al. 2011*). Antiapoptotiskie proteīni (BCLW, BCL-X<sub>L</sub>, BCL-2 u.c.) cenšas šo procesu novērst inaktivējot BAX un BAK. Tieši BAX un BCL-2 ir šūnu stresa izraisītās apoptozes sākumposma pēdējie efektori un nosaka vai apoptoze tiks uzsākta. Šo gēnu balanss literatūrā bieži aprakstīts kā objektīvs šūnu labklājības rādītājs (*Wiren et al. 2006, Hu et al. 2007, Ziolkowska-Seta et al. 2009, Liu et al. 2011*). Rogerio un kolēģi (*Rogerio et al. 2006*) demonstrēja, ka BAX un BCL-2 gēnu ekspresijas attiecības uzrādītie rezultāti sakrīt ar rezultātiem, kas iegūti ar TUNEL iezīmēšanas metodi, kura ir pazīstama kā stabila un uzticama apoptozes mērīšanas sistēma.



3.attēls. Apoptozes iniciēšana. Vienkāršota shēma.

Figure 3. The initiation of apoptosis. Simplified schematic drawing.

Pēc proapoptotisko proteīnu iedarbības uz mitohondrijiem to membrāna kļūst caurlaidīgāka un citoplazmā nokļūst citohroms, kas, saistot kaspāzi-9 un apoptotisko proteāžu aktivējošo faktoru 1 (Apaf1) izveido apoptosomu, kas tālāk aktivē efektorās kaspāzes 3, 6 un 7 (Bao and Shi 2007).

Šūnu kultūrās apoptoze notiek šūnu stresa iespaidā vai arī šūnām parakrīni vienai otru stimulējot uzsākt apoptozi. Parakrīnā apoptozes stimulēšana visbiežāk raksturīga stipri konfluentām šūnu kultūrām (Kuppers et al. 2011), bet šūnu stresa izraisītā - gadījumos, kad ir slikti augšanas apstākļi, trūkst barības vielas vai šūnas noveco (Schamberger et al. 2005). Apoptozi var izsaukt arī ķīmiski aģenti, piemēram, dimetilsulfoksīds (DMSO) palielina Fas ekspresiju kaimiņšūnās, bet neietekmē Bcl-2 saimes proteīnu ekspresiju (Vondracek et al. 2006). Apoptozes līmeņa novērošana šūnu kultūrās var palīdzēt analizēt stresu izraisošus faktorus un novērtēt kopējo kultūras labklājības līmeni.

### 1.5. Krioprezervācijas optimizācija

Šūnu un audu pētījumos neizbēgami rodas nepieciešamība pēc ilgtermiņa uzglabāšanas metodēm. Biologiem pieejamas dažādas uzglabāšanas metodes – dehidratācija, kas ir populāra metode darbā ar raugiem, kā arī liofilizācija, vitrifikācija un krioprezervācija.

Krioprezervācija ir metode, ko visbiežāk lieto strādājot ar ādas MCŠ, un tās laikā šūnas vai audi tiek ievietoti speciālos šķīdumos un pakāpeniski sasaldēti līdz  $-80^{\circ}\text{C}$  -  $-196^{\circ}\text{C}$ , kur šūnu dzīvības procesi praktiski tiek apturēti (*Baust et al. 2002*).

Tomēr daļa šūnu krioprezervācijas laikā aiziet bojā dehidratācijas un ledus kristālu veidošanās dēļ (*Guan et al. 2007*), tādēļ ļoti svarīgi izvēlēties pareizu saldēšanas šķīdumu, kas pēc iespējas labāk pasargātu šūnas. Viens no saldēšanas šķīdumu komponentiem ir krioprotektants – viela, kuras galvenais mērķis ir samazināt kristālu veidošanās radītos bojājumus, un šo mērķi dažādi krioprotektanti sasniedz dažādos veidos, piemēram samazinot sasalšanas punkta temperatūru, osmotiski saistot brīvo ūdeni no šūnām, kā arī padarot šķīdumu viskozāku un tādējādi veicinot amorfu struktūru veidošanos sasalšanas laikā (*Morris et al. 2006*).

Krioprotektīvās īpašības ir pētītas dažādām vielām – cukuriem, serumam un šķīdinātājiem – gan atsevišķi, gan kombinācijās. Populārākie un plašāk pielietotie krioprotektanti ir DMSO un glicerīns, kuriem arī izdevies uzrādīt visaugstākos izdzīvotības rādītājus (*Baust et al. 2002, Morris et al. 2006*). DMSO paaugstina šķīduma osmotisko spiedienu, saistot daudz brīvā ūdens, un mazliet šķīdina šūnu membrānas, tādējādi padarot membrānas elastīgākas pret kristālu izraisītiem bojājumiem (*Szmant 1975, Smondyrev and Berkowitz 1999*). Glicerīns mijiedarbojas ar ūdeņraža saitēm, tādējādi ievērojami samazinot ūdens sasalšanas temperatūru. Šajā gadījumā šūnas sasilst pirms ārējās vides un nereaģē uz kristālu veidošanos (*Morris et al. 2006*). Rasul un kolēģi (*Rasul et al. 2007*) centās šos krioprotektantus apvienot, bet rezultātā šūnu izdzīvotība bija krietni zemāka, nekā izmantojot katru vielu atsevišķi.

Tomēr krioprotektantu pārmērīga lietošana var būt šūnām toksiska un kaitīga, piemēram, DMSO ievērojami samazina putnu spermatozoīdu izdzīvotību un fertilitāti (*Tselutin et al. 1999*), var izraisīt uzvedības izmaiņas bezmugurkaulniekiem (*Pagan et al. 2006*), izsaukt apoptozi cilvēka šūnās (*Vondracek et al. 2006*) un bojāt peļu centrālās nervu sistēmu tās attīstības laikā (*Hanslick et al. 2009*). Glicerīns bojā šūnas osmotiskās aktivitātes dēļ, turklāt tas var iesaistīties glikozes ciklā, kā rezultātā uzkrājas toksisks metabolīts metilglioksāls (*Gutierrez-Perez et al. 2008*). Šo iemeslu dēļ krioprotektanta daudzums jāizvēlas ļoti rūpīgi. Literatūras dati mudina izmantot 8-15% krioprotektanta (*Baust et al. 2002*), kas šķīdināts vai nu serumā, vai arī tādā pat barotnē, kādā šūnas audzētas. Serums šūnām palīdz pārvarēt badošanos un darbojas kā „matracis” sasalšanas un atkuššanas laikā (*Sachdeva 2009, Thirumala et al. 2010*).

Vairumā gadījumu aplūkojot saldēšanas apstākļu ietekmi, eksperimenti ir īstermiņa un sniedz vispārīgu priekšstatu par varbūtējām sekām, un visai maz datu ir pieejami par šūnu izdzīvošanu pēc ilgtermiņa krioprezervācijas.

Krioprotektanta un saldēšanas vides izvēle nenoliedzami ir galvenais bioloģiskā materiāla izdzīvošanu veicinošs faktors, tomēr ir arī citi apstākļi, kas var ietekmēt šūnu izdzīvotību. Daži autori (*Stachecki and Cohen 2004, Paris et al. 2009*) norāda uz nepieciešamību šūnas sinhronizēt (nostādīt vienā attīstības dzīves cikla fāzē) pirms saldēšanas. Sinhronizāciju var panākt ar ķīmiskiem reaģentiem vai arī ierobežojot šūnu funkcijām nepieciešamās barības vielas, piemēram, serumu (*Davis et al. 2001*). Tāpat nozīme ir arī šūnu skaitam tilpuma vienībā – mazā koncentrācijā uz šūnām tiek izdarīts lielāks osmotiskais spiediens un tās saņem lielāku krioprotektanta devu (*Mazur and Cole 1985, Mazur and Cole 1989*), bet arī pārmērīgas koncentrācijas var samazināt bioloģiskā materiāla izdzīvotību – šūnu ir tik daudz, ka veidojas nesasalstošā masa, kas ātri vien aiziet bojā (*Piasecki et al. 2009*). Lielās koncentrācijas gan gluži neattiecas uz MCŠ krioprezervāciju, kur parasti maksimālais saldējamo šūnu blīvums nepārsniedz  $10^7$  šūnas mililitrā.

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Šūnu kultūras

Cilvēka ādas paraugi tika iegūti no pēcoperāciju materiāliem, saskaņā ar LU EKMI medicīniskās ētikas komisijas atzinumu. Visas biotehnoloģiskās darbības ar cilvēka šūnām veiktas saskaņā ar Latvijas Republikas likumdošanu.

Darbā izmantotas piecas cilvēka dermas šūnu kultūras ar laboratorijas numerāciju 10D, 51D, 52D, 53D un 55D un viena HeLa audzēja šūnu līnija.

### 2.2. Dermālo šūnu izdališana no ādas parauga.

Ādas paraugu apstrādā ar 10% dispāzes II (2,4 u/μl, Sigma-Aldrich, ASV) šķīdumu PBS (fosfātu buferšķīdums, Invitrogen, ASV) un inkubē 2-4 stundas, +37 °C. Dermu atdala no epidermas un 30-60 min inkubē +37 °C 5 ml kolagenāzes XI šķīdumā (50 CDU/μl, Sigma-Aldrich, ASV). Kolagenāzes reakciju inhibē ar 10 ml S10 barotni (67% DMEM, 22% F-12 barotnes piedeva, 10% teļa fetālais serums, 1% penicilīna un streptomīcīna maisījums, visi reaģenti no Invitrogen, ASV). Šūnas mazgā ar PBS un filtrē caur šūnu filtru (d=70 μm), tad suspendē 5 ml S10 barotnes, izskaita šūnas hemocitometrā un suspensiju pārnēs T25 (virsmas laukums 25 cm<sup>2</sup>) audu kultivēšanas flakonā.

Šūnas kultivē +37 °C, 5%CO<sub>2</sub> atmosfērā, barotni mainot ik pēc 3-5 dienām. Šūnām sasniedzot 75-90% konfluenci, tās nepieciešams pārsēt.

### 2.3. Šūnu pārsēšana un skaitīšana

Šūnu monoslāni noskalo ar 5ml PBS, tam uznes 1 ml 0,25% tripsīna/EDTA (Invitrogen, ASV) šķīdumu un inkubē 2-3 min +37 °C. Reakciju inhibē ar 2 ml S10 barotni, šūnas mazgā ar PBS un suspendē 1 ml S10 barotnes. 1,5 ml stobriņā sagatavo tripānzilā (Invitrogen, ASV) šķīdumu (50% tripānzilais, 45% S10, 5% šūnu suspensija) un hemocitometrā izskaita kopējo ( $N_K$ ) un iekrāsoto (mirušo) šūnu skaitu ( $N_M$ ). Šūnu izdzīvotību (I) nosaka pēc formulas  $I=(N_K-N_M)/N_K*100\%$ . Šūnu PD pieaugumu aprēķina pēc formulas  $\Delta PD=\log_2(N_K/N_S)$ , kur  $N_S$  ir šūnu skaits, kas sākotnēji tika izsēts flakonā.

Flakonā pārnēs 5-10x10<sup>4</sup> šūnas un pievieno barotni līdz 5 ml. Pārējo suspensiju izmanto eksperimentiem, iesaldē vai likvidē saskaņā ar LU BBML tehniskajiem noteikumiem „Atkritumu aprīte laboratorijā”.

## 2.4. Šūnu krioprezervācija

Sagatavo 1 ml šūnu suspensijas saldēšanas pamatvidē (serums vai S10 barotne). Šūnu suspensiju atdzesē uz ledus vismaz vienu stundu, tad pievieno 1 ml uz ledus atdzesēta 20% krioprotektanta (DMSO (Sigma-Aldrich, ASV) vai glicerīna (Enola, Latvija)) šķīduma (Krioprotektants jāšķīdina tajā pašā pamatvidē, kurā tiek suspendētas šūnas). Krioprotektanta šķīdumu pakāpeniski pievieno šūnu suspensijai. Saldēšanas stobriņus ar šūnu suspensiju saldē ar izopropanolu (Enola, Latvija) pildītā kamerā, kur šūnas tiek sasaldētas pakāpeniski – aptuveni  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (*gradual freezing*). Saldēšanas kameru ievieto  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bet pēc stundas pārvieto uz  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  frīzeri.

Pirms saldēšanas iespējams šūnas sinhronizēt, iepriekšējā dienā S10 barotni nomainot pret barotni bez seruma.

Iesaldētas šūnas uzglabā 1 nedēļu, 1 mēnesi, 6 mēnešus vai ilgāk.

Atkausējot šūnas, saldēšanas stobriņu 1-3 min inkubē siltā ūdens vannā ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Šūnu suspensiju pārnes 15ml stobriņā un lēnām pievieno S10 barotni līdz 10 ml. Maisījumu atmazgā no krioprotektanta. Šūnas izskaita hemocitometrā, nosaka to izdzīvotību, izsēj audu kultivēšanas flakonā un inkubē  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$  atmosfērā.

## 2.5. Kariotipa analīze

Šūnu kultūru sinhronizē atstājot uz nakti (aptuveni 16 stundas) barotnē bez seruma. Šūnas apstrādā ar tripsīnu un suspendē S10 barotnē, pēc tam pievienojot kolcemīda (Invitrogen, ASV) šķīdumu ar gala koncentrāciju  $0,2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ . Inkubē 3 h  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Suspensiju centrifugē un nogulsnes suspendē  $0,075\text{M}$  KCl šķīdumā un inkubē 10 min  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pēc tam šūnas fiksē metanolā:ledus etiķskābē (3:1) un pilina uz priekšmetstikliņa no 30-50 cm augstuma. Hromosomas vizualizē ar Giemsa krāsvielu (Invitrogen, ASV) un aplūko gaismas mikroskopā  $1000\times$  (eļļas imersijas objektīva) palielinājumā.

## 2.6. RT-PCR un laikā novērojamās PCR (qPCR) analīze

Paraugu kopējo RNS izdala pēc TRIzol ražotājfirmas (Invitrogen, ASV) ieteiktā protokola. Trīs simt tūkstošiem ( $3\times 10^5$ ) šūnu pievieno 0,5 ml TRIzol reaģenta, kam pievieno 0,1 ml hloroforma (Sigma-Aldrich, ASV), aktīvi samaisa, inkubē 2-3 min istabas temperatūrā un centrifugē 15 min  $14000\text{ rpm}$   $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pēc centrifugēšanas augšējo (ūdens) fāzi pārnes jaunā stobriņā ar 0,25 ml izopropanola, samaisa un inkubē 10 min istabas temp., centrifugē 10 min  $14000\text{ rpm}$   $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  un nogulsnes suspendē 0,5 ml 75% etanolā/ $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC (Jaunpagasts Plus,

Latvija, Invitrogen, ASV). Paraugus centrifugē, nožāvē, resuspendē 30-50 µl H<sub>2</sub>O-DEPC un inkubē 10 min 55°C.

RNS koncentrāciju mēra ar NanoDrop spektrofotometru (ThermoScientific, Vācija) vadoties pēc ražotāja ieteiktā protokola. Pēc RNS koncentrācijas aprēķina komplementārās DNS (kDNS) sintēzes reakcijā nepieciešamos RNS šķīduma tilpumu. Reakciju sagatavo 0,2 ml stobriņā, RNS šķīdumam pievienojot 0,5 µl (0,25 µg) Oligo(dT)<sub>18</sub> praimera, 0,5 µl (0,1 µg) nejaušo heksomēru maisījuma, 4 µl 5x reakcijas bufera, 2 µl (1 mM) dNTP maisījuma, 1 µl (200 u) Reversās transkriptāzes RevertAid, 0,5 µl (20 u) RNāžu inhibitora RiboLock un uzpildot līdz 20 µl ar H<sub>2</sub>O-DEPC (Reversās transkripcijas reaģenti no Fermentas, Lietuva). Reakciju veic „Veriti” (Applied Biosystems, ASV) PCR iekārtā uzstādot programmu +25° C 10 min, +42° C 60 min un +70° C 10 min.

Iegūto vienpavediena kDNS uzglabā -20 °C vai uzreiz izmanto polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR – *polimerase chain reaction*) analīzēm.

PCR analīzes reakciju sagatavo 0,2 ml stobriņā, kurā sapilina 2 µl Parauga kDNS, 1 µl (0,25 µM) tiešo praimeri, 1 µl (0,25 µM) apgriezto praimeri, 10 µl 2x PCR maisījumu (Fermentas, Lietuva) un uzpilda līdz 20 µl ar H<sub>2</sub>O-DEPC. Preimeru sekvenču aplūkojamās 1. tabulā. Reakciju veic „Veriti” PCR iekārtā uzstādot programmu +95° C 20 s, +60° C (temperatūra atkarīga no praimera) 30 s un +72° C 30 s, kuru atkārti 40 ciklus.

PCR produktus pārbauda 1% agarozes (Fermentas, Lietuva) gēla elektroforēzē, krāsojot ar etīdija bromīdu (Enola, Latvija).

Laikā novērojamās (kvantitatīvās) PCR (qPCR) analīzes reakciju sagatavo 96 lauciņu plates lauciņā, sapilinojot 2 µl parauga kDNS, 1 µl (0,25 µM) tiešo praimeri, 1 µl (0,25 µM) apgriezto praimeri, 10 µl 2x „SYBRgreen qPCR maisījumu (Fermentas, Lietuva) un uzpilda līdz 20 µl ar H<sub>2</sub>O-DEPC. Reakciju veic „StepOne Plus” (Applied Biosystems, ASV) qPCR iekārtā, „StepOne Plus software” datorprogrammā uzstādot programmu +95° C 30 s, +60° C (temperatūra atkarīga no praimera) 1 min un +72° C 30 s, kuru atkārti 40 ciklus. DNS daudzuma nolasīšana tiek veikta katra cikla beigās.

Datus apkopo „StepOne Plus software” un analizē Microsoft Office Excel datorprogrammās. Visi PCR rezultāti tiek veikti 2 tehniskajos atkārtojumos. Iegūtajiem rezultātiem aprēķina vidējās vērtības un standartnovirzes. Gēnu relatīvās ekspresijas dati tiek analizēti pēc Livaka metodes (*Livak and Schmittgen 2001*). Statistisko ticamību pārbauda ar Stjudenta koeficienta T-testu. Rezultāti, kuros p vērtība ir mazāka par 0,05 (p<0,05), uzskatāmi par statistiski ticamiem.

1. tabula  
 Maģistra darbā izmantotie praimerī  
 Table 1  
 Primers used in Master thesis

Nosaukums	Sekvence 5'-3'	Produkta garums, bp	Gēnu bankas references Nr.
TERT_F	GGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTG	254	NM_198253
TERT_R	AGCTGCACCCTCTTCAAGTG		
B-actin_F	AGCCTCGCCTTTGCCGA	174	NM_001101
B-actin_R	CTGGTGCTGGGGCG		
BCL2_F	TTGCTTCCCGGCGTCCCT	201	NM_000657
BCL2_R	TCCTGGGGACTCCTGGAC		
BAX_F	GCTTCAGGGTTTCATCCA	148	NM_138765
BAX_R	GCTCCATGTTACTGTCCA		
BGLAP_F	CACCATGAGAGCCCTCAC	248	NM_199173
BGLAP_R	CTCGGGCAGCTTGCTCTT		
RUNX2_F	AGTGGACGAGGCAAGAGTTTCA	111	NM_001015051
RUNX2_R	GGGTTCCCGAGGTCCATCTA		
SPARC_F	CCCATTGGCGAGTTTGAGAA	140	NM_003118
SPARC_R	TTGCAAGGCCCGATGTAGTC		
PPARG_F	AGCCTCATGAAGAGCCTTCCA	120	NM_005037
PPARG_R	TCCGGAAGAAACCCTTGCA		
ADPN_F	AGGGTCACCCAAGCAACAAG	151	NM_001928
ADPN_R	TACGTGGCCCATGCTGATCT		
PLIN_F	ACCCCCCTGAAAAGATTGCTT	86	NM_002666
PLIN_R	GATGGGAACGCTGATGCTGTT		
HAPLN1_F	TCACACTCGCCCAGAGACAA	194	NM_001884
HAPLN1_R	TGATCAGCCCAGCAGATTGA		
Sox9_F	ACCAGTACCCGCACTTGACAC	136	NM_000346
Sox9_R	GGGTGGTCCTTCTTGTGCTG		

Praimeri iegūti no LU BBML kolekcijas.

## 2.7. Šūnu ploīditātes noteikšana plūsmas citometrā

Šūnas pēc apstrādes ar tripsīnu mazgā PBS. Suspensiju centrifugē un nogulsnes suspendē propīdija jodīda šķīdumā (50 µg/ml, Sigma-Aldrich, ASV). Plūsmas citometrā „FACScalibur” (Becker Dickinson, ASV) uzstāda tiešās izkliedes, sānu izkliedes un propīdija jodīda kanālu un veic paraugu analīzi. Datus apkopo „BD CellQuest Pro” datorprogrammā.

### 3. REZULTĀTI

Maģistra darbā tika izmantotas piecas cilvēka dermas mezenhimālo šūnu kultūras sākot no 3.pārsējuma jeb darba bankas šūnām (atbilstoši Eiropas farmakopejas ieteikumiem par šūnu banku veidošanu). Pēc šūnu izsēšanas tika uzsākta populācijas dalīšanās (PD) reižu uzskaitē. Ģenētiskās stabilitātes kontrolei tikai kultivēta arī audzēja šūnu līnija (HeLa). HeLa šūnām PD uzskaitē netika veikta.

Identiskos apstākļos izdalītas un kultivētas šūnas laboratorijā iepriekš raksturotas kā ādas mezenhimālās cilmes šūnas (MCŠ) (*Riekstina et al. 2008, Riekstina et al. 2009*).

#### 3.1. Ādas MCŠ ģenētiskā stabilitāte ilgstošas *in vitro* pavairošanas laikā

Dermālo šūnu hromosomu komplekts tika noteikts pēc aptuveni 5, 25 un 50 dalīšanās reizēm un divu nedēļu ilgas krioprezervācijas. Katram paraugam tika aplūkoti vismaz pieci mitotiskie izklājumi (*mitotic spread*) un visos izklājumos tika skaitītas redzamās hromosomas (2.tab.).

2. tabula  
Hromosomu skaits  
Table 2  
Chromosome number

	10D	51D	52D	53D	55D	HeLa
<b>PD5</b>	46	46	46	46	46	46, 48,
<b>PD25</b>	46	46	46	46	46	51, 55,
<b>PD50</b>	46	46	46	46	46	56, ...
<b>Pēc Krioprezervācijas</b>	46	46	46	46	46	-

Visās piecās dermālo šūnu kultūrās tika detektētas 46 hromosomas, kas atbilst normālam cilvēka kariotipam. Kultūrām sasniedzot PD25 un PD50, hromosomu skaita izmaiņas netika novērotas. Divu nedēļu ilga krioprezervācija neatstāja ietekmi uz šūnu kariotipu visas šūnu kultūras saglabāja normālu kariotipu. HeLa šūnu līnijas paraugos tika saskaitītas 46, 48, 51 55, 56 un vairāk hromosomas.

Visiem paraugiem tika pārbaudīta arī telomerāzes reversās transkriptāzes (*TERT*) gēna ekspresija. *TERT* ekspresiju noteica ar RT-PCR metodi un rezultātus atspoguļoja tabulā (3.tab.).

3 tabula  
*TERT* gēna ekspresija  
 Table 3  
*TERT* gene expression

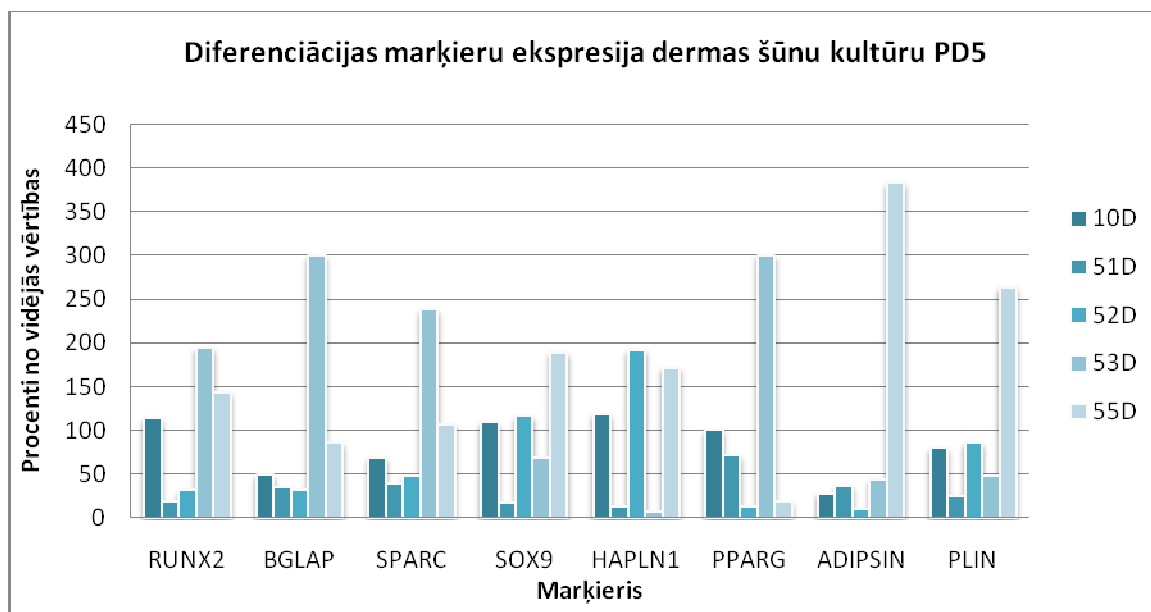
	<b>10D</b>	<b>51D</b>	<b>52D</b>	<b>53D</b>	<b>55D</b>	<b>HeLa</b>
<b>PD5</b>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
<b>PD25</b>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POZ
<b>PD50</b>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
<b>Pēc Krioprezervācijas</b>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	-

Dermas šūnu kultūrās nevienā no dotajiem laika punktiem netika konstatēta *TERT* ekspresija. Arī divu nedēļu krioprezervācija neizraisīja *TERT* ekspresijas uzsākšanos. Paraugā, kas iegūts no HeLa šūnām, *TERT* ekspresija bija ļoti izteikta.

### 3.2. Ādas MCŠ diferenciācijas marķieru ekspresija ilgstošas *in vitro* pavairošanas laikā

Darba ietvaros tika sastādīts mezenhimālās diferenciācijas marķieru panelis, kas veidots no 8 gēniem (3 osteoģenēzes, 2 hondroģenēzes un 3 adipoģenēzes marķieri). Katras mezenhimālās diferenciācijas līnijas (osteoblastu, hondrocītu, adipocītu) raksturošanai tika izvēlēts viens transkripcijas faktors (attiecīgi RUNX2, SOX9, PPAR $\gamma$ ) un viens vai divi diferencētām šūnām specifiski proteīni – BGLAP (osteokalcīns) un SPARC (osteonektīns) osteoblastiem, HAPLN1 hondrocītiem un ADPN (adipsīns) un PLIN (perilipīns) adipocītiem.

Lai novērtētu šo gēnu izmaiņu laikā, no visām dermas šūnu kultūrām pēc PD5, PD25 un PD50 veica laikā novērojamo PCR. No mērķģēna sliekšņa cikla (Ct) tika atņemts iekšējās kontroles jeb pamatmetabolisma (*housekeeping*) gēna  $\beta$ -aktīna sliekšņa cikls, un iegūtā starpība ( $\Delta$ Ct) ievietota formulā  $2^{-\Delta$ Ct}, ar kuru aprēķināja mērķģēna ekspresijas relatīvās vienības. Gēnu relatīvās ekspresijas vienības salīdzināja starp kultūrām un attēloja grafikos (4.att., 1.pielikums, 2.pielikums).



4. attēls. Atšķirības marķieru gēnu ekspresijā starp ādas šūnu kultūrām pēc 5 dalīšanās reizēm.  
Figure 4. Differences in marker gene expression between dermal cell cultures after 5 doublings.

Diferenciācijas gēnu ekspresijas tendences ievērojami variēja starp paraugiem. Jau agrīnajās kultūrās (PD5) atšķirības starp paraugiem bija ļoti lielas, sasniedzot pat 40 reižu lielu atšķirību adiposīna ekspresijā starp 52D un 55D, kas neļauj izdarīt viennozīmīgus secinājumus par dermas šūnu kultūrām kopumā. Tādēļ kultūrās atsevišķi tika novērtētas gēnu ekspresijas izmaiņu tendences laikā. Marķiergēnu ekspresijas izmaiņu tendences salīdzināja starp PD5 un PD25 un PD25 un PD50 un atšķirības atspoguļoja tabulā (4.tab.).

4.tabula  
Diferenciācijas gēnu ekspresijas tendences pieaugot kultūras PD  
Table 4  
Tendencies of differentiation gene expression with increasing the culture PD

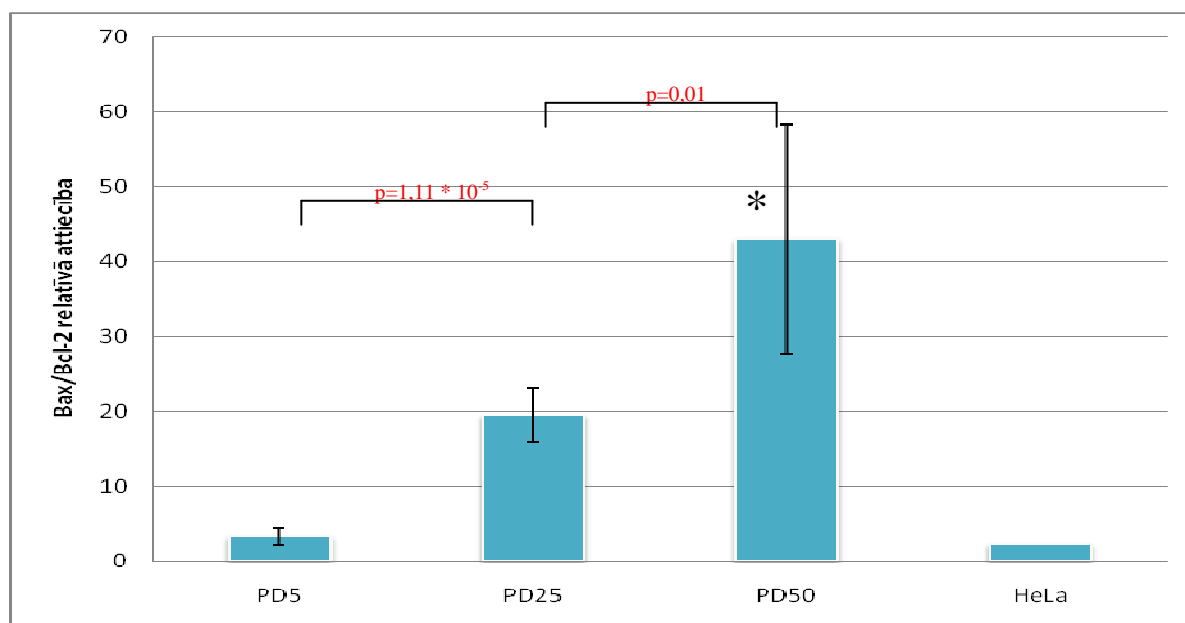
Kultūra	Laika posms	Marķieri							
		Osteoģenēzes			Hondroģenēzes		Adipoģenēzes		
		RUNX2	BGLAP	SPARC	SOX9	HAPLN1	PPARG	ADIPSIN	PLIN
10D	PD5-PD25	↗	↗	↗	↗	→	↘	↘	↘
	PD25-PD50	→	↘	↘	↗	↗	→	→	↘
51D	PD5-PD25	↗	↘	↗	↘	↗	↘	↘	↘
	PD25-PD50	↗	→	↗	↗	↗	↘	↘	↘
52D	PD5-PD25	↗	↗	↗	↘	↘	↗	↗	↗
	PD25-PD50	→	↘	↘	↘	→	↗	↗	↗
53D	PD5-PD25	↘	↘	↘	↘	↘	→	↗	↗
	PD25-PD50	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
55D	PD5-PD25	↗	↘	↗	↗	↗	↘	↘	↘
	PD25-PD50	↘	→	↘	↗	↗	→	→	↘

↗ - ekspresija palielinās dotajā laika posmā, ↘ - ekspresija samazinās dotajā laika posmā, → - ekspresija būtiski nemainās dotajā laika posmā

Diferenciācijas gēnu tendences vairumā gadījumu ļāva izdarīt secinājumus par izmaiņām šūnu kultūrā. 10D paraugā laika gaitā samazinājās adipoģenēzes marķieru ekspresija, bet pieauga hondrocītiem raksturīgo gēnu ekspresija. Osteoģenēzes marķieri līdz PD25 pieauga, bet tad samazinājās vai palika nemainīgi, kā RUNX2 gadījumā. Līdzīgas tendences novēroja 51D paraugā, kur visu adipoģenēzes marķieru ekspresija samazinājās, kamēr osteoģenēzes un hondroģenēzes marķieru ekspresija pieauga. 52D paraugā līdz PD25 pieauga gan osteoģenēzes, gan adipoģenēzes marķieri, bet līdz PD50 osteoģenēzē iesaistīto gēnu ekspresija atkal samazinājās. Hondrocītiem raksturīgo gēnu ekspresija 52D kultūrā laika gaitā samazinājās. Līdz PD25 paraugā 53D samazinājās osteoģenēzes un hondroģenēzes marķieri, bet līdz PD50 to ekspresija atkal paaugstinājās. Adipoģenēzes marķieru ekspresija paraugā 53D pakāpeniski pieauga. Visbeidzot 55D paraugā pieauga hondroģenēzes, samazinājās adipoģenēzes un vispirms pieauga, tad samazinājās osteoģenēzes marķieru gēnu ekspresija.

### 3.3. Apoptozes līmeņa izmaiņas ādas MCS ilgstošas *in vitro* pavairošanas laikā

Apoptozes līmenis tika mērīts salīdzinot proapoptotiskā *Bax* un antiapoptotiskā *Bcl-2* gēnu ekspresijas attiecību. Tika aprēķinātas abu gēnu ekspresijas relatīvās vienības un iegūta to attiecība (5.att.). Relatīvās attiecības skaitļiem tika izteiktas vidējās vērtības no visām dermas līnijām dotajos laika punktos. Salīdzinājumam, ar šo metodi tika pārbaudīta arī HeLa šūnu līnija.



5. attēls. *Bax* un *Bcl-2* gēnu ekspresijas relatīvo vienību attiecība piecās dermas šūnu kultūrās PD5, PD25, PD50 un HeLa šūnu līnijā. Kļūdu stabīņi attēlo standartnovirzi.

Figure 5. The ratio of *Bax* and *Bcl-2* gene expression relative values in five dermal cell cultures in PD5, PD25, PD50 and HeLa cell line. Error bars show standard deviation.

Apoptozes līmenis pieauga pakāpeniski palielinoties kultūras PD. Paraugos 10D un 51D *Bax/Bcl-2* relatīvās attiecības vienības pieauga lēnāk, kamēr pārējos paraugos pieaugums bija krasāks, tomēr kopumā visās līnijās apoptozes pieaugums bija lineārs atbilstoši kultūras PD. Jaunām kultūrām (PD5) *Bax/Bcl-2* attiecība bija vidēji 3,3 relatīvās vienības, vidējām (PD25) – 19,5, bet novecojušām (PD50) – 43. Hela šūnu līnijai *Bax/Bcl-2* attiecība bija 2,17 relatīvās vienības.

Lai salīdzinātu metodes precizitāti, tika veikts eksperiments, kurā konfluentes (pilns monoslānis) dermas šūnas divas dienas tika audzētas kontroles (10% seruma barotne), 1% seruma barotnes un bezseruma barotnes apstākļos. Seruma badināšana ir literatūrā aprakstīta kā iekšēji izraisīto apoptozi veicinošs process (*Schamberger et al. 2005*). Pusi šūnu izmantoja RNS iegūšanai un laikā novērojamās PCR analīzēm, bet otru pusi analizēja plūsmas citometrā, nosakot šūnu ploīditāti. Šūnām līdzīgie veidojumi, kuru ģenētiskais materiāls bija mazāks par n (normālām šūnām tas ir n vai 2n), tika uzskatīti par apoptotiskiem ķermenīšiem, un tika noteikts to procents kultūrā (5.tab.). Ploīditātes tests ļauj semikvantitatīvi novērtēt apoptozes līmeni šūnu kultūrā.

5. tabula  
Apoptozes noteikšanas metožu salīdzinājums  
Table 5  
Comparison of apoptosis detection methods

	10% seruma barotne	1% seruma barotne	Bezseruma barotne
<b>Bax/Bcl-2 attiecība, relatīvās vienības</b>	3,14	6,43	12,47
<b>Apoptotisko ķermenīšu skaits, procenti</b>	0	0,6	2

Laikā novērojamās PCR dati demonstrēja apoptozes līmeņa pieaugumu palielinoties seruma trūkuma izraisītajam šūnu stresam. Ploīditātes tests sniedza līdzīgus rezultātus – apoptotisko ķermenīšu īpatsvars kultūrā palielinājās samazinot seruma daudzumu kultūrā.

### 3.4. Krioprezervācijas optimizācija

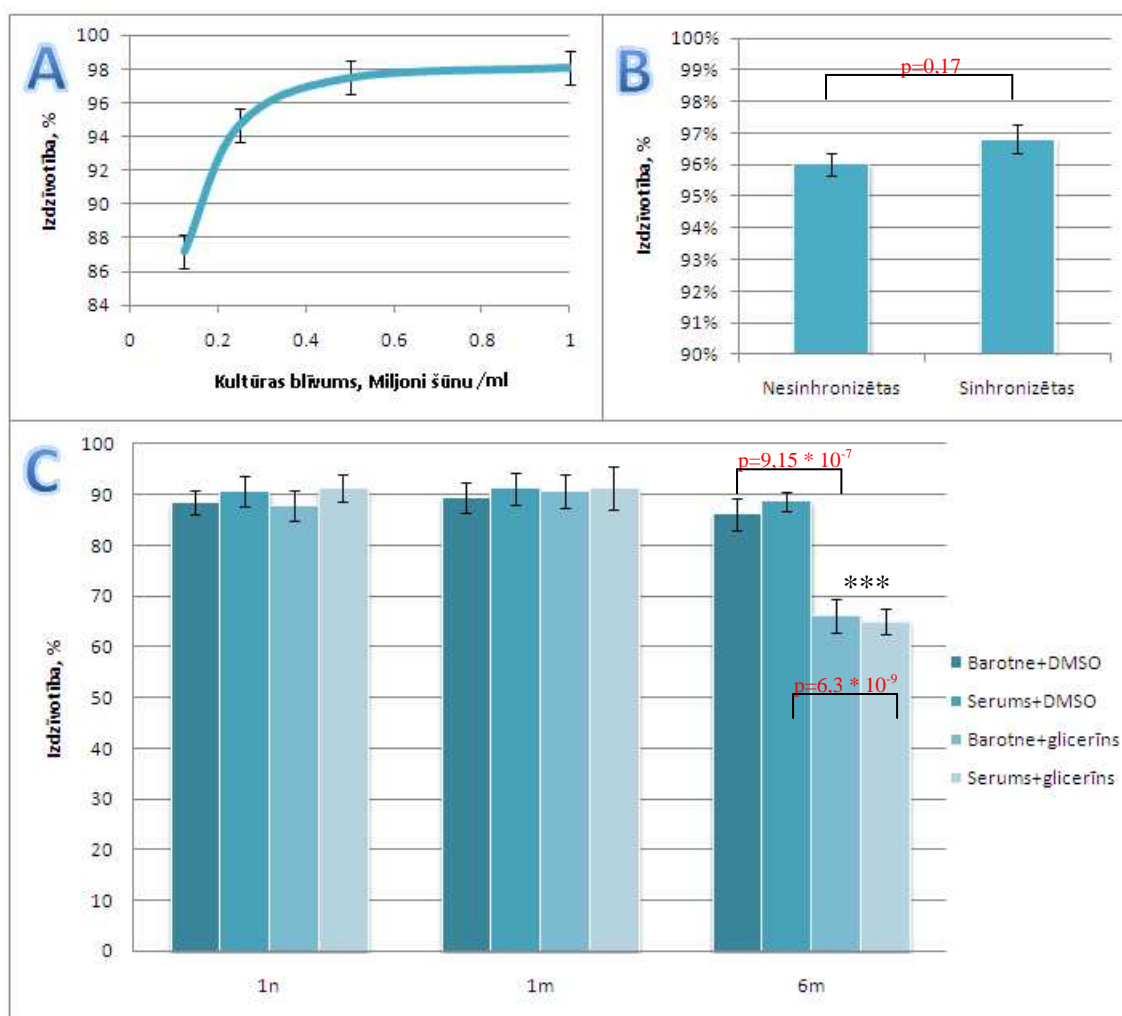
Mezenhimālo šūnu krioprezervācijā iespējamās dažādas variācijas – iesaldēto šūnu skaits, izvēlēta saldēšanas vide un citi, piemēram, šūnu sinhronizēšana pirms saldēšana. Lai piemeklētu labākos saldēšanas apstākļus ilgtermiņa uzglabāšanai, tika novērtēta kultūras blīvuma, sinhronizēšanas un saldēšanas vides nozīme šūnu izdzīvošanā.

Kultūras blīvuma nozīme tika noteikta iesaldējot dermas šūnas četros dažādos blīvumos – 0,125, 0,25, 0,5 un 1 miljons šūnu mililitrā) uz divām nedēļām (6.att. A). Eksperiments tika veikts 5 atkārtojumos.

Sinhronizācijas ietekmi uz šūnu izdzīvotību noteica dienu pirms saldēšanas kultūru sadalot divās daļās - vienu daļu atstāja normālos apstākļos, otru sinhronizēja 16 stundas ar bezseruma barotni (6.att. B). Eksperiments tika veikts piecos atkārtojumos.

2010. gada jūnijā LU Bioloģijas fakultātes studente Dina Sarceviča aizstāvēja bakalaura darbu ar nosaukumu „Dažādu krioprezervācijas metožu salīdzinājums no dermas un epidermas izdalītu šūnu kultūrās”, kurā viņa salīdzināja šūnu izdzīvotību pēc krioprezervācijas dažādos saldēšanas šķīdumos (Sarceviča 2010). Sarcevičas darbā tika salīdzināta šūnu izdzīvotība pēc īsa laika (līdz 1 mēnesim) krioprezervācijas.

Lai novērtētu ilgtermiņa krioprezervācijas efektus, papildus jau izpētītajam, piecas dermas šūnu kultūras dažādos pārsējumos tika iesaldētas uz sešiem mēnešiem. Kopā tika iesaldēti 40 paraugi, pa 10 katrā no pārbaudāmajiem saldēšanas šķīdumiem (6.att. C).



6. attēls. Dermālo MCŠ izdzīvotība pēc krioprezervācijas: A – atkarībā no šūnu skaita mililitrā; B – atkarībā no šūnu kultūras sinhronizēšanas; C – atkarībā no saldēšanas vides. Kļūdu stabiņi attēlo standartnovirzi.

Figure 6. The viability of dermal MSCs after cryopreservation: A – depending on cell count per milliliter; B – depending on cell culture synchronisation; C – depending on freezing media. Error bars show standard deviation.

Kultūras blīvuma ietekmes eksperiments demonstrēja, ka palielinot iesaldēto šūnu skaitu mililitrā, kopējā kultūras izdzīvotība uzlabojas. Gadījumos, kad kultūras blīvums bija mazāks par 0,25 miljoniem šūnu mililitrā (Mš./ml), ievērojami samazinājās arī šūnu izdzīvotība pēc atkausēšanas. Blīvumā no 0,25 līdz 0.5 Mš./ml šūnu izdzīvotība atšķiras par aptuveni 2%, tomēr statistiski šī atšķirība nav būtiska. Kultūras blīvumam pieaugot virs 0,5 Mš./ml izdzīvotības izmaiņa bija niecīga.

Salīdzinot sinhronizētu un nesinhronizētu kultūru izdzīvotību par nepilnu procentu augstāku izdzīvotību uzrādīja sinhronizētās kultūras, tomēr šīs atšķirības nav statistiski būtiskas.

Visbeidzot, salīdzinot saldēšanas vides ietekmi uz izdzīvotību, ievērojamas atšķirības parādījās ilgtermiņa krioprezervācijā. Paraugos, kuri bija iesaldēti vienu nedēļu vai mēnesi, bija vērojamas nelielas fluktuācijas starp saldēšanas vidēm – uz serumu bāzētas vides salīdzinot ar barotnes vidēm saglabāja nedaudz augstāku izdzīvotību, kamēr, salīdzinot starp krioprotektantiem, pavisam neliels izdzīvotības uzlabojums bija vidēm ar glicerīna piedevu. Tomēr neviena no šīm atšķirībām nebija statistiski būtiska. Pēc sešu mēnešu krioprezervācijas ievērojami samazināta izdzīvotība bija šūnām, kas tika saldētas vidēs ar glicerīna piedevu – uz barotni bāzētās vidēs atšķirība starp DMSO un glicerīna klātbūtni bija 20% izdzīvotība, bet seruma vidēs pat 23% izdzīvotības atšķirība. Saldēšanas pamatvides izvēle uz šūnu izdzīvotību neatstāja būtiskas sekas. Ilgtermiņā saldēšanas vidēs, kurās par krioprotektantu izmantots DMSO, šūnu izdzīvotība samazinājās par 2-3%, bet statistiski šī izmaiņa nebija būtiska ( $p > 0,05$ ).

### 3.5. Publicitāte

Maģistra darbā iegūtie dati publicēti sekojošās konferencēs:

- Uzaicināts plakāta ziņojumam “Genetic stability of human skin-derived mesenchymal stem cells in long-term in vitro culture” konferencē “Chromatin, Replication, and Chromosomal Stability” 2011. gada 20.-21.jūnijā, Stokholmā, Zviedrijā (Autori: Kungs J, Cakstina I, Riekstina U, Cappiello L, Ancans J)
- Plakāta ziņojums „Human skin derived mesenchymal stem cell characterisation and effects of DMSO on growth hormone secretion and marker profile” konferencē „TERMIS-EU Meeting 2011” 2011. gada 7.-10.jūnijā, Granadā, Spānijā (Autori: Parfejevs V, Boroduskis M, Riekstina U, Cakstina I, Kungs J, Cappiello L, Krustins J, Ancans J)

- Mutiskais ziņojums "Kariotipēšanas un krioprezervācijas metožu validācija cilvēka dermālajām mezenhīmas šūnu kultūrām" konferencē „LU 69.konference. Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas sekcija” 2011. gada 9.februārī, Rīgā, Latvijā (Autori: Kungs J, Sarceviča D, Čakstiņa I, Cappiello L, Riekstiņa U, Ancāns J)

Tiek gatavota publikācija par maģistra darbā iegūtajiem rezultātiem.

## 4. DISKUSIJA

Vēsturiski pirmās MCŠ tika izdalītas no kaulu smadzenēm (*Friedenstein et al. 1968* cit. pēc *Afanasyev et al. 2009*), tādēļ literatūrā biežāk sastopamas publikācijas tieši par kaulu smadzeņu kultūrām. Autoru vidū ir būtiski atšķirīgi viedokļi par ilgtermiņa *in vitro* kultivēšanas ietekmi uz kaulu smadzeņu MCŠ. Daži autori norāda, ka ilgstoša kultivēšana izraisa MCŠ transformēšanos par audzēju šūnām (*Tolar et al. 2007, Rosland et al. 2009, Torsvik et al. 2010*), citi apgalvo, ka uzkrājas hromosomu aberācijas, bet šūnas netransformējas (*Tarte et al. 2010*), kamēr ir arī autori, kas ilgtermiņa kultūrās nav novērojuši ne transformāciju, ne kariotipa izmaiņas (*Bernardo et al. 2007, Choumerianou et al. 2008*). Tomēr visi šie autori ir vienprātīgi, ka šūnu izdalīšanas un kultivēšanas apstākļi var ievērojami ietekmēt šūnu stabilitāti, tostarp arī novērst transformēšanos par audzēju šūnām. Līdzīgu pētījumu par ilgstošas *in vitro* kultivēšanas ietekmi uz ādas mezenhimālajām šūnām ir nedaudz. Jaunākajā pētījumā (*Guan et al. 2010*) ādas mezenhimālās šūnas tiek uzskatītas par drošām un stabilām. Tomēr ir labi jāsaprot kādi procesi ir iespējami ar šūnām ilgtermiņā atrodoties *in vitro*, pirms plānot to pielietojumu *in vivo* pētījumos.

### 4.1. Ādas MCŠ ģenētiskā stabilitāte ilgstošas *in vitro* pavairošanas laikā

Ģenētiskā stabilitāte un hromosomu komplekts var tieši ietekmēt dažādu gēnu ekspresiju. Polisomijas gadījumā kāds gēns var tikt pārstāvēts vairākkārtīgi, kamēr hromosomu pārrāvumu vai delēciju gadījumā funkcionāli izzust. Ilgstošas kultivēšanas rezultātā, iespējams, uzkrājas dažādas kariotipa aberācijas, tādēļ regulāra kariotipa pārbaude ir nepieciešama.

Maģistra darbā pārbaudītajās dermālo šūnu kultūrās kariotipa izmaiņas netika detektētas nevienā no izvēlētajiem šūnu kultūru pavairošanas punktiem. Šādi rezultāti liecina, ka izvēlētie kultivēšanas apstākļi bija pietiekami, lai saglabātu normālu šūnu kariotipu. Tomēr, lai arī kariotipa pārbaude ar kolcemīda inkubāciju ir minēta Eirpoas farmakopejā kā vienīgā kariotipa pārbaudes metode šūnu kultūrām, tā nav sevišķi jutīga metode. Ar metodi tiek detektētas šūnas, kuras atrodas mitozē, bet to skaits nav liels – aptuveni 10% dermālo šūnu vienlaicīgi atrodas mitozē (*Pan et al. 2009*), turklāt kolcemīda inkubācija palīdz detektēt tikai šūnas, kas atrodas mitozes metafāzē, tātad vēl mazāku daļu. Tādēļ iespējams, ka hromosomu aberācijas uzkrājušās šūnās, kuras neatrodas mitozē. Maģistra darbā tika pārbaudīts hromosomu skaits, bet ne struktūra un kariotipa sastāvs, tādēļ ir iespējams, ka kāda hromosoma pārstāvēta vairākkārt, kamēr cita tikai vienu reizi. Tāpat iespējami arī hromosomu plecu fragmentu zaudējumi, kuri netika pārbaudīti. Precīzākai aberāciju detekcijai būtu ieteicama, piemēram, fluorescentā *in situ* hibridizācija. Jāatzīmē, ka hromosomu aberācijas tiek novērotas arī cilvēka audos novecošanas rezultātā, un bieži tās nav saistītas ar

ļaudabīgiem vai patoloģiskiem procesiem. Tāpat vairākos cilvēka šūnu un audu veidos poliploidija ir fizioloģiski normāla parādība, piemēram, aknās.

HeLa līnijā detektējais paaugstinātais hromosomu skaits atbilst literatūras datiem par šo audzēju līniju (*Macville et al. 1999*). HeLa šūnām ir raksturīga vairāku hromosomu polisomija kā arī vairākas pārrautas hromosomas, kas turpina dalīties kā pseidohromosomas.

Augsta *TERT* ekspresija ir audzējiem raksturīga pazīme. Philippi un kolēģi (*Philippi et al. 2010*) norāda, ka 80-90% audzēju ekspresē *TERT*, tādēļ tas uzskatāms par labu audzēju marķieri, tomēr tas jāaplūko kontekstā ar citiem audzēju marķieriem. Pastāv arī audzēju veidi, kas neekspresē *TERT*, un tie izmanto īsos telomēru garumus un hromosomu aberācijas, lai nodrošinātu dinamisku ģenētisko mainību un spētu izvairīties no pretvēža terapijām (*Anisimov 2003*), tomēr šādu audzēju ir relatīvi maz. *TERT* ekspresija raksturīga arī cilmes šūnām, it sevišķi embrionālajām šūnām, bet nelielos daudzumos arī pieaugušo MCŠ (*Serakinci et al. 2008*). HeLa šūnu līnijā *TERT* ekspresija bija ļoti izteikta, bet pārbaudītajās dermas kultūrās *TERT* ekspresija nebija detektēta nevienā no laika punktiem, kas varētu liecināt, ka pētāmās šūnas neveidotu audzēju *in vivo*. Rezultāti arī liecina, ka dotajos kultivēšanas apstākļos šūnas neuzsāk ar vecumu saistīto *TERT* reaktivāciju, kas literatūrā minēts, kā viens no raksturīgākajiem audzēju uzsākšanas iemesliem (*Anisimov 2003*). Serakinci norāda, ka, ja mezenhimālās šūnas ekspresē *TERT*, tad *in vitro* kultivēšanas ietekmē šī ekspresija strauji izzūd. Martinello un kolēģi (*Martinello et al. 2010*) uzsvēra, ka krioprezervācija var samazināt *TERT* ekspresiju. Darbā izmantotās kultūras tika ņemtas no trešā pārsējuma (darba bankas) un atkausētas pēc krioprezervācijas, kas izskaidro, kāpēc *TERT* ekspresija netika novērota arī agrīnā kultūrā (PD5). Ir pētījumi, kuri parāda MCŠ potenciālu uzsākt *TERT* ekspresiju īpašos apstākļos, piemēram, hipoksiskās (samazināts skābekļa daudzums) šūnu kultūrās, pie kam šāda ekspresija neveicina šūnu transformāciju, bet gan to iespējamā PD pieaugumu līdz pat 100 reizēm. Jautājums, vai *TERT* ekspresija *in vitro* pavairošanas laikā ir uzskatāma par nevēlamu *in vivo* pielietojumiem nav vienojīgi atbildēts. Iespējams, jauni pētījumi šajā jomā var pat norādīt uz īslaicīgas *TERT* ekspresija pozitīvo lomu šūnu pavairošanas procesa laikā. Tomēr pagaidām *TERT* ekspresija kultivēšanas laikā tiek uzskatīta par riska faktoru *in vivo* pielietojumiem.

#### **4.2. Ādas MCŠ diferenciacijas marķieru ekspresija ilgstošas *in vitro* pavairošanas laikā**

Novērtējot izmaiņas ilgtermiņa *in vitro* pavairošanas ietekmi uz šūnu kultūru iespējams aplūkot dažādos līmeņos – morfoloģiskās izmaiņas, virsmas marķieru ekspresiju, proteīnu sintēzi un sekrēciju, gēnu ekspresiju u.tml. Morfoloģiskas šūnas izmaiņas rodas būtisku ārēju un iekšēju faktoru ietekmē, kamēr neliela skaita gēnu ekspresijas izmaiņas var tikt izsauktas ar mazākiem stimuliem. Lai novērtētu ilgstošas kultivēšanas ietekmi uz gēnu ekspresiju,



imunomodulatorās īpašības, nākotnē būtu lietderīgi papildus analizēt arī citokīnu un augšanas faktoru ekspresiju.

### 4.3. Apoptozes līmeņa izmaiņas ādas MCŠ ilgstošas *in vitro* pavairošanas laikā

Šūnu daudzums, kas uzsākušas apoptozi var norādīt par apstākļiem šūnu kultūrā, piemēram novērtējot kaspāzes 8 signālceļa gēnu ekspresiju var spriest par ārējiem faktoriem, kas traucē šūnu fizioloģiskos procesus, bet kaspāzes 9 signālceļš ļauj gūt priekšstatu par sarežģījumiem šūnu iekšienē. Apoptoze šūnu kultūrā nav vienkārši (un lēti, ja metode nepieciešama intensīvam skrīningam) detektējama. Morfoloģiski lielākā daļa šūnu nemainās, tāpat arī neekspresē atšķirīgus proteīnus, ko varētu noteikt ar imunoloģiskām vai ķīmiskām metodēm. Tāpēc apoptozes uzsākšanos un līmeni vislabāk detektēt gēnu ekspresijas līmenī.

*Bax* un *Bcl-2* gēnu ekspresijas relatīvā attiecība demonstrē apoptozes uzsākšanos caur mitohondriju membrānu caurlaidības palielināšanu. Gadījumā, kad šī attiecība ir 2, šūnā pastāv balanss starp pro- un antiapoptotiskajiem proteīniem un apoptoze neuzsākas. Balansa skaitlis ir 2 tādēļ, ka *Bax* proapoptotiskais proteīns ir homodimērs, tātad viena proteīna sintēzei nepieciešami divi mRNS transkripti. Brīdī, kad proapoptotiskie proteīni tiek pastiprināti sintezēti, bet antiapoptotisko proteīnu ekspresija un sintēze tiek kavēta, minētā attiecība palielinās.

Maģistra darbā pētītajās dermas šūnu kultūrās *Bax/Bcl-2* relatīvā attiecība palielinājās pieaugot kultūras PD, bet HeLa šūnās tā bija 2,17. HeLa šūnas ir audzēja šūnas, kam viens no raksturojošiem faktoriem ir izvairīšanās no apoptozes, tāpēc šī attiecība bija neliela. Tomēr pavisam minimāli proapoptotiskais *Bax* tika ekspresēts vairāk, tātad neliela daļa HeLa šūnu tomēr uzsāk apoptozi. Arī literatūrā ir atrodami dati, ka neliela daļa audzēja šūnu var dabīgi uzsākt apoptozi (*Anisimov 2003*), kaut arī kultūra kopumā pret šo procesu ir inerta.

Dermas šūnās laikā pieaugošā *Bax/Bcl-2* relatīvā attiecība demonstrē, ka ilgstošā kultūrā pakāpeniski palielinās apoptozi uzsākošo vai predisponēto šūnu skaits. Šūnas noveco, zaudē telomērus un dabīgi uzsāk apoptozi. Laika gaitā šādu šūnu skaits palielinās. Atšķirībā no nekrozes apoptotiskas šūnas neveicina blakus šūnu apoptozi, bet tās varētu ietekmēt vides pH vai nevēlamu metabolītu daudzumu, kas savukārt var pastarpināti stimulēt apoptozes uzsākšanos. Jāpatur prātā, ka *Bax* un *Bcl-2* nav vienīgie iekšēji izraisītās apoptozes efektori – pastāv arī citas pro- un anti-apoptotiskas molekulas. Kaut gan *Bax* un *Bcl-2* ir galvenie efektori, literatūrā atrodamas ziņas, ka arī citas molekulas (*Bak*, *Bad*, *Bcl-X<sub>L</sub>* u.c.) var panākt līdzīgu efektu (*Gao et al. 2008*). Tāpēc maģistra darbā iegūtie rezultāti varētu būt precizējami.

Par labu izvēlētajai metodei liecina gan literatūras avoti (*Rogerio et al. 2006*, *Sheng et al. 2007*, *Ziolkowska-Seta et al. 2009*, *Liu et al. 2011*), gan eksperiments ar apoptozes līmeņa noteikšanu pēc seruma badināšanas. Šajā eksperimentā bez *Bax/Bcl-2* relatīvās attiecības tika noteikts arī apoptotisko ķermenīšu procents kultūrā. Apoptotisko ķermenīšu noteikšana ir semikvantitatīva, tomēr var sniegt priekšstatu par apoptozes tendenci atkarībā no noteikta

faktora (šajā gadījumā seruma daudzuma). Šajā darbā veiktajā salīdzinājumā apoptozes līmeņa pieaugums pēc *Bax/Bcl-2* relatīvās attiecības nav lineāri proporcionāls ploīditātes testā iegūtajam, tomēr tendence saglabājās. Apoptozes gēnu ekspresija raksturo ne tikai apoptozes uzsākšanos, bet arī predisponēto šūnu skaita pieaugumu, kamēr ploīditātes testā redzamas apoptozes izraisītās sekas, tādēļ arī atšķirības tendencēs. Ploīditātes tests arī demonstrēja, ka *Bax/Bcl-2* vērtībai 12,5 atbilst 2% apoptotisko ķermenīšu daudzums kultūrā. Tātad PD25, kur *Bax/Bcl-2* vērtība ir gandrīz 20, apoptotisko ķermenīšu daudzums varētu būt vismaz 3%, bet PD50 vēl lielāks.

Šūnas, kas uzsākušas apoptozi, vairs neatgriezīsies pirmsapoptotiskā stāvoklī. Tādēļ, ja lielu daļu kultūras aizņem apoptotiskas vai apoptozi uzsākušas šūnas, šāda kultūra nebūtu rekomendējama ievadīšanai *in vivo*, ja pielietojuma mērķis ir stimulēt audu reģenerāciju. No otras puses, nav izslēgts, ka apoptotisko šūnu klātbūtne var atstāt iespaidu MCSŠ *in vivo* pielietojumos kā imunomodulatoram. Tas norāda un nepieciešamību izveidot diferencietu marķieru paneli atkarībā no plānotajiem *ex vivo* pielietojuma veidiem.

Kopumā izvēlētā *Bax/Bcl-2* relatīvās attiecības metode uzskatāma par piemērotu apoptozes mērīšanai šūnu kultūrā un var palīdzēt novērtēt kultūras piemērotamību plānotajam pielietojumam (piemēram, klīniskajam pētījumam).

#### 4.4. Krioprezervācijas optimizācija

Ilgtermiņā strādājot ar šūnu kultūrām neizbēgami rodas arī vajadzība pēc ilgstošas to uzglabāšanas. Šajā ziņā krioprezervācija ir viena no plašāk izmantotajām ilgstošas uzglabāšanas metodēm. Metodei iespējamas dažādas modifikācijas un variācijas, kas var ietekmēt uzglabātā materiāla izdzīvotību pēc atsaldēšanas. Šajā maģistra darbā tika aplūkota kultūru blīvuma, sinhronizēšanas un saldēšanas šķīduma ietekme uz dermas šūnu izdzīvotību pēc atkausēšanas.

Atšķirības kultūras blīvuma ietekmē uz šūnu izdzīvotību pēc krioprezervācijas varētu būt skaidrojamas ar osmotiskā spiediena izraisītu šūnu bojāeju atkausēšanas laikā. Mazā kultūras blīvumā uz katru šūnu tiek izdarīts lielāks osmotiskais spiediens un krioprotektanta kaitīgās iezīmes var izpausties spilgtāk.

Sinhronizējot šūnas būtiska atšķirība izdzīvošanā netika novērota, tāpēc var uzskatīt, ka sinhronizēšana neatstāj pozitīvu iespaidu uz šūnu izdzīvotību pēc krioprezervācijas, kas nesakrīt ar literatūras datiem (*Stachecki and Cohen 2004, Paris et al. 2009*). Paris un kolēģi norāda, ka olnīcu šūnu krioprezervācijā sinhronizēšana atstāj nelielu, bet pozitīvu iespaidu. Tādēļ jāpatur prātā, ka kultūras sinhronizēšana panāk visas šūnās vienā cikla fāzē, tomēr tā bieži rada arī šūnu iekšējo stresu, kas rezultējas ar daļēju šūnu bojāeju. Eksperimentos izmantotā seruma badināšanas metode veicina arī programmēto šūnu nāvi, tādēļ iespējams, ka daļā sinhronizēto šūnu bija uzsākusies apoptoze, kas, iespējams, samazināja vidējo izdzīvotības rādītāju. Šūnas tika sinhronizētas 16 stundas, un tas varētu būt pietiekami

apoptozes uzsākšanai nelielā daļā šūnu. Lai šo iespēju pārbaudītu, būtu ieteicams atkārtot eksperimentu sinhronizējot šūnas ar citu, apoptozi neizraisošu metodi, piemēram, kavējot DNS sintēzi, jo šāda sinhronizēšana aptur šūnas S fāzē, kas palīdz saglabāt dzīvotspējīgas šūnas (Davis et al. 2001).

Saldēšanas šķīduma izvēle ir viens no kritiskākajiem faktoriem šūnu izdzīvotības nodrošināšanā pēc krioprezervācijas. Krioprotektanti pasargā šūnas no bīstamās ledus kristālu veidošanās, bet var būt arī kaitīgi savas metaboliskās aktivitātes vai toksiskās darbības dēļ. Vēl viens būtisks izdzīvotību veicinošs faktors ir seruma daudzums saldēšanas vidē. Serums ir šūnu primārā barības vielu rezerve atsaldēšanas laikā.

Būtiskas atšķirības saldēšanas šķīdumu izvēlē parādījās pēc sešu mēnešu krioprezervācijas. Šķīdumi, kas saturēja glicerīnu, nespēja nodrošināt pietiekami augstu šūnu izdzīvotību ilgtermiņā. Nedēļas un mēneša ietvaros šūnas, kas tika uzglabātas glicerīnu saturošos šķīdumos uzrādīja līdzīgu izdzīvotību ar šūnām DMSO saturošos šķīdumos, tātad sasaldēšanas laikā glicerīns un DMSO krioprotektanta funkcijas veic vienlīdz labi. Lielā starpība šūnu izdzīvotībā varētu būt saistīta ar glicerīna izraisīto augsto šķīduma viskozitāti. Literatūrā atrodams viedoklis (Morris et al. 2006), ka glicerīns nav piemērots pakāpeniskai saldēšanai, jo augstā šķīduma viskozitāte traucē ūdens molekulām laikus pārvietoties prom no šūnām, tādēļ sasaldēšanas brīdī daudz kristālu veidojas membrānās. Morris un kolēģi ierosina glicerīnu lietot straujās sasaldēšanas (*rapid freezing*) metodē, kur augstā viskozitāte palīdz veidot amorfas ūdens struktūras kristālisku vietā. Tomēr šī teorija neizskaidro, kāpēc pēc īsākas saldēšanas šūnu izdzīvotība bija augstāka. Cits skaidrojums varētu būt saistīts ar paraugu uzglabāšanas temperatūru. Eiropas farmakopeja iesaka, ka -80 °C temperatūrā šūnas uzglabājamās līdz trim mēnešiem, bet pēc tam pārvietojamas uz šķidro slāpekli. Šajā gadījumā šūnas visus sešus mēnešus tika uzglabātas -80 °C temperatūrā, tātad pārāk augstā temperatūra būtu vainojama pie izdzīvotības atšķirībām, bet arī šim skaidrojumam ir pretruna, jo DMSO saturošos šķīdumos, šūnas saglabāja augstu izdzīvotību arī pēc sešiem mēnešiem -80°C temperatūrā. Turklāt laboratorijas kolēģi ir atkausējuši paraugus pēc 3 gadu uzglabāšanas -80°C temperatūrā, un šo šūnu izdzīvotība ir bijusi augsta (vairāk kā 80%). No tā var secināt, ka kaut arī iemesli un mehānismi nav īsti skaidri, glicerīns ilgtermiņā nav piemērots krioprotektants dermas šūnu kultūrām.

Salīdzinot seruma un barotnes nozīmi šūnu izdzīvotībā, būtiskas atšķirības netika detektētas, tādēļ, ņemot vērā seruma lielās izmaksas, dermas mezenhimālo šūnu krioprezervācijā ieteicamais saldēšanas šķīdums ir šūnu barotne ar 10% DMSO piedevu. Gadījumos, kad saglabājamās šūnas ir ļoti vērtīgas (piemēram, primārās šūnu bankas šūnas), var lietot arī seruma un DMSO saldēšanas vidi.

## 5. SECINĀJUMI

1. Ādas MCŠ ir iespējams kultivēt līdz 50 populācijas dalīšanās reizēm, saglabājot normālu kariotipu.
2. Būtiskas variācijas starp individuālām MCŠ kultūrām diferenciācijas gēnu ekspresijas ziņā norāda uz jaunu kritēriju potenciālo donoru atlasē, tajā skaitā arī atkarībā no iespējamā šūnu pielietojuma.
3. *Bax/Bcl-2* gēnu ekspresijas relatīvā attiecība var tikt izmantota apoptozes līmeņa raksturošanai un par objektīvu rādītāju *in vitro* ilgtermiņa pavairošanas izraisītām izmaiņām MCŠ kultūrās.
4. Glicerīns nav piemērots krioprotektants dermas MCŠ kultūru ilgtermiņa uzglabāšanai.

## **6. PATEICĪBAS**

Autors izsaka pateicību darba vadītājam Dr. biol. Jānim Ancānam par sniegtajiem norādījumiem maģistra darba organizēšanā un izstrādē, Dr. biol. Inesei Čakstiņai par norādījumiem darba teorētiskās un praktiskās daļas izstrādē, kā arī LU Bioanalītisko un biodozimetrisko metožu laboratorijas personālam par konsultatīvu palīdzību darba izstrādes laikā.

Maģistra darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta „Kapacitātes stiprināšana starpnozarū pētījumos biodrošībā” (Nr.2009/0224/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/055) atbalstu.

## 7. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Afanasyev BV, Elstner EE, Zander AR (2009) – A.J. Friedenstein: founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular Therapy and Transplantation Vol1*, p35-38
2. Akter H, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T (2008) – Perilipin, a critical regulator of fat storage and breakdown, is a target gene of estrogen receptor-related receptor  $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Communications Vol368*, p563-568
3. Anisimov VN (2003) – The relationship between aging and carcinogenesis: a critical appraisal. *Critical reviews in Oncology/Hematology Vol45*, p277-304
4. Arthur A, Zannettino A, Panagapoulos R, Koblar SA, Sims NA, Stylianou C, Matsuo K, Gronthos S (2011) - EphB/ephrin-B interactions mediate human MSC attachment, migration and osteochondral differentiation. *Bone Vol48*, p533-542
5. Bao Q, Shi Y (2007) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Diff Vol14*, p56-65
6. Baust JM, Buskirk R, Baust JG (2002) - Modulation of the cryopreservation cap: elevated survival with reduced dimethyl sulfoxide concentration. *Cryobiology Vol45*, p97 - 108
7. Bernardo MS, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F (2007) – Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Transformation After Long-term In Vitro Culture and Do Not Exhibit Telomere Maintenance Mechanisms. *Cancer Research Vol67*, p9142-9149
8. Blanpain C, Fuchs E (2006) – Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol Vol22*, p 339–373
9. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006) - Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol Vol17*: 14
10. Brasaemle DL, Subramanian V, Garcia A, Marcinkiewicz A, Rothenberg A (2009) - Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Mol Cellular Biochem Vol326*, p15–21
11. Brekkan RA, Sage EH (2001) - SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell–matrix communication. *Matrix Biol Vol19*, p816–827
12. Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca JE (2007) Osteoblasts and bone formation. *Acta reumatologica portuguesa Vol32*, p103-110

13. Choumerianou DM, Dimitriou H, Perdikogianni C, Martimianaki G, Riminucci M, Kalmanti M (2008) - Study of oncogenic transformation in in vitro expanded mesenchymal cells, from paediatric bone marrow. *Cell Proliferation Vol41*, p909–922
14. Davis PK, Ho A, Dowdy SF (2001) - Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *BioTechniques Vol30*, p1322–1331
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) - Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy Vol8*, p315-317
16. Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000) - The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science Vol289*, p1501-1504
17. Eames BF, Sharpe PT, Helms JA (2004) – Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by Sox9 and Runx2. *Developmental biology Vol274*, p188-200
18. European Medicines Agency. Committee of Advanced Therapies (CAT) and the CAT Scientific Secretariat (2010) – Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. *Nature Reviews. Drug Discovery Vol9*, p195-201
19. Ferron M, McKee MD, Levine, RL, Ducy P, Karsenty G (2011) – Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone* (accepted 19.04.2011., article in press)
20. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D (2009) – Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells, Tissues, Organs Vol189*, p144-152
21. Fulda S, Debatin KM (2006) – Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene Vol25*, p4798-4811
22. Gao M, Zhang WC, Liu QS, Hu JJ, Liu GT, Du GH (2008) – Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis via decrease of Bax/Bcl-2 ratio. *European Journal of Pharmacology Vol591*, p73-79
23. Ge D, Liu X, Li L, Wu J, Tu Q, Shi Y, Chen H (2009) - Chemical and physical stimuli induce cardiomyocyte differentiation from stem cells. *Biochem Biophys Res Communications Vol381*, p317-321
24. Ghali O, Chauveau C, Lencel P, Salomez R, Hani K, Hardouin P, Broux O, Devedjian JC (2010) - RUNX2 regulates the effects of TNF $\alpha$  on proliferation and apoptosis in SaOs-2 cells. *Bone Vol46*, 901-910
25. Gronthos S, Chen S, Wang CY, Robey PG, Shi S (2003) – Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, Osterix and Osteocalcin. *Journal of Bone and Mineral Research Vol18*, p716-722

26. Guan H, Zhao Z, He F, Zhou Q, Meng Q, Zhu X, Zheng Z, Hu D, Chen B (2007) - The effects of different thawing temperatures on morphology and collagen metabolism of – 20°C dealt normal human fibroblast. *Cryobiology Vol55*, p52-59
27. Guan L, Yu J, Zhong L, Huang B, Luo T, Zhang M, Lin S, Li W, Ge J, Chen X, Liu Q, Zeng MZ (2010) – Biological safety of human skin-derived stem cells after long-term in vitro culture. *J Tissue Eng Regen Med Vol5*, p97-103
28. Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda M, Carvajal SU, Ortega MET (2009) - Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology Vol58*, p287-292
29. Halata Z, Grim M, Bauman KI (2002) - Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: Review and new results. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Mol, Cell, and Evol Biology Vol271*, p225-239
30. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, Farber NB (2009) - Dimethyl sulfoxide provides widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of Disease Vol34*, p1-10
31. Harada S, Rodan GA (2003) - Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature Vol423*, p349-355
32. Hasegawa H, Naito I, Nakano K, Momota R, Nishida K, Taguchi T, Sado Y, Ninomija Y, Ohtsuka A (2007) - The distributions of type IV collagen  $\alpha$  chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages. *Archives of Histology and Cytology Vol70*, p255-265
33. Hoogduijn M, Gorjup E, Genevet PG (2006) – Comparative characterization of hair follicle dermal stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells and development Vol15*, p 49-60
34. Hu S, Chen S, Li X, Qin R, Mei Z (2007) – Antitumor effects of Chi-Shen extract from *Salvia miltiorrhiza* and *Paeoniae radix* on human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin Vol28*, p1215-1223
35. Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, Shiota M, Kesterson RA, Kahn BB, Magnuson MA (2005) - Deletion of PPAR $\gamma$  in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol102*, p6207–6212
36. Kaplan DH, Li MO, Jenison MC, Shlomchik WD, Flavell RA, Shlomchik MJ (2007) - Autocrine/paracrine TGF $\beta$ 1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine Vol204*, p2545-2552

37. Karsenty G (2003) - The complexities of skeletal biology. *Nature* Vol423, p316-318.
38. Kiechle FL, Zhang X (2002) – Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta* Vol326, p27-45
39. Kim S, Honmou O, Kato K, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD (2006) - Neural differentiation potential of peripheral blood and bone marrow derived precursor cells. *Brain research* Vol1123, p27-33
40. Kou I, Ikegawa S (2004) – Sox9-dependant and independant transcriptional regulation of human cartilage link protein. *J Biol Chemistry* Vol279, p50942-50948
41. Krane SM (2005) Identifying genes that regulate bone remodeling as potential therapeutic targets. *J Exp Med* Vol201, p841-843
42. Kuppers M, Faust D, Linz B, Dietrich C (2011) - Regulation of ERK1/2 activity upon contact inhibition in fibroblasts. *Biochem Biophys Res Communication* Vol408, p483-487
43. Lallemand Y, Bensoussan V, Cloment CS, Robert B (2009) – Msx genes are important apoptosis effectors in downstream Shh/gli3 pathway in the limb. *Dev Biology* Vol331, p189-198
44. Lambertini E, Penolazzi L, Tavanti E, Schincaglia GP, Zennaro M, Gambari R, Piva R (2007) – Human estrogen receptor alpha is a target of Runx2 transcription factor in osteoblasts. *Exp. Cell Research* Vol313, p1548-1560
45. Lee JS, Lee JM, Im GI (2011) – Electroporation-mediated transfer of RUNX2 and Osterix genes to enhance osteogenesis of adipose stem cells. *Biomaterials* Vol32, p760-768
46. Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM (2003) – BMP2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Communications* Vol309, p689-694
47. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Karsenty G (2007) - Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* Vol130, p456-469
48. Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP (2011) – Bcl-2 proteins and mitochondria – Specificity in membrane targeting for death. *Biochimica et Biophysica Acta* Vol1813, p532-539
49. Liu N, Zheng Y, Zhu Y, Xiong S, Chu, Y (2011) - Selective Impairment of CD4+ CD25+ Foxp3+ Regulatory T cells by paclitaxel is explained by Bcl-2/Bax mediated apoptosis. *International Immunopharmacology* Vol11, p212-219

50. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) – Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta T}$  method. *Methods* Vol25, p 402-408
51. Londono-Vallejo JA (2008) – Telomere instability and cancer. *Biochimie* Vol90, p73-82
52. Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Siegmund M, Bader A (2008) – Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Experimental Dermatology* Vol14, p925-932
53. Mackie EJ (2003) - Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* Vol35, p1301-1305.
54. Macville M, Schrock E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D, Pospescu N, Ried T (1999) - Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* Vol59, p141-150
55. Makita N, Suzuki M, Asami S, Takahata R, Kohzaki D, Kobayashi S, Hakamazuka T, Hozumi N (2008) - Two of four alternatively spliced isoforms of RUNX2 control osteocalcin gene expression in human osteoblast cells. *Gene* Vol413, p8-17
56. Martin P (1997) - Wound healing - Aiming for perfect skin regeneration. *Science* Vol276, p75-81
57. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaolesi M, Mascarello F, Decaminada M, Patruno M (2010) – Canine adipose-derived mesenchymal stem cells do not lose their stem features after a long-term cryopreservation. *Research in Veterinary Science* (Accepted 28.07.2010., article in press).
58. Matsuguchi T, Chiba N, Bandow K, Kakimoto K, Masuda A, Ohnishi T (2009). "JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation". *Journal of Bone and Mineral Research* Vol24, p398–410
59. Mazur P, Cole KW (1985) - Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes, *Cryobiology* Vol22, p509–536
60. Mazur P, Cole KW (1989) - Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes, *Cryobiology* Vol26, p1–29
61. Meyer W, Schwarz R, Neurand K (1978) - The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Current Problems in Dermatology* Vol7, p39-52
62. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK,

- Spiegelman BM, Staels B, Wahli W (2006) - International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev Vol58*, p726–741
63. Morasso MI, Tomic-Canic M (2005) Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Cell Biology Vol97*, 173-183
64. Morris GJ, Goodrich M, Acton E, Fonseca F (2006) - The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. *Cryobiology Vol52*, p323-334
65. Nakashima K, Zhou X, Kunkel K, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2002) - The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell Vol108*, p17–29
66. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KSR, Chase L, Lakshmiathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V (2008) - PDGF, TGF- $\beta$ , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood Vol112*, p 295-307
67. Nishio Y, Dong Y, Paris M, O’Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H (2006) – RUNX2-mediated regulation of zincfinger Osterix/Sp7 gene. *Gene Vol372*, p62-70
68. Olovnikov AM (1996) – Telomeres, telomerase and ageing: origin of the theory. *Exp. Gerontology Vol31*, p 443-448
69. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy, P, Karsenty G (2011) - Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell Vol144*, p796–809
70. Pagán OR, Rowlands AL, Urban KR (2006) - Toxicity and behavioral effects of dimethylsulfoxide in planaria. *Neuroscience Letters Vol407*, p274-278
71. Pan SH, Tai CC, Lin CS, Hsu WB, Chou SF, Lai CC, Chen JY, Tien HF, Lee FY, Wang WB (2009) – Epstein Barr virus nuclear antigen 2 disrupts mitotic checkpoint and causes chromosomal instability. *Carcinogenesis Vol30*, p366-375
72. Paris MCJ, Andersen CY, Shaw JM (2009) – Ovarian cryopreservation and grafting: its potential for human reproductive biology and animal conservation. *Animal reproduction Vol6*, p96-113
73. Philippi C, Loretz B, Schaefer UF, Lehr CM (2010) – Telomerase as an emerging target to fight cancer – Opportunities and challenges for nanomedicine. *Journal of controlled release Vol146*, p228-240

74. Piasecki BP, Diller KR, Brand JJ (2009) – Cryopreservation of *Chlamidomonas reinhardtii*: a cause of low viability at high cell density. *Cryobiology* Vol58, p103-109
75. Presland RB, Jurevic RJ (2002) - Making sense of the epithelial barrier: What molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *Journal of Dental Education* Vol66, p564-574
76. Provot S, Schipani E (2005) - Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem. Biophys. Res. Commun* Vol328, p658–665’
77. Rasul Z, Ahmed N, Anzar M (2007) - Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology* Vol68, p813 – 819
78. Reddel RR (1999) - A reassessment of the telomere hypothesis of senescence. *Bioessays* Vol20, p977-984
79. Riekstina U, Muceniece R, Cakstina I, Muiznieks I, Ancans J (2008) – Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology* Vol58, p 153-162
80. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J (2009) - Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem cell review* Vol5, p378-386
81. Rogerio F, Jordao Jr. H, Scwambach-Vieira A, Maria, CJJ, de Rezenade ACS, Guimaraes-Pereira GA, Langone F (2006) - Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment. *Brain research* Vol 1112, p80-90
82. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E (2006) - The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin. Endocrinol.* Vol 64, p355–365
83. Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lonning PE, Bjerkvig R, Schichor C (2009) – Long-term Cultures of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Frequently Undergo Spontaneous Malignant Transformation. *Cancer Research* Vol69, p5331-5339
84. Rotllant J, Liu D, Yan YL, Poslethwait JH, Westerfield M, Du SJ (2008) – Sparc functions in morphogenesis of the pharyngeal skeleton and inner ear. *Matrix biology* Vol27, p561-572
85. Sachdeva N (2009) - Analysis of the Viability of Umbilical Cord Blood Stem Cells. *J. Stem Cells and Regen Med* Vol5, p44-48

86. Sarceviča D (2010) - Dažādu krioprezervācijaš metožu salīdzinājums no dermas un epidermas izdalītu šūnu kultūrās. Bakalaura darbs. Rīga, Latvijas Universitātes, 45lpp
87. Schamberger CJ, Gerner C, Cerni C (2005) – Caspase-9 plays a marginal role in serum starvation-induced apoptosis. *Experimental Cellular Research Vol302*, p115-128
88. Sekaran VG, Soares J, Jarstfer MB (2010) – Structures of telomerase subunits provide functional insights. *Biochim Biophys Acta Vol1804*, p 1190-1201
89. Sekiya L, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M (2000) - SOX9 enhances Aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J. Biol. Chem. Vol275*, p10738– 10744
90. Serakinci N, Graakjaer J, Kolvraa S (2008) – Telomere stability and telomerase in mesenchymal stem cells. *Biochimie Vol90*, p33-40
91. Sikora E, Arendt T, Bennet M, Narita M (2011) – Impact of Cellular Senescence Signature on Ageing Research. *Ageing Research Reviews Vol10*, p 146-152
92. Smondyrev AM, Berkowitz ML (1999) - Molecular dynamics simulation of DPPC bilayer in DMSO. *Biophysical Journal Vol76*, p2472-2478
93. Stachecki JJ, Cohen J (2004) -An overview of oocyte cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Vol9*, p152-163
94. Stains JP, Civitelli R (2003) - Genomic approaches to identifying transcriptional regulators of osteoblast differentiation. *Genome Biol Vol4*, p222
95. Szmant HH (1975) - Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. *Ann NY Acad Sci Vol243*, p20-23
96. Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, Ohtani A, Morita K, Hirano T, Terai M, Umezawa A, Mizusawa H (2007) – Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalised with human pailloma virus E6, E7 and hTERT genes. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Animal Vol43*, p 129-138
97. Tan GD, Goosens GH, Humpreys S M, Vidal H, Karpe F (2004) - Upper and lower body adipose tissue function: a direct comparison of fat mobilization in humans. *Obesity Research Vol12*, p114-118
98. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Foillard L, Becker M, Mossafa H, Tchirkov A, Rouard H, Henry C, Splingard M, Dulong J, Monnier D, Gourmelon P, Gorin NC, Sensebe L (2010) – Clinical-grade production of mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood Vol115*, p1549-1553

99. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV (2010) - Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in serum-free freezing medium. *J. Tissue Eng Regen Med Vol4*, p224-232
100. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD (2005) – Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem cells Vol23*, p 727-737
101. Toulza E, Mattiuzza NR, Galliano MF, Jonca N, Donnat C, Jacob D, de Daruvar A, Wincker P, Serre G, Guenin M (2007) - Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biology Vol8*, p1-23
102. Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E (1999) - Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *The Poultry Science Vol78*, p586-590
103. Tsuchiya H, Kitoh H, Sugiora F, Ishiguro N (2003) – Chondrogenesis enhanced by overexpression of Sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Communication Vol301*, p338-343
104. Vardaxis NJ, Brans TA, Boon ME, Kreis RW, Marres LM (1997) – Confocal laser scanning of porcine skin: implications for human wound healing studies. *Journal of Anatomy Vol190*, p 601-611
105. Volanakis JE, Narayana SV (1996) - Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Science Vol5*, p553–564
106. Vondracek J, Soucek K, Sheard MA, Chramostova K, Andrysik Z, Hofmanova J, Kozubik A (2006) – Dimethyl sulphoxide potentiates death receptro-mediated apoptosis in the human myeloid leukemia U937 cell line through enchancement of mitochondrial membrane depolarization. *Leukemia Research Vol30*, p81-89
107. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD (2008) - Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS ONE Vol3*, p1-12
108. Watt FM, Lo Celso C, Silva-Vargas V (2006) – Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev Vol16*, p 518–524
109. Wiren K, Toombs AR, Semirale AA, Zhang X (2006) - Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: Requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *Bone Vol38*, p637-651
110. Yamashita S, Andoh M, Ueno-Kudoh H, Sato T, Miyaki S, Asahara H (2009) – Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress RUNX2 in chondrocytes. *Experimental Cell Research Vol315*, p2231-2240

111. Yu BD, Anandaroop M, Wong C (2008) - Skin and hair: models for exploring organ regeneration. *Human Molecular Genetics* Vol17, p54-59
112. Ziolkowska-Seta I, Madry R, Kraszewska E, Szymanska T, Timorek A, Rembiszewska A, Kupryjanczyk J (2009) – TP53, BCL-2 and BAX analysis in 199 ovarian cancer patients treated with taxane-platinum regimens. *Gynecologic Oncology* Vol112, p179-184

Maģistra darbs „Cilvēka dermas mezenhimālo šūnu ilgtermiņa kultūru raksturošana un ilgtermiņa uzglabāšanas optimizācija” izstrādāts Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Bioanalītisko un biodozimetrisko metožu laboratorijā.

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

Autors: Jānis Kungs

03.06.2011.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. biol. Jānis Ancāns

03.06.2011.

Recenzents: doc., dr. biol. Vizma Nikolajeva

Darbs iesniegts Mikrobioloģijas un biotehnoloģiju katedrā

03.06.2011.

Metodiķe: Dzintra Zaļā

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

09.06.2011. prot. Nr. , vērtējums

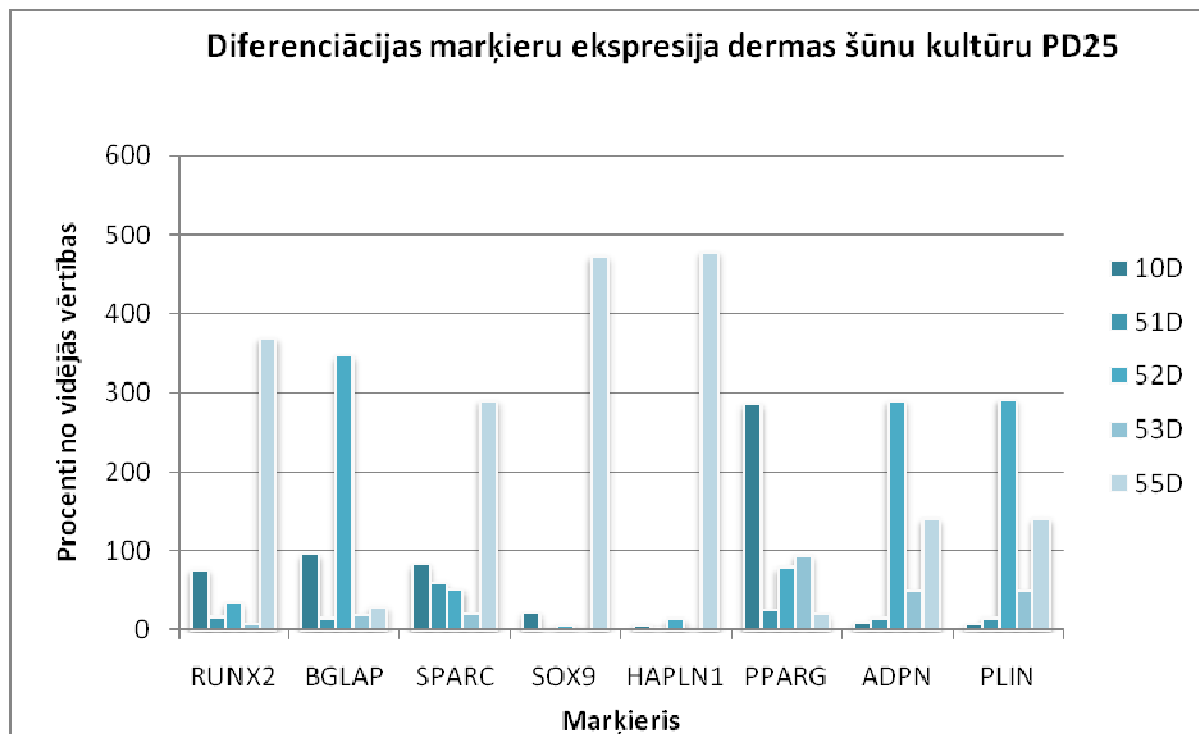
Komisijas sekretāre:

## **PIELIKUMS**

Atšķirības marķieru gēnu ekspresijā starp ādas šūnu kultūrām pēc 25 dalīšanās reizēm

Appendix 1

Differences in marker gene expression between dermal cell cultures after 25 doublings



Atšķirības marķieru gēnu ekspresijā starp ādas šūnu kultūrām pēc 50 dalīšanās reizēm

Appendix 2

Differences in marker gene expression between dermal cell cultures after 50 doublings

