

## Hroniskas hipoksijas ietekme uz krūts vēža šūnu līniju augšanu un morfoloģiju

Valdis Pirsko, Marta Priedīte, Inese Čakstiņa, Rasma Dortāne,  
Linda Feldmane, Zanda Daneberga, Edvīns Miklaševičs

Rīgas Stradiņa universitāte, Onkoloģijas institūts, Latvija

**Ievads.** Pacientēm ar krūts vēzi primārā audzēja reģioni ar samazinātu skābekļa daudzumu konstatēti 25–40 % gadījumā. Ļaundabīgo audzēju hipoksija sākotnēji tika saistīta ar rezistenci pret staru terapiju un ķīmijterapijas līdzekļiem. Turpmākos pētījumos pierādīts, ka hipoksija veicina angioģenēzi un audzēja invāziju un ir saistīta ar agresīvāku slimības norisi. Hipoksija tikusi saistīta arī ar vēža šūnu genomiskās nestabilitātes pastiprināšanos. Viena no genomiskās nestabilitātes formām ir aneiploidija, ko vēža šūnu līnijās var novērot arī kā daudzkodolainu šūnu veidošanos.

**Darba mērķis, materiāls un metodes.** Noteikt hroniskas hipoksijas ietekmi uz trīs krūts dziedzera vēža līniju – MDA-MB-436 (bazālais, zemas klaidina ekspresijas krūts vēzis, *BRCA1* mutācija), MDA-MB-231 (bazālais krūts vēzis) un SK-BR-3 (HER2 pārekspressijas krūts vēzis) – augšanu un šūnu morfoloģiju, kā arī daudzkodolainu šūnu veidošanos šūnu populācijās. Katras šūnu līnijas trīs pārsējumi tika kultivēti hipoksijā (2,0 % O<sub>2</sub>) un normoksijā (19,55 % O<sub>2</sub>; kontroles grupa) trīs atkārtojumos. Šūnas regulāri tika monitorētas fāžu kontrasta mikroskopā (*Leica*), lai reģistrētu kultūras konfluenci un morfoloģiju. Pēc 70–80 % konfluences sasniegšanas kultūra tika pārsēta. Pēc trešā pārsējuma katra kultūra tika uzsēta uz 96 lauciņu mikroplates lielā blīvumā; mikroplates tika fiksētas, permeabilizētas un iezīmētas ar antivielu pret tubulīnu (citoplazmas iezīme) un DAPI (kodola iezīme). Šūnu populācijas tika vizualizētas šūnu attēlieguves sistēmā *InCell Analyzer 2200*. Attēlanalīze tika veikta ar *InCell Investigator*; šūnu populācijās noteikti morfometriskie parametri, kodolu un kodoliņu skaits, kā arī DAPI iezīmes intensitāte.

**Rezultāti.** Hipoksijas ietekmē statistiski nozīmīgi samazinājās proliferācijas ātrums visās pētītajās šūnu līnijās, par ko liecināja vienas kultūras visu pārsējumu augšanas ātruma vidējo raksturlielumu salīdzinājums. Šūnu dalīšanās vidējais ilgums MDA-MB-436, MDA-MB-231 un SK-BR-3 šūnu populācijās vidēji palielinājās par attiecīgi 2,36 ( $p < 0,01$ ), 1,55 ( $p < 0,05$ ) un 5,39 dienām ( $p < 0,01$ ). Salīdzinājumā ar normoksiju MDA-MB-231 un SK-BR-3 samazinājās kopējais populācijas dubultošānās līmenis (vidēji par attiecīgi 1,43 un 1,82;  $p < 0,01$ ), savukārt MDA-MB-436 kopējā proliferācija normoksijā un hipoksijā statistiski nozīmīgi neatšķīrās. Salīdzinājumā ar normoksiju SK-BR-3 šūnām statistiski nozīmīgi samazinājās dzīvotspēja (par 7,11 %,  $p < 0,05$ ). MDA-MB-436 un MDA-MB-231 līniju dzīvotspēja normoksijā un hipoksijā būtiski neatšķīrās.

Hroniska hipoksija ietekmēja pētīto šūnu līniju morfoloģiju. Visvājāk diferencēto MDA-MB-436 šūnu kultūrā bija vairāk pumpurotu izaugumu uz šūnas diegveida ķermeņa un vairāk adherentu šūnu. Bazālā tipa MDA-MB-231 populācija saturēja vairāk lielizmēra daudzkodolainu šūnu, populācijā pastiprināti veidojās mezenhimālas (vārpstveida) šūnas. Visizteiktāk mainījās SK-BR-3 morfoloģija – kultūra zaudēja epiteliālas iezīmes (poligonālas, bruģveida, salīdzinoši cieši un grupās augošanas šūnas), kļuva mezenhimāla (neregulāras, vārpstveida šūnas), populācijā palielinājās daudzkodolaino šūnu skaits.

### Secinājumi.

1. Pētītajās šūnu līnijās hroniska hipoksija palielina šūnas cikla ilgumu un samazina proliferācijas spēju.
2. Hroniskas hipoksijas ietekmē diferencētāko šūnu kultūrās radās mezenhimālas iezīmes.
3. Hroniskas hipoksijas ietekmē pētītajās šūnu līnijās pastiprinājās aneiploīdu šūnu veidošanās.
4. Pētītajās šūnu līnijās hroniskas hipoksijas ietekme bija izteiktāka sākotnēji diferencētākās šūnās.

*Pētījums izstrādāts Valsts pētījumu programmas BIOMEDICINE 2014–2017 projektā Nr. 5.5. "Personalizēta vēža diagnostika un terapijas efektivitātes noteikšana".*