

Skolēnu zinātniski pētniecisko darbu bioloģijā, ķīmijā, fizikā, astronomijā inženierzinātnēs, vides zinātnē, ģeogrāfijā un zemes zinātnē struktūra un noformējums

Skolēna zinātniski pētnieciskais darbs (turpmāk – ZPD) ir skolēna patstāvīgi veikts pētījums, kas apliecina viņa teorētisko, praktisko un metodisko iemaņu apguvi kādā no dabas zinātņu nozarēm.

Katrā ZPD jābūt šādām daļām:

- Titullapa
- Abstrakts (latviešu valodā un vienā no svešvalodām (vēlams angļu valodā))
- Saīsinājumi (ja šāda sadaļa ir nepieciešama)
- Satura rādītājs
- Ievads (bez cita īpaša nosaukuma un bez kārtas numura)
- Literatūras apskats (ar šādu nosaukumu ar kārtas numuru 1. Apakšnodaļas tiek numurētas kā 1.1.; 1.2. utt.)
- Materiāli un metodes (ar šādu nosaukumu ar kārtas numuru 2. Apakšnodaļa Materiāli tiek numurēta kā 2.1. un, ja nepieciešamas vēl papildus apakšnodaļas, tad numurē 2.1.2.utt. Apakšnodaļa Metodes tiek numurēta kā 2.2., kur katru metodes aprakstu nosauc un numurē kā 2.2.1., 2.2.2. utt.)
- Rezultāti un to analīze (ar šādu nosaukumu ar kārtas numuru 3. Apakšnodaļas numurē kā 3.1., 3.2. utt.)
- Secinājumi (ar šādu nosaukumu ar kārtas numuru 4. Secinājumus numurē kā 1., 2., 3. utt.)
- Literatūras saraksts (ar šādu nosaukumu ar kārtas numuru 5.)
- Pielikumi (ja tādi ir nepieciešami. Pielikumu, kā sadaļu, nenumurē)
- Parasti zinātnisko darbu raksta pagātnes formas ciešamajā kārtā.
- Nodaļas parasti neiesāk un nepabeidz ar attēliem vai grafikiem, pirms un pēc tiem parasti seko teksts.
- Darba hipotēzei (ja tāda ir), mērķim, uzdevumiem, rezultātiem un secinājumiem JĀBŪT savstarpēji loģiski saistītiem.

Turpinājumā seko zinātniski pētnieciskā darba daļas un to apraksti ar piemēriem.

Veiksmi darbos!

Dr.biol.I.Čakstiņa

Skolas nosaukums

Darba nosaukums

Skolēna zinātniski pētnieciskais darbs ...sekcijas nosaukums....

Darba autors(-i):

Darba vadītājs:

Darba konsultants (ja tāds ir):.....

Vieta un gads

ABSTRAKTS

- sadaļas mērķis ir sniegt īsu un koncentrētu priekšstatu par darbu;
- atspoguļo pētījuma būtību (kāpēc pētījums veikts, un šeit neder atbilde „jo mani interesē...”), mērķi, īsumā metodiku, galvenos rezultātus un galveno secinājumu;
- rezultātu nozīmīgums tiek uzrādīts pašās beigās

Papildu informācijā iekļauj laika periodu un vietu/iestādi, kurā darbs ir veikts;

- abstrakts ir 1/2 lapaspuse teksta;
- šī lapaspuse ir bez numura. Šo un pārējās lpp. līdz Saturam bez numura var dabūt, tās printējot atsevišķi, bet sekojošās daļas, veidojot kā vienu kopēju dokumentu un uzliekot lapaspušu numerāciju, norādīt, ka tā sākas no 5.lpp.

Piemērs:

Šūnu kultivēšana, ar mērķi tās pavairot, ir plaši izmantota pētījumu metode dažādās bioloģijas apakšnozarēs. Svarīgs komponents ir piemērotas augšanas vides izvēle, lai veidotu optimālus apstākļus *in vitro*. Darba mērķis bija salīdzināt dažādas vides keratinocītu kultivēšanas optimizācijai.

Kultivējot primāros un komerciāli pieejamos keratinocītus dažādās vidēs, tika salīdzināta morfoloģija un noteikts populācijas dubultošanās laiks (PDT). Šūnu morfoloģija vizuāli neatšķīrās. Šūnu skaits tika noteikts izmantojot divas metodes: manuāli – hemocitometrs, un automatizēti – *Countess (Invitrogen)*. Abām keratinocītu līnijām PDT bija īsāks KB (*firma1*) vidē. Šī KB vide ir labāk piemērota keratinocītu šūnu kultivēšanai nekā EL (*firma2*). Pētījuma rezultātā tika noteikta labākā vide šūnu kultivēšanai.

Darbs izstrādāts *vieta no ... laiks līdz... laiks*.

Atslēgvārdi: keratinocīti, kultivēšanas vides, šūnu skaita noteikšana, populācijas dubultošanās laiks.

ABSTRACT

Piemērs:

Cell culturing is a widely used method in life sciences. It is important to choose appropriate cell culturing media to create optimal circumstances for the cells *in vitro*. The aim of the work was to compare different media for keratinocyte culturing optimization.

Primary keratinocyte cell line and commercially available keratinocytes were used and cultured in different media, their morphology was compared and the population doubling time (PDT) was determined. There was no difference in cultured cell morphology. Two methods were used to define the number of cells: manually with hemocytometer and automatized with *Countess (company2)*. Population doubling time for both cell lines was shorter in KB media. It was discovered that the most suitable media was Keratinocyte Basal Media 2 with supplements (KB) (*company 11*). The results show the best media for keratinocyte cultivation.

This work was developed in *place* from ... *time*... till ... *time*.

Key words: keratinocytes, cell cultivation media, defining the number of cells, population doubling time.

The title of the work: Keratinocyte expansion in Different Culture Media

SAĪSINĀJUMI

- nepieciešami tad, ja darbā ir daudz svešvārdu, kuri būtu jāsaīsina;
- nepieciešami, lai atvieglotu darba lasīšanu;
- raksta stabiņā, kura kreisajā pusē ir saīsinājums, bet labajā – skaidrojums latviešu valodā un, ja nepieciešams, angļu valodā;
- saīsinājumu saraksts jākārtē alfabēta secībā.

Piemērs:

μl	mikrolitri
3T3	barojošo šūnu slānim izmantotā peļu transficēto šūnu līnija (<i>mouse transfected feeder layer</i>)
CaFD	kalcija glukonāts + 10% FBS/DMEM
cm	centimetri
DMEM	Dulbeko modificētā Īgla vide (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	dimetilsulfoksīds
EDGS	<i>Epi Life</i> (epidermālo šūnu kultivēšanas vide) definētā augšanas piedeva (<i>Epi Life Defined Growth Supplement</i>)
EDTA	etilēndiamīntetraetiķskābe
EL	epidermālo šūnu vide (<i>EpiLife+EDGS</i>)
FBS	fetālais teļa serums (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
h	stundas
KB	keratinocītu bazālā vide (<i>Keratinocyte Basal Medium 2 with supplements</i>)
min	minūtes
ml	mililitri
mm	milimetri
mM	milimolārs
NHEK	cilvēka normālas epidermas keratinocīti (<i>Normal Human Epidermal Keratinocytes</i>)
PSKUS	Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca
PBS	fosfāta buferis (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDT	populācijas dubultošanās laiks (<i>Population Doubling Time</i>)
pH	ūdeņraža potenciāls (<i>potential of Hydrogen</i>)
PK	cilvēka ādas primāro keratinocītu līnija
rpm	apgriezieni minūtē (<i>rounds per minute</i>)
V	tilpums

SATURS

Piemērs:

IEVADS	5
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	6
1.1. APAKŠNODAĻAS NOSAUKUMS.....	6
1.2. APAKŠNODAĻAS NOSAUKUMS.....	8
2. MATERIĀLI UN METODES.....	14
2.1. MATERIĀLI.....	14
2.2. METODES.....	17
3. REZULTĀTI UN ANALĪZE.....	21
3.1. APAKŠNODAĻAS NOSAUKUMS.....	21
3.2. APAKŠNODAĻAS NOSAUKUMS.....	24
4. SECINĀJUMI.....	28
5. LITERATŪRAS SARAKSTS.....	29
6. PATEICĪBAS (var arī nebūt).....	31
PIELIKUMI	

IEVADS

- ievadam nav īpašs nosaukums;
- īss apraksts par darbā pētāmo problēmu un tās iespējamiem risinājumiem. Pamato temata izvēli, aktualitāti un vajadzību vai nu sabiedrībai, vai zinātnes attīstībai;
- noslēgumā tiek izvirzīts/formulēts darba mērķis, kura sasniegšanai tiek izvirzīti darba uzdevumi;
- uzdevumus ieteicams veidot tā, lai katram uzdevumam pretim būtu liekams reāls darbā sasniegts rezultāts, no kura tad arī varēs veikt secinājumu;
- “iepazīšanās ar literatūru” **NAV** darba uzdevums;
- darba mērķi un darba uzdevumus raksta bieziem burtiem (BOLD)
- apjoms 1-2 lpp.

Piemērs:

Šūnu kultūras dod alternatīvu pieeju apskatīt ķermeņa reakciju uz svešām vielām, kuras ir ievadītas ķermenī, kā, piemēram, medikamentus, implantus un diagnosticējošas vielas. Tas dod lielu priekšrocību izvēlēties pareizo šūnu ar ko notiks mijiedarbību. Lai šādus eksperimentus varētu veikt, jānodrošina labvēlīgāka vide šūnu augšanai.

Eikariotu šūnas kultivē un izmanto gan fundamentālos, gan lietišķos pētījumos, kas saistīti ar, piemēram, gēnu terapiju izstrādi, vēža izpēti, vakcīnu un jaunu zāļu izveidi un uzlabošanu, rekombinanto proteīnu produkciju u.c. Šūnu kultūras izmanto kā modeļobjektu, kas nodrošina unikālus un vērtīgus pētījumu datus. Bieži vien ierobežojošais aspekts ir pieejamo šūnu skaits, piemēram, gadījumos, ja paņemts neliels biopsijas paraugs no cilvēka. Tādēļ šūnu kultūras jāpavairo.

Kultivēšana ir viena no galvenajām bioloģiskā materiāla (šajā gadījumā – šūnu) pavairošanas metodēm ar to izzināšanu saistītos pētījumos. Svarīga eikariotu šūnu kultivēšanā *in vitro*, ir piemērotas augšanas vides izvēle, jo tā būtiski ietekmē rezultātus šūnu kultūras attīstībā un panākumus eksperimentos.

Keratinocīti, kas veido epidermas lielāko daļu, ir tikai viens apmēram no 200 šūnu tipiem, kas sastopams cilvēka organismā. Šūnu transplantācijas centra pētījumos ar ādas šūnām izmanto keratinocītus, kas iegūti no cilvēka audu paraugiem. To tālākais mērķis pēc pavairošanas būtu izmantot epidermālā slāņa izveidošanai ādas modeļos, jo *in vitro* diferenciacijas process ir līdzīgs tā veidošanās gaitai *in vivo*. Līdz šim izdalītās primāro keratinocītu līnijas komerciāli pieejamā *Epi Life* (EL) vidē proliferēja lēni un uzrādīja zemas diferenciacijas spējas.

Lai iegūtu optimālus rezultātus primāro keratinocītu kultivēšanā, kursa **darba mērķis** bija noskaidrot, kura kultivēšanas vide ir vispiemērotākā, izmantojot divu ražotāju specializētās epidermālo šūnu kultivēšanas vides.

Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši **uzdevumi**:

- 1) salīdzināt keratinocītu šūnu morfoloģiju, kultivējot dažādās vidēs līdz vismaz trešajam pārsējumam;
- 2) noteikt populācijas dubultošanās laiku (PDT), izmantojot divas šūnu skaitīšanas metodes;
- 3) analizēt PDT izmaiņas dažādās kultivēšanas vidēs.

1. LITERATŪRAS APSKATS

- nepieciešams, lai sniegtu lasītājam pamatotu (iepriekš publicētu) informāciju labākai darba saprašanai un tam, ko ir paveikuši citi autori. Šajā daļā nevajag tikai pārkopēt informāciju, bet salīdzināt darbus, lai var labāk redzēt, kas ir izdarīts, paverot skatu uz darbu, ko vēl vajadzētu darīt;
- šajā sadaļā tiek aprakstīti svarīgākie, līdz šim publicētie darbi par konkrēto tēmu vai saistībā ar darba tēmu;
- uzskatāmībai var likt attēlus vai shēmas, ja tie/tās veiksmīgāk palīdz paskaidrot domu. Visi tekstā citētie vai atsaucēs minētie darbi jāiekļauj literatūras sarakstā (darba beigās);
- pārrakstīts mācību grāmatas vai cita autora referāta teksts ir „plaģiātisms”. Tomēr, ja vēlas minēt kāda autora domu, tā jāliek pēdiņās un obligāti jānorāda autors vai informācijas avots;
- minot svarīgu informāciju, nepieciešams norādīt, no kurienes šāda informācija ir iegūta – atsaucēs;
- atsauces var būt vai nu:
 - i) iekavās ielikts zinātniskās publikācijas autora uzvārds un gads (sk. zemāk);
 - ii) iekavās ielikts numurs pēc kārtas, pēc kuras tad Literatūras sarakstā iespējams atrast informācijas avotu.

- citējot kādu autoru, NAV burtiski jācitē teiktais, bet gan īsi jāatstāsta, saglabājot jēgu. Ja necitē burtiski, tad citējot nedrīkst izkropļot autora domu. *Piemērs: J.Bērziņš (1993) raksta, ka Kundziņsalā ķērpju skaits pēdējo desmit gadu laikā ir samazinājies VAI Kundziņsalā ķērpju skaits pēdējo desmit gadu laikā ir samazinājies (Bērziņš, 1993).*

- ārzemju autoru uzvārdus parasti raksta oriģinālā rakstībā iekavās, kopā ar publikācijas gadu;
- ja ir divi autori, tad: (Bērziņš un Ozoliņš, 2000; Smith un Johnson, 1997);
- ja ir vairāk nekā divi autori, tad: (Bērziņš u.c., 2000; Smith et al., 1997);
- atsauces var arī numurēt, bet numuriem jāatbilst literatūras sarakstā minētajiem avotiem *Piemēram: Problēmas X risinājumam iepriekš ir pielietoti Y piegājieni [1];*
- jāizvairās no nerecenzētu (privātas mājas lapas, sieviešu žurnāli, ziņu portāli, sociālie tīkli, izklaides portāli) avotu izmantošanas darbā;
- jāatceras, ka rakstītais darbs ir zinātnisks un tam vajadzētu būt balstītam uz zinātnisku rakstu/ mācību grāmatu/ speciālās literatūras citēšanu;
- internetā ir plaši sastopamas specifiskas zinātniskās publikācijas, tās ir īpaši ieteicamas izmantot ZPD; jāievēro, ka tās citē nevis kā interneta avotus (kā tīmekļa saite), bet gan kā pārējo literatūru (autors, gads, nosaukums, žurnāla nosaukums)

Jāizvairās:

- no pirmās personas formu lietojuma („es”, „mēs”). Ieteicams lietot trešās personas formu (autors konstatē..., tiek analizēts ..., veiktie pētījumi pierādīja ...).
- lietot nepamatotu, vulgāru kritiku;
- cita autora darbu uzdot par savējo (plaģiāts);
- „neliet ūdeni” jeb izvairīties no vispārzināmiem apgalvojumiem un māksloti daiļskanīgām frāzēm.

Literatūras apskats parasti sastāda 1/3 līdz 1/4 daļu no pamatdarba.

Piemērs:

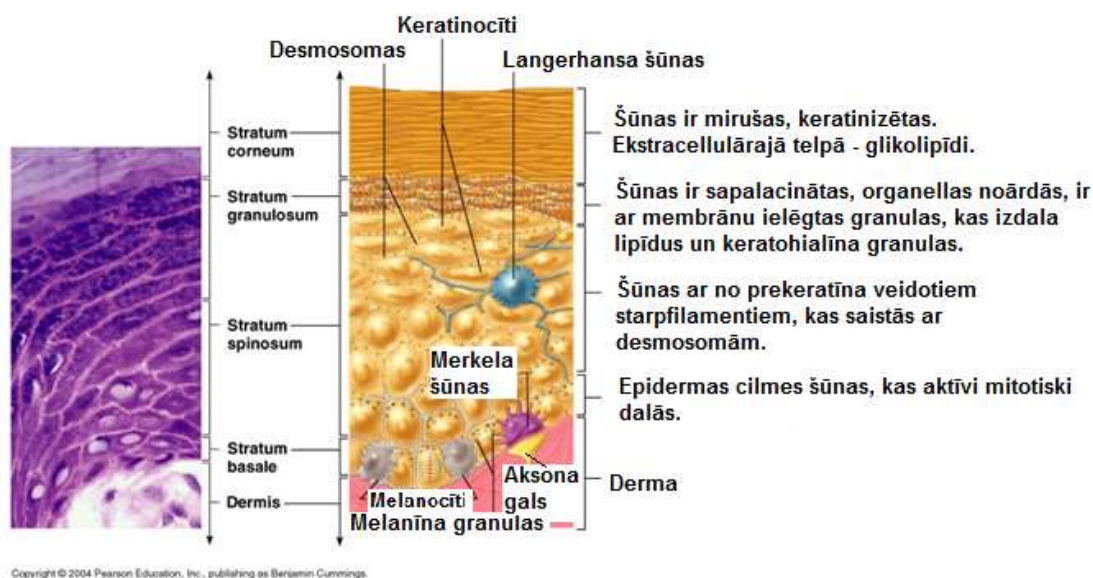
1.1. Cilvēka ādas epidermas uzbūve un funkcijas

Āda ir komplekss orgāns, kas klāj visu ķermeņa virsmu un veido aptuveni 15% ķermeņa svara. Tas ir lielākais ķermeņa orgāns. Āda pilda dažādas vitāli svarīgas funkcijas: aizsargā no

ārējās vides (fizikālās, ķīmiskās un bioloģiskās) ietekmes. Tā ir organizēta trīs pamatslāņos: 1) epidermā, 2) dermā, 3) hipodermā jeb zemādā (Kanitakis 2002).

Epiderma ir augsti specializēti audi, kuru pamatfunkcija ir aizsargbarjeras izveide (Toulza et al. 2007). Epidermas biezums var variēt atkarībā no ķermeņa zonas no 0,05 mm līdz 1 mm. Epiderma nemitīgi atjaunojas un ir veidota no dažādiem šūnu tipiem. Lielāko daļu (aptuveni 90–95%) veido keratinocīti. Pārējo (5–10%) epidermu veido Langerhansa šūnas, melanocīti un Merkela šūnas (Kanitakis 2002). Epidermālie melanocīti, tāpat kā Langerhansa šūnas, ir dendrītiskas šūnas, kas veido kontaktus ar blakus esošajiem keratinocītiem (Hoath and Leahy 2003). Merkela šūnas ir orientētas horizontāli epidermas bazālajā slānī, tās saistās ar keratinocītiem ar desmosomām, kā arī nervu šūnu aksonu galiem (Schenk 1975).

Epidermas šūnas ir organizētas slāņos. Sākot no dziļākā līdz virsējam slānim, to veido: bazālais slānis (*stratum basale* – 1 šūnu slānis), dzeloņainais slānis (*stratum spinosum* – 5–15 šūnu slāņu kārtas), graudainais slānis (*stratum granulosum* – 1–3 šūnu slāņu kārtas), raga slānis (*stratum corneum* – 5–10 šūnu slāņu kārtas). Virsējo raga slāni iedala kompaktajā (*stratum compactum*) un irdenajā slānī (*stratum disjunctum*). Dažās ķermeņa vietās starp graudaino un raga slāni atrodas spīdošais slānis (*stratum lucidum*), piemēram, uz papēžiem (Kanitakis 2002).



1. attēls. Ādas struktūra (ar izmaiņām no <http://apbrwww5.apsu.edu>)

Epiderma ierobežo ūdens zudumu un patogēnu iekļuvu organismā. Lai izveidotu un saglabātu šo organisma dabīgo barjeru, keratinocīti īsteno kompleksu, organizētu diferenciacijas procesu, kas beidzas ar raga kārtas izveidošanos un lobīšanos (Toulza et al. 2007).

Keratinocīti epidermas bazālajā slānī un arī dziļākos ādas slāņos matu folikulās (Halliday and Cadet 2012), kur tie spēj proliferēt, veido heterogēnu šūnu populāciju ar tajā ietilpstošām

ādas cilmes šūnām. Keratinocīti dalās tikai dažas reizes un, izejot diferenciacijas procesu, migrē uz nākamo – epidermas dzeloņaino slāni. Diferenciacijas laikā mainās citokeratīnu ekspresija keratinocītos epidermas bazālajā un dzeloņainajā slānī. Nelielā daudzumā dzeloņainajā slānī keratinocīti ekspresē specifiskus diferenciacijas marķierus, piemēram, involukrīnu. Epidermas graudainajā slānī notiek diferenciacijas procesa kulminācija – šeit keratinocīti ekspresē vairāk nekā 30 epidermas specifiskus proteīnus, tai skaitā proteīnus, kuri atrodas citosolā granulās, piemēram, suprabazīnu, keratinocītu prolīna bagātos proteīnus u.c. (Toulza *et al.* 2007). Ādas virsējā – raga slānī – keratinocītu diferenciacijas rezultātā izveidojas plakanas, keratinizētas šūnas bez kodola un citām organellām (Rheinwald *and* Green 1977).

1.2. Primāro šūnu izdalīšana

Ross Harisons (*Ross Harrison*) 1907. gadā publicēja rakstu, kas iepazīstināja ar jaunu tehniku – audu kultūras izveidi, lai pētītu, kā rodas nervu šķiedras (McGehee Harvey 1975). Ar terminu „primārās šūnu kultūras” apzīmēja šūnas, kuras pirmo reizi ir izdalītas un kultivētas ārpus organisma (Rajeev 2012). Pirms viņa citi zinātnieki bija mēģinājuši pētīt šūnas *in vitro*, bet nevienam iepriekš nebija izdevies veiksmīgi kultivēt un eksperimentēt ar tām. R. Harisons atrisināja pamatproblēmas šūnu kultivēšanā, kas bija saistītas ar barotni, kultivēšanas flakoniem, novērošanu un kultūras kontamināciju (McGehee Harvey 1975). Viņa pētījumi par nervu šķiedru izveidi būtiski ietekmēja neiroloģijas attīstību (Nicholas 1960). Citi nozīmīgi pētījumi saistībā ar šūnu kultivēšanas attīstību apkopoti 1. tabulā (Rajeev 2012):

1.tabula. Dzīvnieku šūnu kultūru pētījumu pirmsākumi

Gads	Pētījums	Zinātnieks
1885.	Cāļa embrija šūnu saglabāšana fizioloģiskā šķīduma kultūrā (<i>saline culture</i>)	V. Roks (<i>W. Roux</i>)
1897.	No asinīm un saistaudiem izdalītu šūnu saglabāšanas demonstrējums serumā un plazmā	L. Leobs (<i>L. Loeb</i>)
1911.	Pirmās šķidrās vides izstrāde, kas sastāvēja no jūras ūdens, seruma, embrija ekstrakta, sāls un peptoniem	V. H. Levis (<i>W. H. Lewis</i>)
1916.	Proteolītiska enzīma tripsīna pielietošana adherentu šūnu pārsēšanai	F.S. Džons, F. P. Ross (<i>F. S. Jones, F. P. Rous</i>)
1923.	Šūnu un audu kultivēšanas flakonu izstrāde	A. Karels, L. E. Bakere (<i>A.</i>

		<i>Carrel, L. E. Baker)</i>
1948.	Pirmo reizi izolēta peles l-fibrolasts, kas spēj dalīties no vienas šūnas	V. R. Erle (<i>W. R. Earle</i>)
1952.	Šūnu līnijas iegūšana no cilvēka dzemdes kakla vēža, zināmas kā <i>HeLa</i> šūnas	G. O. Gajs (<i>G. O. Gey</i>)

Kaut gan pirmās zīdītāju šūnu kultūras, kas iegūtas no audiem un kultivētas *in vitro* (Hayflick *and* Moorhead 1961), tika izmantotas, lai pētītu šūnu fizioloģiju jau 20. gadsimta sākumā, industriālus apmērus šie pētījumi sasniedza tikai piecdesmitajos gados. Pēc atklājuma, kā padarīt kultivēšanu iespējamu lielos apjomos, izmantojot primārās pērtiķa nieru šūnas, tika izveidota vakcīna pret bērnu trieku. Tādējādi šī vakcīna kļuva par pirmo komerciāli izveidoto produktu, kura radīšanai tika lietota zīdītāja šūnu kultūra (Merten 2006).

Kopš šiem atklājumiem, izdalīšanas metodes ir attīstījušās. Mūsdienās tiek plaši izmantotas dažādas primāro šūnu izdalīšanas metodes, kas balstās uz trīs metodoloģijām: piesaistīšanos (adherenci), blīvumu un antivielu saistīšanos.

Samērā vienkārša un lēta, taču nespecifiska metode balstās uz šūnu piesaistīšanos. Audi tiek enzimatiski un/vai mehāniski disociēti (sagrauti) (Tomlinson *et al.* 2012). Lai paaugstinātu šīs metodes specifiku, uz tās balstoties, tiek izstrādāta diferenciāla šūnu saistīšanās dažāda garuma polimēriem, kas ir transplantēti uz stikla virsmas (Nagase *and* Kimura 2012).

Uz šūnu blīvumu balstītā izdalīšanas metodē izmanto centrifugēšanu blīvuma gradientā. Izmantojot šo metodi, var saskarties ar tās trūkumu – atsevišķos gadījumos dažādu šūnu populāciju blīvumu starpība nav pietiekama, lai tās atdalītu. Šādos gadījumos ir ieteicams atkārtot centrifugēšanu, izmantojot centrifugēšanas vidi ar atšķirīgu koncentrāciju un izmainot centrifugēšanas ātrumu. Centrifugēšanu blīvuma gradientā izmanto, kad jāstrādā ar audiem, kas satur lielu daudzumu nevēlamu šūnu, piemēram, asinīm, kaula smadzenēm un adipozajiem audiem (taukaudiem).

Antivielu saistīšanās metodes (*antibody-binding*) balstās uz fluorescences aktivētu šūnu sortēšanu (fluorescence-activated cell sorting) un magnētiski aktivētu šūnu sortēšanu (*magnetic-activated cell sorting*). Abas šīs tehnikas izmanto antigēnus uz šūnu virsmas un tiem atbilstošas antivielas. Ar šo metodi ir iespējams izolēt noteiktu šūnu populācijas līdz augstai precizitātei. Taču, arī šai metodei ir mīnusi – ir iespējami gadījumi, kad interesējošam šūnu tipam nav unikāli marķieri, kā arī par metodes ierobežojošo faktoru var kļūt komerciāli pieejamo antivielu daudzums (Tomlinson *et al.* 2012).

Darbā izmantotā primāro keratinocītu izdalīšanas metode balstās uz enzimatisku epidermas apstrādi ar proteolītisku enzīmu – tripsīnu. Tripsīns ir serīna proteāze, kas katalizē

peptīdsaišu hidrolīzi un līdz ar to pārrauj ekstracellulāro matriksu. Tripsīnam ir pievienota etilēndiamīntetraetiķskābe (EDTA), lai optimizētu tā iedarbību – tas samazina adhēzijas molekulu mijiedarbību (Albert *et al.* 2002).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. MATERIĀLI

- šo sadaļu daļa divās apakšnodaļās: 2.1. Materiāli un 2.2. Metodes;
- pie materiāliem skolēns uzskaita darbam nepieciešamos materiālus, ieskaitot datu apstrādes un analīzes programmas;
- metodes apraksta pietiekami detalizēti. Metodes aprakstam jābūt tādām, lai cits ieinteresēts pētnieks varētu atkārtot eksperimentu;
- ja ir izmantotas dažādas izejvielas, tad varētu izskaidrot, kāpēc izmanto tieši darbā izvēlētās izejvielas;
- ja ir jauna pieeja, izskaidro, ko jaunu šī metode dos labākai mērķa sasniegšanai

Piemērs:

2.1.1. Šūnu līnijas

- cilvēka ādas primāro keratinocītu līnija (PK) tika iegūta darba gaitā;
- cilvēka normālas epidermas keratinocīti (NHEK), komerciāli pieejama šūnu līnija no PromoCell (Vācija).

2.1.2. Reaģenti

2. tabula. Šūnu kultivēšanas vides, piedevas un reaģenti

Nosaukums	Ražotājs
Dulbeko modificētā Īgla vide (DMEM)	Invitrogen
Fetālais teļa serums (FBS)	Invitrogen
Keratinocītu bazālā vide 2 ar piedevām (KB)	PromoCell
Epidermālo šūnu vide (EL)	Life Technologies
Kalcija glukonāts	Sopharma
Tripānzilais	Sigma
Fosfāta buferis(PBS)	Life Technologies

3. tabula. Enzīmi

Nosaukums	Ražotājs
0,25% Tripsīns/EDTA	Invitrogen
Dispāze	Sigma

2.1.3. Laboratorijas iekārtas

4. tabula. Laboratorijas iekārtas

Nosaukums	Ražotājs
Laminārs	Kojair
CO ₂ inkubators	Binder
Rotofix 32 centrifūga	Hettich
Hemocitometrs	Celeromics
Countess – automatizētais šūnu skaita noteicējs	Invitrogen
Invertētais gaismas mikroskops	Leica Microsystems
Ultrazemas temperatūras saldētava (- 70 °C)	Dairei

2.1.4. Laboratorijas materiāli

5. tabula. Laboratorijas instrumenti

Nosaukums	Ražotājs
Audu un šūnu kultivēšanas flakoni (T75 un T25)	Sarstedt
Vienreizlietojamās seroloģiskās pipetes	“
6 lauciņu šūnu kultivēšanas plates	“
15 un 50 ml centrifugēšanas stobriņi	“
1,5 ml mikrocentrifugēšanas stobriņi	“
Saldēšanas trauks	Sigma-Aldrich

2.2. METODES

Piemērs:

2.2.1. Šūnu atsaldēšana

Šūnu atsaldēšana tika veikta komerciāli pieejamai NHEK šūnu līnijai.

Šūnu kultivēšanas vidi (KB) ienes sterilā 50 ml cetrifugēšanas stobriņā un uzsilda pie +37°C 30 min.

Šūnas, kuras tika piegādātas uz sausā ledu sasaldētā veidā un uzglabātas pie -70 °C saldētavā, ievieto ūdens vannā un inkubē 1 min (līdz gandrīz viss ir izkusis). Stobriņu pārnes uz lamināru, kur sterilos apstākļos šūnas tiek pārnestas 15 ml stobriņā. Lēnam, pa pilienam, pievieno 1 ml DMEM/20%FBS un viegli samaisa, lai šūnām nebūtu osmotiskā šoka. Turpinājumā lēnam pievieno 2 ml DMEM/20%FBS, samaisa, un tā turpina pievienot, līdz gala tilpums ir 8 ml. Iegūto suspensiju centrifugē pie 1500 apgriezieniem minūtē (rpm) 5 min. Pievieno 20% FBS/DMEM tādā daudzumā, lai DMSO, kas tiek izmantots šūnu saldēšanā, un vides attiecība būtu 1:20.

Šūnu kultivēšanas flakonā (T75) ienes 5 ml siltu KB vidi. Šūnu nogulsnes suspendē 5 ml KB un pārnes sagatavotajā šūnu kultivēšanas flakonā.

Šūnas inkubē 37 °C, 5% CO₂ atmosfērā, monitorē to stāvokli mikroskopējot un ik pa 2-3 dienām mainot svaigu KB vidi.

2.2.2. Šūnu pārsēšana

Kad kultivētās šūnas sasniedz 70-90 % konfluenci, tās tiek pārsētas. Lai atdalītu šūnas no kultivēšanas flakona virsmas, izmanto tripsīnu. Tripsīns ir enzīms, kas noārda šūnu adhēzijas proteīnus.

No šūnu kultivēšanas flakona atsūc vidi un noskalo to ar 1x PBS. T25 flakonā iepilda 1 ml 0,25% tripsīnu/EDTA; savukārt, ja tiek šūnas tiek kultivētas T75 flakonā, tad iepilda 2 ml 0,25% tripsīnu/EDTA.

Ar mikroskopu novēro un pārbauda šūnu atdalīšanos no flakona virsmas. Reakciju apstādina ar 2 V 20% FBS/PBS.

Šķīdumu iepilda stobriņā, flakonu izskalo ar 1x PBS, pārnes stobriņāar šūnām. Šūnas sedimentē, centrifugējot 5 min pie 1500 rpm. Supernatantu nolej, nogulsnes suspendē 1 ml vides.

Veic šūnu skaitīšanu.

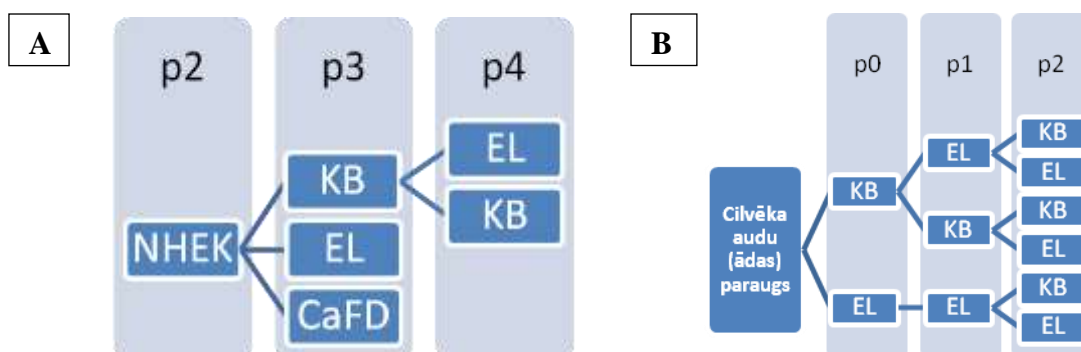
3. REZULTĀTI UN ANALĪZE

- šajā sadaļā apraksta un, ja iespējams, vizuāli attēlo darba gaitā iegūtos rezultātus;
- iekļauj tikai galvenos rezultātus, primāros datus (ja tās ir lielas datu kopas, jāliek pielikumā, ja tas ir nepieciešams);
- tekstā paskaidro attēlus un tabulas, kā arī pievērš lasītāja uzmanību attēlos un tabulās atspoguļotajām izmaiņām vai atšķirībām rādītājos;
- ir nepieciešama iegūto datu statistiskā analīze (cik tas ir iespējams), tādēļ vēlams eksperimentus vai novērojumus veikt vismaz trijos atkārtojumos. Lielāks atkārtojumu skaits dod rezultātiem lielāku ticamību;
- pie katra rezultātu apraksta būtu jāapspriež rezultāti, salīdzinot tos ar agrākiem vai līdzīgiem pētījumiem visā pasaulē;
- jānovērtē, kā rezultāti atbilst darbā izvirzītajam mērķim un gaidītajam rezultātam;
- jānovērtē rezultātu ticamība, kā arī darba trūkumi (ja tādi ir), piemēram, metodikas nepilnības, nepietiekama paraugkopa pārlicinošu secinājumu definēšanai utt.;
- ja ir kādi citi interesanti atradumi, tad tos var pieminēt, parādot, ka iegūtie rezultāti var sniegt plašākas turpmākā pielietojuma iespējas

Piemērs:

3.1. Eksperimentālais keratinocītu kultivēšanas dizains

Eksperimentālajā daļā, lai pārbaudītu šūnu augšanu dažādās vidēs, tika izmantotas NHEKp3 un primāro keratinocītu (PK) p0. Šūnu kultivēšanas eksperimentālais dizains un izmantotās vides ir parādītas 6. attēlā.



2. attēls. Keratinocītu kultivēšanas vides. **A**– NHEK kultivēšanas shēma; **B** – PK kultivēšanas shēma.

NHEK p2 tika atsaldētas un pavairotas KB vidē (6.att. A), kā norādīts ražotāja protokolā. Pēc pavairošanas tās tika pārsētas sešu lauciņu platē 5000 šūnas/cm². Šis kultivēšanas dizains ļāva pārbaudīt vienlaikus trīs dažādas vides divos atkārtojumos. NHEK tika kultivētas divas nedēļas un pēc tam atkal pārsētas iepriekš minētajā koncentrācijā. CaFD paraugi netika pārsēti, jo pēc sešām dienām minētajā vidē netika novērota neviena piesaistījies šūna, un paraugs tika terminēts. Zemā šūnu skaita dēļ netika turpināta arī EL vidē esošo šūnu līnija.

Keratinocītus, kuri tika kultivēti KB vidē, tālāk pārsēja tādā pašā blīvumā sešu lauciņu platē jau iepriekš izmantotajās KB un EL vidēs. CaFD vide vairs netika izmantotakultivēšanai

iepriekš uzrādītās nepiemērotības dēļ. Iegūtā ceturtnā pārsējuma šūnu līnija tika kultivēta divas nedēļas, līdz KB un EL vidēs šūnas bija sasniegušas atbilstošu konfluenci tālākai apstrādei un ilgstošai uzglabāšanai saldējot.

PK šūnu līnija pēc izdalīšanas tika iesēta un pavairota EL un KB vidēs (6.att. B), kurās NHEK uzrādīja vērā ņemamas proliferācijas spējas. Pēc 12 dienām, kad šūnu konfluences bija sasniegusi 70–90 %, tās tika pārsētas sešu lauciņu platē divos atkārtojumos tādā pašā blīvumā kā iepriekš NHEK – 5000 šūnas/cm². To veica, lai varētu salīdzināt, vai vērojamas proliferācijas atšķirības kultivēšanas vidēm NHEK un PK šūnu līnijām.

Šūnu izsēšana tiek veikta pēc principa: šūnas, kuras sākotnēji tika kultivētas KB vidē, pārsēja gan KB, gan EL vidē, bet šūnas, kuras sākotnēji tika kultivētas EL vidē, pārsēja tajā pašā – EL vidē. Šāds princips tika izvēlēts, lai novērotu, kā PK proliferācijas spējas mainās laikā dažādās kultivēšanas vidēs un arī tāpēc, ka KB vidē PK uzrādīja augstākas proliferācijas spējas nekā EL vidē. Pēc nedēļas PK KB vidē sasniedza atbilstošu konfluenci (~90%) tālākai pārsēšanai, kamēr EL vidē kultivētie PK bija sasnieguši 40–60 % konfluenci. Tālāko pārsēšanu veic iepriekš minētajā koncentrācijā.

Lai iegūtu trešā pārsējuma šūnu līniju, PK izsēja pēc iepriekš minētā principa – tā, lai novērotu PK proliferācijas spējas atšķirības laikā, dažādās kultivēšanas vidēs. Pēc nedēļas, kad tikai KB vidē kultivētās šūnas ir sasniegušas atbilstošu konfluenci tālākai apstrādei un ilgstošai uzglabāšanai saldējot, eksperiments tiek pabeigts.

Pirms katras pārsēšanas nosaka šūnu skaitu ar divām metodēm – ar hemocitometru un automatizēti ar *Countess* iekārtu.

4. SECINĀJUMI

- pa punktiem izklāsta atbildes uz darbā izvirzītajiem uzdevumiem un mērķi;
- secinājumi NAV rezultātu konspekts;
- vēlams būt īsiem un lakoniskiem, izteiktiem vienā vai divos teikumos.

Piemērs:

1. References kultūras NHEK un no cilvēka ādas izdalītās PK kultūras šūnu morfoloģija dažādās kultivēšanas vidēs neatšķiras.
2. Iegūt datus par precīzu šūnu skaitu ir iespējams vienlīdz precīzi ar abām izmantotajām metodēm – manuāli ar hemocitometru un automatizēti ar *Countess*.
3. Zemāks PDT liecina par to, ka keratinocīti ātrāk aug KB vidē.
4. Vispiemērotākā vide NHEK un no cilvēka ādas izdalīto PK kultivēšanai ir komerciāli pieejamā KB (*firmal*) vide.

5. LITERATŪRAS SARAKSTS

- šajā nodaļā iekļauj visus darbā izmantotos literatūras avotus;
 - literatūras sarakstā jābūt vismaz 7 avotiem no žurnālu rakstiem, grāmatām (ne interneta vietnes);
 - ja darbā atsauces ir liktas ar uzvārdiem (Bērziņš, 2000), tad literatūras sarakstu grupē alfabēta kārtībā pēc pirmā autora uzvārda;
 - ja darbā atsauces ir liktas ar numuriem [1;2 utt.], tad literatūras sarakstā atbilstošajam numuram jābūt atbilstošajam literatūras avotam;
 - šajā nodaļā jāraksta katras darbā izmantotās publikācijas pilns autoru kolektīvs, gads, raksta nosaukums, žurnāls, tā numurs un lapaspuses:
- piemēram, Balmer, J.E. and Blomhoff, R. 2002. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 43:1773-1808. vai Aleksejevs Ē., Plikšs M. 1996. Latvijas retās zivis. *Latvijas ZA Vēstis*, 23 (1): 12-23.
- Interneta resursi:
Anonymous 2004. European platform for Biodiversity.
<http://www.bioplatform.com/info>
vai
NIH (2001) Stem Cell report. Stem cells: Scientific progress and future research. Directions:
<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/>

Piemērs:

1. Albert B., Johnson A. and J., L. 2002. *Molecular Biology Of The Cell*. New York, Garland Science.
2. Anonymous. 2014a. EpiLife® Defined Growth Supplement (EDGS).
<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/S0125?ICID=search-product>.
3. Anonymous. 2014b. EpiLife® Medium, with 60 μM calcium.
<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/MEPI500CA?ICID=search-mepi500ca>.
4. Anonymous. 2014c. Keratinocyte Medium. [http://www.promocell.com/nc/products/cell-culture-media/media-for-primary-cells/keratinocyte-medium/?sword_list\[0\]=keratinocytes](http://www.promocell.com/nc/products/cell-culture-media/media-for-primary-cells/keratinocyte-medium/?sword_list[0]=keratinocytes).
5. Bikle, D.D., Xie, Z. and Tu, C.L. 2012. Calcium regulation of keratinocyte differentiation - *Expert Rev Endocrinol Metab*, 7: 461-472.
6. Boyce, S.T. and Ham, R.G. 1983. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture - *J Invest Dermatol*, 81: 33s-40s.
7. Britannica, T.E.o.T.E. 2013. Cell culture.
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1308639/cell-culture>.
8. Eagle, H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture - *Science*, 122: 501-14.

9.Halliday, G.M. and Cadet, J. 2012. It's all about position: the basal layer of human epidermis is particularly susceptible to different types of sunlight-induced DNA damage - *J Invest Dermatol*, 132: 265-7.

6. PATEICĪBAS

- parasti īsas un lakoniskas

Piemērs:

Darba autore izsaka pateicību darba vadītājam, Centra vadītājam par iespēju izstrādāt darbu (izmatot aparāturu utt.), kā arī kolēģiem par konsultatīvo palīdzību darba izstrādes procesā. Tāpat arī pateicība un firmai par nodrošināšanu ar darba izstrādei nepieciešamajiem materiāliem.

PIELIKUMI

1. pielikums

- veido TIKAI tad, ja darbā ir daudz attēlu un tabulu no izejas rezultātiem vai arī tās ir apjomīgas. Atcerieties, rezultātu daļā liek tikai apkopojumus! Šajā daļā var ievietot attēlus, kas tieši nav saistīti ar pētījuma rezultātiem (piem., iekārtu attēlus (tīkls, centrifūga, deglis utt.)), taču tas nav nepieciešams un darba vērtību neceļ;
- uz pielikuma nodaļas pirmās lapas vidū lieliem burtiem raksta „Pielikums” (ja ir tikai viens) vai Pielikumi” (ja tie ir vairāki). Seko atsevišķas lapas: 1.pielikums (nosaukums), 2.pielikums (nosaukums) utt.;
- tabulas un attēli šajā nodaļā numurējami kā pielikumi. Uz vienas lapas vēlams izvietot vienu attēlu (kas var sastāvēt no vairākām bildēm) vai vienu tabulu.

Tehniskais noformējums

- Darbs jāraksta uz lapas vienas puses.
- Lietot standarta izmēra A4 formāta lapas.
- No kreisās puses jāatstāj 3 cm plata mala, no labās puses – 1 cm, no augšējās un apakšējās malas – 2 cm.
- Darbam jābūt uzrakstītam pareizā literārā valodā.
- Datorsalikumā (Time New Roman vai līdzīgs).
- Lappuses darbā jānumurē, sākot no Ievads (parasti sākas ar 4. vai 5. lpp. Anotāciju un satura rādītāju lpp. numuru neraksta).
- Pamatteksts sastāv no rindkopām. Rindkopas 1.rindas atkāpi (10 mm) veido ar teksta formatēšanas komandām. Rindkopas beigās lieto “Enter”.
- Kā decimālkomats jālieto punkts (ja tomēr lieto komatu, tad tas jālieto konsekventi visā darbā).
- Tekstu formatizē, lietojot formatēšanas komandas: *Center* vai *Justify*. Virsrakstus parasti centrē (*Center*), pamattekstu parasti formatē, nolīdzinot abas malas (*Justify*).
- Burtu lielums tekstā 12 punkti. Atstarpe starp rindām 1.5 rindas.
- Lappušu numuri jāliek lapas apakšā centrā vai labajā malā stūrī.
- Apakšvirsrakstu lielums 14 – 20 punkti. Nodaļu virsrakstiem – 16 –24 punkti.
- Virsraksta beigās punktu neliek.
- Starp lielo virsrakstu un tekstu (vai apakšvirsrakstu) jālieto divu pamatteksta rindu intervāls.
- Jaunajā lappusē jāsāk visas darba galvenās daļas, bet nodaļas un apakšnodaļas turpina rakstīt jau aizsāktā lappusē. Lappusi nevar beigt tikai ar virsrakstu, tādā gadījumā to sāk jaunā lappusē.
- Attēliem numuru un nosaukumu raksta zem attēla, centrā. Tabulām numuru raksta virs tās, kreisajā pusē. Tabulas nosaukumu raksta ar lielo burtu. Aiz tabulas nosaukuma punktu neliek.
- Fotogrāfijas ir oriģinālattēli, tāpēc iekavās jāpieraksta tās autors un nosaukums.
- Darbam nepieciešama elektroniskā versija .pdf (ieteicamākais formāts) vai.doc vai .docx formātā.