

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOĻĢIJAS FAKULTĀTE



**KASPARS MEGNIS**

**HIPOFĪZES AUDZĒJU PATOĢENĒZES  
BIOMOLEKULĀRO MEHĀNISMŪ IZPĒTE**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Doktora grāda iegūšanai bioloģijas nozarē

Apakšnozare: Molekulārā bioloģija

Rīga, 2022

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā Cilvēka Ģenētikas un Molekulārās Medicīnas zinātniskajā grupā un Molekulārās un Funkcionālās Genomikas zinātniskajā grupā laika posmā no 2013. gada 2022. gadam.

Pētījumu finansēja ERAF grants 2.1.1.1.0/14/APIA/VIAA/058 “Jaunu *in vitro* diagnostikas un prognostiskas līdzekļu izstrāde individualizētai audzēju un mitohondriālo saslimšanu ārstēšanai”, ERAF grants 1.1.1.1/16/A/066 “Molekulāro marķieru identificēšana hipofīzes adenomu veidošanās, attīstības gaitas un terapijas efektivitātes prognozēšanai”, ERAF grants 1.1.1.1/18/A/089 “Molekulārie RNS faktori hipofīzes adenomas attīstībā”, EEZ-NFI grants EEZ/NFI/S/2015/019 “Cilvēka kapitāla un zināšanu uzlabošana veselības zinātnēs ar iestāžu sadarbošanos un mobilitāti starp Latvijas Universitāti un trīs Norvēģijas universitātēm”, 8.2.2.0/20/I/006 " LU doktorantūras kapacitātes stiprināšana jaunā doktorantūras modeļa ietvarā" un Roche Akadēmijas projekta grants “Adenohipofīzes adenomu audu imunohistoķīmiskā analīze”

Darbs satur ievadu, teorētisko pamatojumu, materiālus un metodes, rezultātus un diskusiju, secinājumus, aizstāvamās tēzes, oriģinālo publikāciju sarakstu, pētījuma aprobāciju un izmantotās literatūras sarakstu.

Darba forma ir publikāciju kopa bioloģijas nozarē, molekulārās bioloģijas apakšnozarē.

Darba vadītāja: Dr. biol. Vita Rovīte

Recenzenti:

- 1) Dr. biol. Dace Pjanova, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Rīga, Latvija
- 2) Dr. med. Jeļizaveta Sokolovska, Latvijas Universitāte, Rīga, Latvija.
- 3) Prof. Dr. Rasa Liutkevičienė, Lietuvas Veselības zinātņu Universitātes slimnīca, Kauņa, Lietuva

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2022. gada 15. septembrī plkst. 14:00, Latvijas Universitātes Bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes atklātā sēdē Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju centrā, Rātsupītes ielā 1 k-1. Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

LU Bioloģijas zinātņu nozares promocijas

Padomes priekšsēdētājs/-a \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /  
Padomes sekretārs/-e \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /

© Latvijas Universitāte, 2022

© Kaspars Megnis, 2022

## KOPSAVILKUMS

Hipofīze ir intrakraniāls endokrīnās sistēmas dziedzeris, kas ietekmē gandrīz visu orgānu un audu darbību. Tās hormonālo aktivitāti var ietekmēt hipofīzes neuroendokrīnie audzēji (PitNET), izraisot plašu nelabvēlīgu ietekmi uz ķermeni. Tā kā ģenētiskie faktori un līdz šim zināmie mehānismi hipofīzes hormonālajās šūnās nevar izskaidrot lielāko daļu PitNET gadījumu, iespējams neparenhimālās šūnas varētu būt plašāk iesaistītas PitNET attīstībā un funkcionalitātē. Informācija par PitNET ģenētisko fonu vai tā izmaiņām laika gaitā varētu būt noderīga terapijas plānošanā un uzraudzībā, taču PitNET intrakraniālā atrašanās vieta padara audu biopsijas lielākoties nepraktiskas. Tāpēc varētu apsvērt cirkulējošo audzēja DNS izmantošanu kā neinvazīvus asins biomarkierus.

Šajā promocijas darbā analizētas hipofīzes šūnu kultūru biomolekulārās īpašības un no hipofīzes izcelsmes šūnām brīvās DNS molekulu klātbūtne pacientu asins plazmā. Tika konstatēts, ka viena no šūnu kultūrām ir multipotentas mezinhimāli stromālās šūnas, kas ģenētiski atšķiras no galvenās audzēja masas. Tām bija ļoti ierobežota un neraksturīgi zema ar hipofīzes organoģenēzi saistīto gēnu ekspresija, un tām netika konstatēta nekāda saistības ar audzēja klīniskām izpausmēm. Mūsu atklājumi liecina, ka tā nav galvenā PitNET šūnu populācija, bet, iespējams, tai ir audzēja darbību atbalstoša loma. Tika noteikts, ka otra šūnu kultūra ir hipofīzes sfēru veidojošas šūnas, kurām bija kopīgas ģenētiskās iezīmes ar galveno audzēja masu un kuras ekspresēja hipofīzes parenhimālos marķierus. Tās, visticamāk, veido audzēja galveno audu masu, un tās varētu tālāk analizēt kā mērķi jaunai PitNET medikamentozajai terapijai. Pētījumā, kurā tika analizētas pacientu šķidrās biopsijas, tika atklāts, ka PitNET audu paraugos atrastās somatiskās mutācijas ir konstatējamas arī šūnu brīvajā DNS, kas iegūta no atbilstošo pacientu asins plazmas. To konstatējamība atšķīrās starp pacientiem un starp atsevišķām mutācijām, un vairākos gadījumos bija pārāk zema praktiskai pielietošanai klīnikā. Neskatoties uz pozitīvu koncepcijas pierādījumu ir jāturpina pētīt citas molekulārās metodes, lai izstrādātu jutīgākas monitorēšanas metodes.

Atslēgvārdi: hipofīzes neuroendokrīnie audzēji, neparenhimālās šūnas, multipotentas mezinhimāli stromālās šūnas, hipofīzes sfēras, šūnu brīvā DNS, cirkulējošā audzēja DNS

# SATURA RĀDĪTĀJS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI .....	3
IEVADS .....	4
1 TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS .....	5
1.1 Hipofīze.....	5
1.2 Hipofīzes neiroendokrīnie audzēji .....	6
1.3. Adenohipofīzes un PitNET šūnu sastāvs .....	7
1.4 PitNET diagnostika un klasifikācija.....	8
1.5. Cirkulējošie biomarkieri un PitNET terapija.....	9
2 MATERIĀLI UN METODEDES.....	10
2.1 Paraugu ievākšana un saistītie procesi .....	10
2.2. PitNET šūnu kultūru izveide .....	11
2.3. Imūncitoķīmija un imūnhistoķīmija .....	11
2.4. Šūnu eksperimenti .....	12
2.5. Uz PCR un sekvencēšanu balstīti eksperimenti .....	13
3 REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	15
3.1 Multipotentas mezenhimāli stromālās šūnas.....	15
3.2 Hipofīzes sfēras veidojošās šūnas .....	17
3.3 PitNET cirkulējošā audzēja DNS.....	19
SECINĀJUMI .....	21
AIZSTĀVĀMĀS TĒZES .....	21
ORIĢINĀLO PUBLIKĀCIJU SARAKSTS.....	22
PĒTĪJUMA APROBĀCIJA .....	23
PATEICĪBAS .....	24
LITERATŪRAS SARAKSTS .....	25

## DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

AKTH	adrenokortikotropais hormons, kortikotropīns	VIGDB	Valsts iedzīvotāju genoma datubāze
AIP	aril ogļūdeņraža receptoru mijiedarbības proteīns	LH	luteinizējošais hormons, lutropīns
bFGF	pamata fibroblastu augšanas faktors	makroPitNET	liels hipofīzes neiroendokrīnais audzējs
BSA	liellopu seruma albumīns	MEN1	menīns 1
cast-PCR	konkurētspējīga alēles-specifiska TaqMan PCR	mikroPitNET	mazs hipofīzes neiroendokrīnais audzējs
CD105	endogļīns	miRNS	mikroRNS
CD15	stadijai specifiskais embrija antigēns 1	MSC	multipotents mezenhimāli stromālās šūnas
CD44	CD44 molekula	NFPitNET	nefunkcionāls hipofīzes neiroendokrīnais audzējs
CD90	Thy-1 šūnu virsmas antigēns	NR5A1	kodola receptoru apakšgrupa 5, A grupa, 1. loceklis
kDNS	komplementārā DNS	OB	optiskais blīvums
CRH	kortikotropīnu atbrīvojošais hormons, kortikoliberīns	PBS	fosfāta buferšķīdums
ctDNS	cirkulējošā audzēja DNS	PIT1	POU 1. klase,
ctDNS	šūnu brīvā DNS	PitNET	homeobokss 1
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindols		hipofīzes neiroendokrīnais audzējs
DMEM	Dulbeko modificēta Īgla barotne	POU1F1	POU domēns, 1. klase, 1. transkripcijas faktors
EDTA	etilēndiamīntetraetiķskābe	POU5F1	POU 5. klase,
EGF	epidermālais augšanas faktors		homeobokss 1
FBS	liellopu augļa serums	PRL	prolaktīns, laktotropīns
FSC	folikulostelātu šūnas	qPCR	reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija
FSH	folikulus stimulējošais hormons, folitropīns	sDNS	somatiskā DNS
gDNS	genomiskā DNS	SF1	kodola receptoru apakšgrupa 5, A grupa, 1. loceklis
GFRa2	glia fibrilāri skābais proteīns	SOX2	SRY-bokss transkripcijas faktors 2
GH	augšanas hormons, somatotropīns	SP	sānu populācija
GHRH	augšanas hormonu atbrīvojošais hormons, somatoliberīns	SST	somatostatīns, augšanas hormonu inhibējošais hormons
gigantPitNET	gigantisks hipofīzes neiroendokrīnais audzējs	TBX19	T-bokss 19
GNAS	GNAS kompleksa lokuss	TPIT	T-bokss 19
GnRH	gonadotropīnu atbrīvojošais hormons, gonadoliberīns	TRH	tirotropīnu atbrīvojošais hormons, tiroliberīns
IGF-1	insulīnam līdzīgais augšanas faktors 1	TSH	tireoīdstimulējošais hormons, tireotropīns
IHC(P)	formalinā fiksētu parafinā iestrādātu paraugu imūnhistoķīmija	VIM	vimentīns
		VGA	visa genoma amplifikācija

## IEVADS

Hipofīzes neiroendokrīnie audzēji (PitNET) ir nemetastazējoši intrakraniāli audzēji. Tie var ietekmēt dziedera hormonālo darbību, tādējādi izraisot neatgriezeniskus multisistēmu bojājumus. PitNET ir sastopami 14,4% līdz 22,5% cilvēku no vispārējās populācijas. Klīniski nozīmīgi PitNET tiek diagnosticēti retāk - aptuveni viens gadījums uz 1000 līdz 1300 personām. Taču, pateicoties uzlabojumiem diagnostikā, šim skaitlim ir tendence pieaugt. Neskatoties uz plašiem pētījumiem, tikai daļai PitNET gadījumu ir zināmi ģenētiski cēloņi, bet lielāko daļu nevar izskaidrot ar pašreizējām zināšanām par molekulārajiem mehānismiem. Tādēļ dziļākas zināšanas par PitNET šūnu sastāvu un to funkcijām varētu radīt plašāku izpratni par PitNET cēloņiem un ar tiem saistītajiem procesiem. PitNET ģenētiskā fona vai tā izmaiņu laika gaitā pārzināšana varētu būt noderīga terapijas plānošanā vai novērošanas laikā, taču PitNET intrakraniālā atrašanās vieta sarežģī biopsiju veikšanu. Tāpēc varētu apsvērt cirkulējošo audzēja DNS izmantošanu kā neinvazīvus biomarkierus.

Šī promocijas darba mērķis bija izpētīt un raksturot primārās PitNET šūnu kultūras, lai izstrādātu reprezentatīvu cilvēka hipofīzes audzēja modeli un izpētītu ctDNS noteikšanas iespējas PitNET pacientu asinīs neinvazīvas audzēju diagnostikas un prognostikas nolūkos.

Lai sasniegtu pētījuma mērķi, tika izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Pielāgot un aprobēt metodes adherentu un sferoīdu neparenhimālo šūnu līniju iegūšanai no PitNET audiem, kuras varētu pavairot kā šūnu kultūru.
2. Iegūt dzīvotspējīgas šūnu kultūras un analizēt to cilmesību, marķieru ekspresijas modeļus un funkcionalitāti, lai novērtētu to iespējamo izcelsmi un iespēju izmantot kā PitNET modeli.
3. Analizēt iegūto šūnu kultūru ģenētisko fonu un salīdzināt to ar audu paraugiem, lai analizētu kopējo šūnu iesaisti audzēju veidošanā.
4. Ierosināt un aprobēt izstrādāto šūnu modeļu izmantošanu padziļinātiem PitNET šūnu funkcionalitātes pētījumiem.
5. Pārbaudīt iespēju pacientu asins plazmā noteikt PitNET izcelsmes šūnu brīvās DNS.
6. Atlasītu un izpētītu atsevišķas PitNET specifiskas mutācijas saturošu cfDNS klātbūtni asinīs.
7. Novērtēt izmantotās metodes cfDNS noteikšanai, pamatojoties uz jutību un klīnisko pielietojamību.

# 1 TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS

## 1.1 Hipofīze

Hipofīze ir intrakraniāls endokrīnais dziedzeris, kas pēc hipotalāma faktoru iedarbības producē hormonus, kuri regulē ķermeņa dzīvībai svarīgās funkcijas. Tā darbojas kā saikne starp nervu un endokrīno sistēmu, saņemot informatīvos signālus no smadzeņu izpildstrukturām un sensorajiem orgāniem un pārnes tos uz citiem endokrīnajiem dziedzeriem un mērķa audiem (Tortora and Nielsem, 2010). Parasti pieauguša cilvēka hipofīze sver aptuveni 600 mg un tās tilpums ir 500 mm<sup>3</sup>, taču tas var atšķirties atkarībā no grūtniecības, pubertātes vai citu iemeslu dēļ, kas saistīti ar hormonālām izmaiņām (Pariante et al., 2004; Platta et al., 2010). Tā atrodas smadzeņu pamatnē turku sedlos jeb *sella turcica* (Asa and Ezzat, 2009). Hipofīze sastāv no divām galvenajām daļām - neurohipofīzes (posteriorās hipofīze) un adenohipofīzes (anteriorās hipofīze) (Asa and Ezzat, 2002).

Adenohipofīzes attīstība ir iedalīta trīs posmos: 1) hipofīzes organoģenēzes uzsākšana un hipofīzes pumpura veidošanās, 2) Ratkes kabatas un šūnu proliferācijas evaginācija un 3) līnijas noteikšana un šūnu diferenciācija (Larkin and Ansorge, 2000). Ratkes kabatas cilmes šūnas attīstās trīs sekojošos šūnu veidos, kas ekspresē T-boksa 19 (*TBX19*, *TPIT*), kodola receptoru apakšgrupas 5, A grupas, 1. locekļa (*NR5A1*, *SF1*) vai POU 1. klases, homeoboksa 1 (*POU1F1*, *PIT1*) gēnu. Šīs šūnas diferencējas par kortikotrofajām, gonadotrofajām, tirotrofajām, somatotrofajām un laktotrofajām šūnām, kurās šie transkripcijas faktori arī turpmāk tiek ekspresēti. (Asa and Ezzat, 2009).

Adenohipofīzes sekretoro šūnu funkcija ir atkarīga no hipotalāma hormonālās iedarbības. Hipotalāms sekretē augšanas hormonu atbrīvojošo hormonu (GHRH), tirotropīnu atbrīvojošo hormonu (TRH), kortikotropīnu atbrīvojošo hormonu (CRH) un gonadotropīnu atbrīvojošo hormonu, (GnRH), kas saistās ar atbilstošajiem adenohipofīzes šūnu transmembrānas receptoriem un inducē signālceļus, kas nodrošina tām raksturīgo hormonu sintēzi un sekrēciju, tostarp augšanas hormona (GH), prolaktīna (PRL), tireoīdstimulējošā hormona (TSH), luteinizējošā hormona (LH), folikulus stimulējošā hormona (FSH) un adrenokortikotropā hormona (AKTH). Šo signālceļu darbība ir būtiska cilvēka ķermeņa homeostāzei (Ooi et al., 2004). Pateicoties šiem hormoniem, adenohipofīze tieši vai netieši ietekmē gandrīz katru organisma orgānu vai audu (Tortora and Nielsem, 2010).

## 1.2 Hipofīzes neuroendokrīnie audzēji

Hipofīzes neuroendokrīnie audzēji (PitNET) ir labdabīgi intrakraniāli audzēji. Lai gan tie tiek klasificēti kā nemetastazējoši audzēji, vairumā gadījumu tie attīstās no vienas no adenohipofīzes šūnu līnijām un var ietekmēt hipofīzes hormonālo aktivitāti. Tas savukārt var izraisīt neatgriezeniskus multisistēmu bojājumus un palielināt priekšlaicīgas mirstības risku (Asa and Ezzat, 2009). PitNET var iespieties blakus esošajās struktūrās, izraisot masas efektu vai izpausties kā ektopiska slimība vai teratomas sastāvdaļa (Hodgson et al., 2020). Iepriekš PitNET tika uzskatīti par retiem, taču diagnostikas metožu attīstība ir parādījusi, ka to sastopamība ir lielāka, nekā iepriekš uzskatīts.

PitNET prevalence dažādos pētījumos ir ļoti atšķirīga. Kamēr daži pētījumi ir ziņojuši par 115,57 gadījumiem uz 100 000 cilvēkiem Islandē (Agustsson et al., 2015) vai 94 gadījumiem uz 100 000 cilvēku Beļģijā (Daly et al., 2006), metaanalīze 2004. gadā uzrādīja, ka PitNET izplatība bija 14,4% *post-mortem* pētījumos un 22,5% radioloģijas pētījumos (Ezzat et al., 2004). Klīniski nozīmīgi PitNET ir retāki - apmēram viens gadījums uz 1000 līdz 1300 cilvēkiem (Aflorei and Korbonits, 2014).

PitNET ir saistīti ar vecumu un dzimumu. To incidence ievērojami palielinās pacientiem pēc 45 gadu vecuma, un aptuveni divas trešdaļas PitNET gadījumu ir sastopami sievietēm (Gruppetta et al., 2013; Monson, 2000). Tiek uzskatīts, ka PitNET ir monoklonāla izcelsme un rodas primāras hipofīzes šūnu anomālijas dēļ. Agrīns tumorģenēzes notikums notiek vienā šūnā, kā rezultātā rodas hipofīzes šūnu kloniska populācija ar patoloģisku proliferāciju (Alexander et al., 1990; Herman et al., 1990; Jacoby et al., 1990). Lielākā daļa PitNET rodas sporādiski, bet ģimenes jeb iedzimtie PitNET veido aptuveni 5% gadījumu un bieži tie rodas pacientiem jaunākā vecumā un ir agresīvāki (Aflorei and Korbonits, 2014; Marques and Korbonits, 2017; Shen et al., 2019).

Ir pierādīts, ka PitNET ir vidēji 3,5 līdz 4,3 somatiskās mutācijas uz vienu audzēju. Mutācijām vairākos ģēnos, piemēram, menīna 1 (*MEN1*), aril ogļūdeņraža receptoru mijiedarbības proteīna (*AIP*), *GNAS* kompleksa lokusa (*GNAS*) un citos ģēnos ir cēloņsakarība ar audzēja attīstību, taču lielākā daļa PitNET atrasto mutāciju ir unikālas un reti atkārtojas starp audzējiem (Delemer, 2012; Hayward et al., 2001; Newey et al., 2013; Pepe et al., 2019; Song et al., 2016). Vairākos PitNET pētījumos ir konstatēta izmainīta audzēju supresoru ģēnu, onkogēnu, šūnu cikla regulatoru, transkripcijas regulatoru un epigenoma modifikatoru ekspresija, taču to rezultāti bieži ir pretrunīgi (Caimari and Korbonits, 2016; Hauser et al., 2019; Salomon et al., 2018)



### 1.3. Adenohipofīzes un PitNET šūnu sastāvs

Līdzīgi kā normāla adenohipofīze, PitNET var saturēt somatotrofas, laktotrofas, kortikotrofas, gonadotrofas un tirotrofas šūnas, kas ekspresē tām raksturīgos hormonus (attiecīgi GH, PRL, AKTH, LH, FSH un TRH). Daudzos gadījumos tas izraisa patoloģiski paaugstinātu konkrētā hormona līmeni PitNET pacienta asinsrites sistēmā, izraisot tālākas veselības problēmas (Tortora and Nielsem, 2010).

Folikulostelātu šūnas (FSC) ir zvaigžņveida folikulu-veidojošas endotēlija šūnas, kas sastāda 5–10% no adenohipofīzes. FSC ir savstarpēji saistītas, veidojot plašu trīs-dimensiju tīklu, kas ir iesaistīts barības vielu, jonu un atkritumu produktu mikrocirkulācijā, kā arī neuroendokrīno šūnu parakrīnajā regulēšanā (Čukuranović Kokoris et al., 2017; Delfin et al., 2021).

Marginālo šūnu slānis ir vienas šūnas slānis, kas atrodas ap Ratkes kabatas cistām. Šūnām šajā slānī ir raksturīga vispārātītu cilmes šūnu marķieru, piemēram, POU 5. klases, homeoboksa 1 (POU5F1) un SRY-boksa transkripcijas faktora 2 (SOX2), ekspresija. Marginālās šūnas *in vitro* apstākļos spēj veidot sfēras un diferencēties visos adenohipofīzes endokrīno šūnu veidos. Tiek uzskatīts, ka marginālo šūnu slānis ir cilmes šūnu niša, kas kalpo, lai atjaunotu hipofīzes šūnas organisma dzīves laikā (Garcia-Lavandeira et al., 2015, 2009).

Hipofīzes sānu populācijas (SP) šūnas ir raksturīgas ar to spēja izvadīt no sevis Hoechst 33342, kas, domājams, ir cilmes vai progenitoro šūnu īpašība (van Rijn et al., 2012). SP šūnas nav jāuzskata par vienu vienojošu šūnu tipu, bet gan par dažādiem šūnu tiem, kuriem ir kopīgas īpašības (Wolmarans et al., 2018).

Mezenhimālās cilmes šūnas (MSC) ir multipotentas stromālās šūnas. Tās ir atrodamas lielākajā daļā audzēju, un tām ir izšķiroša nozīme audzēja mikrovides veidošanās un tās darbības ietekmēšanā (Atiya et al., 2020). MSC ir plastiskas-adherentas, un tām ir specifisks proteīnu ekspresijas modelis, kā arī diferenciācijas spējas (Dominici et al., 2006). Šādas šūnas ir atklātas PitNET, taču to līdzdalība tumorģenēzē un audzēja darbībā ir nepietiekami pētīta (Caffarini et al., 2018).

PitNET primārās šūnas laboratorijas apstākļos var veidot sferoidus, kas tiek uzskatīti par pašatjaunošanās spējas pazīmi. Šīs sfēras veidojošās šūnas var ekspresēt *SOX2* gēnu, kas ir saistīts ar cilmes šūnu pluripotenci un hipofīzes plastiskumu. Tomēr to iesaistīšanās PitNET tumorģenēzē un to funkcionalitātē nav skaidra (Castinetti et al., 2011; Fauquier et al., 2008; Vankelecom and Gremaux, 2010; Würth et al., 2020).

## 1.4 PitNET diagnostika un klasifikācija

Agrīna PitNET diagnostika lielā mērā ir atkarīga no pacientu simptomu novērtējuma. Tās ir sākotnēji novērojamas PitNET izpausmes, kas dod pamatojumu turpmākai pacienta izmeklēšanai. Pamatojoties uz attēlveidošanas izmeklējumiem, PitNET iedala mazos (mikroPitNET < 10 mm), lielos (makroPitNET ≥ 10 mm) un gigantiskos (gigantPitNET ≥ 40 mm) audzējos (Trouillas et al., 2020). To invazivitāti apkārtējās struktūrās lielā mērā raksturo, izmantojot Knosp gradācijas sistēmu, iedalot tos pakāpēs no 0 līdz 4 (Knosp et al., 1993; Micko et al., 2015).

PitNET tiek klasificēti pēc to hormonālā profila un transkripcijas faktoru ekspresijas. Tie satur šūnu līnijas, par kurām zināms, ka tās ir atkarīgas no hipofīzes transkripcijas faktoru *PIT1*, *TPIT* un *SFI* ekspresijas, kas regulē šūnu diferenciāciju somatotrofajās, laktotrofajās, tirotofajās, kortikotrofajās un gonadotrofajās šūnās, kā arī sekojošu GH, PRL, TSH, AKTH, LH un FSH producēšanu un sekrēciju (Mete and Asa, 2020; Neou et al., 2020).

Somatotrofi PitNET satur *PIT1* ekspresējošas somatotrofās šūnas, un tie veido 10-15% no visiem PitNET. Tiem ir raksturīgs paaugstināts insulīnam līdzīgā augšanas faktora 1 (IGF-1) līmenis un paaugstināta GH sintēze un sekrēcija, kas var izraisīt akromegāliju vai gigantismu (Mete and Lopes, 2017; Osamura et al., 2008). Laktotrofi PitNET satur *PIT1* ekspresējošas laktotrofās šūnas, un tie veido gandrīz 50% no visiem PitNET. Tie visbiežāk rodas sievietēm vecumā no 20 līdz 50 gadiem, un tiem raksturīgs paaugstināts PRL līmenis asinīs. (Molitch, 2017). Tirotrofi PitNET satur *PIT1* ekspresējošas tirotofās šūnas, un tiem raksturīgs paaugstināts TSH līmenis, kas var izraisīt vairogdziedzerā disfunkciju. (Asa and Ezzat, 2009). Kortikotrofi PitNET satur *TPIT* ekspresējošas kortikotrofās šūnas. Tie sastāda aptuveni 15% no visiem PitNET, un tiem ir raksturīgs paaugstināts AKTH līmenis. Pacienti parasti ir novērojamas blakusslimības, kas saistītas ar hiperkortizolismu (Molitch, 2017). Aptuveni 20% no visiem kortikotrofo PitNET pacientiem attīstās Kušinga slimības bioķīmiskās un klīniskās izpausmes (Mete and Lopes, 2017; Osamura et al., 2008). Gonadotrofi PitNET satur *SFI* ekspresējošas gonadotrofās šūnas. Šie PitNET satur FSH un/vai LH, un pacientiem var konstatēt paaugstinātu šo hormonu līmeni (Mete and Lopes, 2017). Nefunkcionālie PitNET (NFPitNET) ir definēti kā labdabīgi adenohipofīzes audzēji, kas nav saistīti ar hormonālās hipersekrēcijas bioķīmiskajām vai klīniskajām pazīmēm. (Yavropoulou et al., 2020). Tie veido 14–54% no visiem diagnosticētajiem PitNET (Ntali and Wass, 2018).

## 1.5. Cirkulējošie biomarkēri un PitNET terapija

Hormonāli aktīvo PitNET gadījumā asinsritē cirkulējošie hormoni sniedz lielisku iespēju PitNET diagnostikai, kā arī tā augšanas un funkcionalitātes uzraudzībai novērošanas laikā. Tomēr attiecībā uz nefunkcionālajiem vai klusējošajiem PitNET cirkulējošie mikroRNS (miRNS) un, iespējams, cirkulējošā audzēja DNS (ctDNS) varētu būt noderīgi kā neinvazīvi biomarkēri. (Beylerli et al., 2020).

miRNS ir mazas, nekodējošas RNS, kas ir iesaistītas fundamentālos šūnu procesos, un to patoloģiska ekspresija dažādos audžējos, tostarp PitNET (Beylerli et al., 2020; Rupaimoole et al., 2016). Līdz šim daži miRNS, piemēram, miRNA-423-5p, miR-143-3p, miR-16-5p un miR-7g-5p, ir identificēti kā ticami PitNET markēru kandidāti. Ir pierādīts, ka to ekspresijas līmeņi mainās atkarībā no PitNET klātbūtnes, un to funkcijas ir saistāmas ar tumorģenģzes procesiem (Belaya et al., 2020; J et al., 2015; Nģmeth et al., 2019; Zhao et al., 2019). Šģnu brģvģ DNS (cfDNS) ir fragmentģta DNS, ko asinsritģ izdala mirģšģ sģnas. cfDNS, ko izdala mirģšģ audzģja sģnas (ctDNS) (Diehl et al., 2005) parasti satur tģdas pašģ mutģcijas kģ audzģjs un var atspoguļģt audzģja tģ brģģa ģenģtisko fonu (Gossing et al., 2020). To noteikģšana ir izrģdģjusies noderģga vairģkiem vģģa veidiem (Hirsch et al., 2006; Takeshita et al., 2017). Neskatģties uz potenciģlo lietderģbu, pģtģjumi šģjģ virzienģ ir reti. Tģpģc ir nepieciešģms vairģk pģtģjumu, lai novģrtģtu ctDNS izmantoģšanu PitNET gadģjumģ.

Ķirurgģskģ rezekcija, somatostatģna vai dopamģna analogu terapija un staru terapija ir primģrģs PitNET terapijas iespģjas. Tģs var papildģnģt vienu otru, un kopģjģ ārstģšanas stratģģģja var bģt atkarģga no PitNET veida un funkcionalitģtes (Molitch, 2017). Ķirurgģskģ rezekcija ir galvenģ terapijas izvģle lielģkģjģ daļģ PitNET gadģjumu (Zhang et al., 2020). Remisģjas lģmeni var sasniegt 40% līdz 90% pacientu (Molitch, 2017). Somatostatģna (SST) analogus un dopamģna receptoru agonistus plaģģ izmanto galvenokģrt somatotrofo un laktotrofo PitNET gadģjumos. SST un tģ analogi, piemģram, oktreotģds un lanreotģds, vai dopamģns un tģ analogi, piemģram, bromokriptģns un kabergolģns, iedarbojas uz PitNET šģnģm caur somatostatģna un dopamģna receptoriem. To aktivizģģšana var izraisģt daģģdus signģlģeļģs atkarģbģ no apakģstipa un agonista ģpaģģbģm. Kopumģ līdz 52% pacientu var panģkt audzģja izmģra samazinģģanos un slimģbas bioķģmģsko kontroli (Cakir et al., 2010; Iyer and Molitch, 2011; Molitch, 2017).

## 2 MATERIĀLI UN METODES

### 2.1 Paraugu ievākšana un saistītie procesi

Visi paraugi un klīniskā informācija iegūta no pacientiem, kuriem tika veiktas plānotas PitNET rezekcijas Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā un Rīgas Austrumu universitātes slimnīcā. Visi pacienti tika iekļauti Valsts iedzīvotāju genoma datu bāzē (VIGDB), kas ir valsts finansēta nacionāla biobanka (Rovite et al., 2018). Gan biobankas ietvaros veiktās darbības, gan PitNET pētījumus ir apstiprinājusi Latvijas Centrālā medicīnas ētikas komiteja. Paraugu iegūšanas un izpētes process atbilst Helsinku deklarācijai. Klīnisko informāciju, kas attiecas uz pētījumiem, ieguva apmācīti klīnikas speciālisti.

Genomiskā DNS paraugu iegūšanai pilnasīņu paraugi tika ievākti etilēndiamīntetraetiķskābes (EDTA) vakutaineros no pacientiem pirms rezekcijas un arī 24 stundas pēc rezekcijas. Serums, plazma un baltās asins šūnas tiek atdalītas 2 dienu laikā no ievākšanas dienas. Genomiskā DNS (gDNS) tika iegūta no baltajām asins šūnām standartizētos biobankas procesos (Rovite et al., 2018). Plazmas paraugi tika iegūti, centrifugējot pilnasinis 10 minūtes pie 2000 g istabas temperatūrā. Pēc tam augšējie plazmas slāņi tika pārnesti uz jauniem 15 ml stobriņiem un centrifugēti 10 minūtes pie 4000 g istabas temperatūrā. cfDNS tika izdalīta no 2 ml plazmas, izmantojot QIAamp Cirkulējošo nukleīnskābju reaģentu komplektu (Qiagen, Vācija), ievērojot ražotāja norādījumus.

Pēc rezekcijas ķirurgs rūpīgi ar skalpeli atdalīja PitNET audu paraugus no visiem pievienotajiem audu veidojumiem. Katrs paraugs tika sadalīts divās daļās. Viena daļa tika iegremdēta Dulbeko modificēta Īgla barotnē (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, ASV), kas satur 1x penicilīna/streptomocīna šķīdumu (GIBCO, ASV) šūnu kultūras pētījumiem, bet otra daļa tika iegremdēta RNAlater šķīdumā (Thermo Fisher Scientific, ASV) DNS un RNS ekstrakcijai. 20 līdz 30 mg audu paraugi no operācijas materiāla, kas paredzēti somatiskās DNS (sDNS) un RNS ekstrakcijai, vai  $4 \times 10^6$  kultivētas šūnas tika lizētas, izmantojot lizēšanas matriksu D un FastPrep-24 homogenizatoru (MP Biomedicals, ASV). sDNS un RNS tika izdalītas no homogenizētā lizāta, izmantojot AllPrep DNA/RNA Mini reaģentu komplektu (Qiagen, Vācija) vai mirVana™ miRNA izolēšanas reaģentu komplektu (Thermo Fisher Scientific, ASV), ievērojot ražotāja norādījumus. Plazmas, seruma, balto asins šūnu un DNS alikvotas tika uzglabātas -80°C temperatūrā. Qubit™ fluorometrs (Thermo Fisher Scientific Inc., ASV) tika izmantots precīzai DNS un RNS kvantifikācijai.

## 2.2. PitNET šūnu kultūru izveide

Audu paraugi tika sadalīti ar skalpeli, skaloti DMEM barotnē ar 1x Gibco antibiotisku-antimikotisku šķīdumu (Thermo Fisher Scientific, ASV) un tālāk sadalīti pipetējot. Audzēja šūnas tika atbrīvotas no audiem, fermentatīvi apstrādājot ar akutāzes šķīdumu (Thermo Fisher Scientific, ASV) 20 minūtes +37°C uz rotējošas platformas paaugstināta mitruma atmosfērā, kas uzturēta pie 5% CO<sub>2</sub>. Inkubācijas beigās šūnas tika suspendētas, centrifugējot (5 minūtes, 360 g). Lai samazinātu sarkano asins šūnu piesārņojumu, suspendētās šūnas 10 minūtes inkubēja sarkano asins šūnu līzes buferšķīdumā (154 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA, pH 7,4). Paraugu centrifugēja, un suspendētās šūnas divreiz skaloja, lai noņemtu sarkano asins šūnu atliekas.

Lai iegūtu multipotentas MSC, suspendētās un skalotās šūnas tika audzētas DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific, ASV) ar 1% L-glutamīnu (Thermo Fisher Scientific, ASV), 10% liellopu augļa serumu (FBS), ES šūnu kvalificētu (Thermo Fisher Scientific, ASV), 1% ITS Premix universālo kultūru piedevu (Corning, ASV) un 0,5% primocīnu (InvivoGen, ASV) līdz konfluences sasniegšanai. Šūnu kultūras tika pavairotas un pasāžas vismaz 2–6 reizes, un šūnas sākot ar trešo pasāžu tika izmantotas turpmākiem eksperimentiem. Visas šūnu kultūru kultivēšanas un inkubācijas visā pētījuma laikā tika veiktas +37°C temperatūrā, pie 95% gaisa un 5% CO<sub>2</sub>.

Lai iegūtu no PitNET atvasinātās brīvi peldošās sfēras, šūnas tika audzētas DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific, ASV), kas satur 1x penicilīna/streptomicīna šķīdumu, 20 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich, Vācija), 10 ng/ml pamata fibroblastu augšanas faktoru (bFGF) (Sigma-Aldrich, Vācija) un 1x B27 piedevu (GIBCO, ASV), primārās hipofīzes sfēras tika kultivētas sfēras veicinošā vidē līdz 2 mēnešiem.

## 2.3. Imūncitokīmija un imūnhistokīmija

PitNET audu IHC(P) analīze veikta sadarbībā ar Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas institūtu. Papildus parastajai hematoksilīna un eozīna krāsošanai audu paraugi tika analizēti arī ar šādām antivielām: anti-GH, anti-PRL, anti-ACTH, anti-TSHβ, anti-LHβ, anti-FSHβ, anti-FSHα, anti-SSTR2, anti-SSTR5, anti-AIP, anti-CK8 un anti-TBX19. Krāsošana tika veikta ar automatizētu Dako IHC Stain sistēmu. Proteīnu ekspresiju novērtēja apmācīti histopatologi, izmantojot 0-3 atzīmju sistēmu (1 = <30% pozitīvo šūnu; 2 = 30-70% pozitīvo šūnu; 3 = >70% pozitīvo šūnu). Tika veiktas papildu piezīmes par proteīnu ekspresijas modeļu īpašībām.

MSC imunofluorescējošai krāsošanai šūnas tika mazgātas ar fosfāta buferšķīdumu (PBS) un fiksētas ar 4% paraformaldehīdu 15 minūtes istabas temperatūrā. Permeabilizācijai tika izmantots 0,1% Triton X-100. Nespecifisko antivielu saistīšanās tika bloķēta, inkubējot paraugus 30 minūtes PBS ar 2% liellopu seruma albumīnu (BSA). Paraugi tika analizēti ar sekojošām antivielām: anti-VIM, anti-NES, anti-GFAP, anti-ATXN1, anti-TUBB3, anti-A2B5, anti-OLIG2 un anti-SLC1A3. Paraugi tika iekrāsoti ar 4,6-diamidino-2-fenilindolu (DAPI) un ievietoti Prolong Diamond pretizbalēšanas reaģentā (Thermo Fisher Scientific, ASV).

Hipofīzes sfēras tika ievāktas uz mikroskopa priekšmetstikliņiem, citospin centrifugācijas laikā pie 110 g 6 minūtes un fiksētas 50/50 acetona/metanolā 20 minūtes -20°C temperatūrā. Šūnas tika permeabilizētas ar 0,1% Triton X-100/PBS šķīdumu. Nespecifisko antivielu saistīšanās tika bloķēta, inkubējot paraugus 30 minūtes PBS ar 2% BSA. Paraugi tika analizēti ar sekojošām antivielām: anti-Pit-1, anti-NES, anti-CD15, anti-GFRa2, anti-NR5A1, anti-SOX2 un anti-CD90. Paraugi tika iekrāsoti ar DAPI un ievietoti Prolong Diamond pretizbalēšanas reaģentā (Thermo Fisher Scientific, ASV). Marķieru ekspresija sfērās tika uzskatīta par pozitīvu, ja vismaz dažas šūnas sfērā uzrādīja pozitīvu imunofluorescences signālu. Marķieru ekspresija sfērās tika uzskatīta par negatīvu, ja nevienai no sfēras šūnām nebija pozitīvas imunofluorescences signāls.

MSC raksturošanai ar plūsmas citometriju, šūnu virsmas antigēna fenotipa noteikšana tika veikta šūnām 3.–6. pasāzē. Šūnas tika atdalītas, izmantojot 0,2% tripsīna šķīdumu, un skaitītas. Šūnas tika sadalītas stobriņos pa  $1-5 \times 10^5$  šūnām, suspendētas un resuspendētas 100  $\mu$ l PBS, pH 7,4, kas satur 0,5% BSA. Paraugi tika analizēti ar sekojošām antivielām: CD34 PE konjugāts, CD90 FITC konjugāts, CD45 V450 konjugāts, CD44 APC konjugāts, CD105 PE konjugāts un CD133 APC konjugāts. Šūnas tika suspendētas, divas reizes skalotas ar PBS-BSA buferšķīdumu un atkārtoti resuspendētas 100  $\mu$ l buferšķīdumā. Sekojošā FACS analīze tika veikta ar BD Biosciences FACSAria plūsmas citometru (BD Biosciences, ASV).

#### 2.4. Šūnu eksperimenti

Šūnu proliferācijas tika pārbaudīta ar Cell Counting Kit-8 (Sigma-Aldrich, ASV) un mērīta pie 450 nm, izmantojot mikroplašu lasītāju Victor3™ (Perkin Elmer, ASV). Dati tika izteikti kā optiskā blīvuma (OB) attiecība noteiktā laika punktā salīdzinājumā ar sākotnējo OB.

Šūnu hormonālais profils tika pārbaudīts, inkubējot šūnas 24 stundas DMEM-F12 ar 1% L-glutamīnu un 1% ITS Premix universālo kultūras piedevu, kam sekoja 6 stundu inkubācija barotnē ar 10 nM GHRH somatotrofo PitNET kultūrām vai TRH (GenWay Biotech, ASV) laktotrofo PitNET kultūrām. Barotne tika mainīta ik pēc 30 minūtēm. Lai pārbaudītu atbilstošo hormonu klātbūtni, šūnu kultūras pēc inkubācijas tika analizētas ar sekojošām antivielām: anti-GH un anti-PRL.

Šūnu osteogēnā diferenciācija tika ierosināta, izmantojot osteogēnās diferenciācijas reaģentu komplektu (PromoCell, Vācija). Rezultējošā šūnu mineralizācija tika novērtēta, krāsojot šūnas ar 40 mM Alizarin Red S (pH 4,2) pēc fiksācijas 10% formalīnā. Šūnu adipogēnā diferenciācija tika veikta, izmantojot adipogēnos modulatorus. Diferenciācija tika veikta serumu un albumīnu nesaturošā DMEM-F12 barotnē, kas papildināta ar 2 μmol/l rosiglitazonu, 25 nmol/l deksametazonu, 0,5 mmol/l metilizobutilksantīnu, 0,1 μmol/l kortizolu, 0,01 nmol/l transferīnu, 0,2 nmol/l trijodtironīnu un 20 nmol/l cilvēka insulīnu. Pēc 4 dienām barotne tika mainīta, un šūnas tika tālāk kultivētas DMEM-F12, kas papildināts ar 0,1 μmol/l kortizolu, 0,01 mg/ml transferīnu, 0,2 nmol/l trijodtironīnu un 20 nmol/l cilvēka insulīnu. Lipīdu uzkrāšanās tika novērtēta pēc 10 dienām, krāsojot triglicerīdus ar Oil Red O krāsvielu (Sigma-Aldrich, ASV). Neirālajai un gliālajai diferenciācijai šūnas tika uzsētas uz Geltrex® substrāta (Thermo Fisher Scientific, ASV), KnockOut™ DMEM-F12 barotnē (Thermo Fisher Scientific, ASV) ar 1% L-glutamīnu, 0,5% primocīnu, StemPro® NSC SFM (Thermo Fisher Scientific, ASV), un 20 ng/ml EGF un bFGF. Pēc divām dienām barotne tika nomainīta pret šūnu tipam specifisku diferenciācijas barotni. Neirālajai diferenciācijai barotne tika nomainīta uz Neurobasal® barotni (Thermo Fisher Scientific, ASV) ar 1% L-glutamīnu un 2% B-27® bez-seruma piedevu. Astrocītu diferenciācijai tika izmantota DMEM barotne ar 1% L-glutamīnu, 1% FBS un 1% N-2 piedevu (Thermo Fisher Scientific, ASV). Oligodendrocītu diferenciācijai tika izmantota neurobazālā barotne ar 1% L-glutamīnu, 2% B-27® bez-seruma piedevu un 30 ng/ml trijod-L-tironīnu (Sigma-Aldrich, ASV). Barotne tika mainīta divas reizes nedēļā, līdz tika novērotas pirmās izmaiņas šūnu morfoloģijā.

## 2.5. Uz PCR un sekvenčēšanu balstīti eksperimenti

MSC gēnu ekspresija tika novērtēta ar qPCR. Totālā RNS (1 μg) tika reversi transkribēta komplementārajā DNS (kDNS), izmantojot randomā heksamēra primeri un RevertAid HMinus First Strand cDNS

sintēzes reaģentu komplektu. Reālā laika PCR analīze tika veikta, izmantojot VIIA™7 un TaqMan® gēnu ekspresijas testus gēniem: *SSTR1*, *SSTR2*, *SSTR3*, *SSTR4*, *SSTR5*, *DRD2*, *PROPI*, *PITX1*, *ISL1*, *POU1F1*, *POU5F1*, *SOX2* un *YWHAZ* (Thermo Fisher Scientific, ASV). Rezultāti tika analizēti, izmantojot salīdzinošo ( $2^{-\Delta C_t}$ ) metodi.

Hipofīzes sfēru visa genoma amplifikācijai (VGA) un eksomu sekvencēšanai atsevišķas sfēras tika manuāli ievāktas ar mikropipetes galu zem mikroskopa un pārnestas 4  $\mu$ l PBS. Šūnu līzes un VGA reakcijas tika veiktas, izmantojot Repli-g Single Cell reaģentu komplektu (Qiagen, Vācija). DNS bibliotēkas tika gatavotas ar Illumina Nextera TruSeq Exome reaģentu komplektu, un sekvencēšana tika veikta ar Illumina NextSeq 500/550 High Output v2 reaģentu komplektu (150 cikli). Eksomu reģionu definēšanai tika izmantots Illumina eksomu mērķa manifests TruSeq Rapid Exome TargetedRegions v1.2 (Illumina, ASV). Datu analīzei tika izmantota lietotne Illumina Basespace Enrichment (v3.0.0) ar noklusējuma iestatījumiem. Visi paraugi no viena pacienta tika salīdzināti mutācijas vietā, ko noteica ar Starling.

Sangera sekvencēšana tika veikta pacientu sDNS un gDNS, lai novērtētu GNAS c.601C>T un c.680A>T variantu klātbūtni. DNS tika amplificēta, izmantojot atbilstošā reģiona primerus, un sekvencēta, izmantojot BigDye ķīmiju un ABI PRISM 3130xl ģenētisko analizatoru (Thermo Fisher Scientific, ASV). Konkurētspējīga alēles-specifiska TaqMan PCR tika veikta sDNS un cfDNS no atlasītajiem paraugiem, izmantojot GNAS\_27887\_mu/c.601C>T/TaqMan® mutācijas detekcijas mutantās allēles pārbaudi un ViiA7 (Thermo Fisher Scientific, ASV). Reakcijā tika izmantoti 20 ng sDNS vai 2  $\mu$ l cfDNS paraugu.

Varianti, kas ir atrasti pacientu sDNS, bet ne gDNS, tika pārbaudīti attiecībā uz to klātbūtni atbilstošajos cfDNS paraugos. Atbilstošie cfDNS reģioni tika amplificēti, izmantojot HOT FIREPol R® (Solis BioDyne, Igaunija). NGS bibliotēkas tika sagatavotas, izmantojot Ion Plus fragmentu bibliotēku reaģentu komplektu. Veidnes-pozitīvo Ion PI™ Ion Sphere™ daļiņu sagatavošana tika veikta ar Ion OneTouch™ 2 instrumentu un Ion PI™ Hi-Q™ OT2 Solutions 200 reaģentu komplektu. Sagatavotās bibliotēkas tika sekvencētas, izmantojot Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Solution reaģentu komplektu, Ion PI™ Chip Kit V3 un Ion Proton Sistēmu (Thermo Fisher Scientific, ASV).



## 3 REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Šis darbs raksturo divas funkcionāli atšķirīgas nehormonālas primārās šūnu kultūras un parāda iespēju noteikt PitNET somatiskos variantus pacientu cfDNS. Šūnu kultūras tika iegūtas no izdalītiem PitNET audu paraugiem, izmantojot selektīvās augšanas principu dažādās šūnu kultūras barotnēs. Tika veikta turpmāka eksperimentālā analīze, lai veiktu šūnu tipu funkcionālo un ģenētisko raksturojumu un novērtētu to iespējamo izcelsmi. cfDNS paraugi tika iegūti no asins plazmas un pārbaudīti, izmantojot vairākas metodes ar dažādu jutīguma līmeni attiecībā uz ģenētiskajām variācijām, kuru klātbūtne attiecīgo pacientu PitNET audu paraugos ir zināma.

### 3.1 Multipotentas mezenhimāli stromālās šūnas

Lai analizētu PitNET šūnu saturu, audu paraugi tika iegūti no plānotām PitNET rezekcijām. Pēc audu dezintegrācijas un fermentatīvās apstrādes šūnu masas paraugi tika audzēti dažādos apstākļos, lai veicinātu dažādu šūnu tipu augšanu. Pirmajā gadījumā šūnas tika audzētas DMEM-F12 barotnē, kas papildināta ar L-glutamīnu, FBS un ITS Premix universālo kultūru piedevu. Šie apstākļi izraisīja plastmasas-adherentu šūnu kultūras augšanu ar fibroblastiem līdzīgu morfoloģiju. Lai izvairītos no iespējamās fibroblastu augšanas pētījuma sākumā, neliels paraugu skaits tika pārbaudīts paralēli, izmantojot DMEM barotni, kas satur L-valīnu pret D-valīnu, kas, kā ziņots, novērš fibroblastu augšanu (Hongpaisan, 2000), taču netika novērotas atšķirības to augšanas īpašībās un morfoloģijā.

Iegūtās šūnas bija spējīgas plaši proliferēt neatkarīgi no to sākotnējā audzēja veida, klīniskajām izpausmēm vai pacientu vecuma. Inkubējot tās vidē ar hipotalāma hormoniem, kas dabiski izraisa hipofīzes hormonu veidošanos, šūnas, kas iegūtas no somatotrofiem un laktotrofiem PitNET, nespēja izraisīt to izcelsmei atbilstošo specifisko hormonu producēšanu. Atšķirībā no audu paraugiem, šūnu kultūras uzrādīja tikai tik tikko konstatējamu hipofīzes parenhimālo šūnu marķieru *PROPI*, *PITX1*, *ISL1* un *POU1F1* ekspresiju, norādot, ka šīs šūnas, visticamāk, nav cēlušās no Ratkes kabatas.

Turpmākā eksomu analīze parādīja, ka šūnu kultūrās nav nevienas no ģenētiskajām mutācijām, kas tika konstatētas attiecīgajos PitNET audu paraugos. Tas norāda, ka, lai gan MSC atrodas audzēja audos, no kuriem tās ir ekstrahētās, tās veido tikai nelielu daļu no tiem. Ir nepieciešami

turpmāki pētījumi, lai analizētu cita veida šūnas audzējā, to proporcijas un funkcijas.

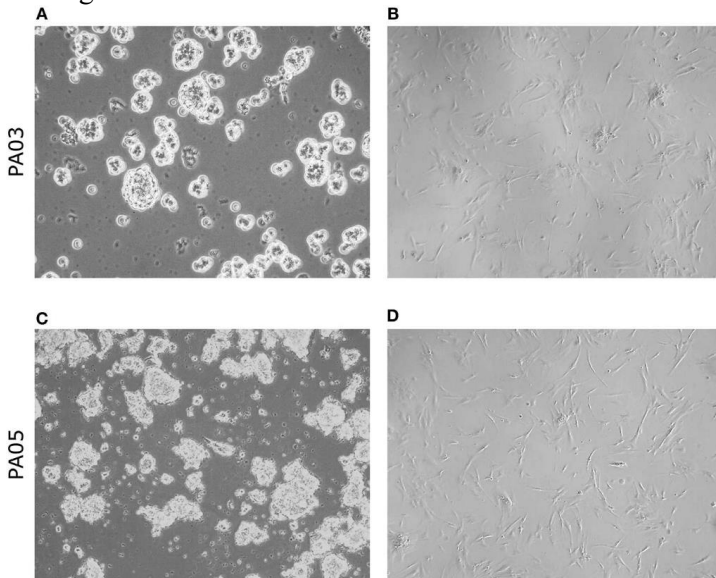
Gēnu ekspresijas analīze uzrādīja, ka šūnas ekspresē mezenhimālo cilmes šūnu marķierus CD44, CD90, CD105 un VIM. Turpmākie šūnu diferenciācijas eksperimenti uzrādīja, ka šīs šūnas ir spējīgas diferenciēties osteoblastos, adipocītos un daļēji arī nervu un gliālajās šūnās. Šie rezultāti norādīja, ka iegūtās šūnu kultūras, visticamāk, ir mezenhimālas cilmes veida stromālās šūnas, kas atrodas PitNET. Šūnu proliferācijas un pašatjaunošanās analīze liecināja, ka, lai gan šūnām ir noteikta multipotence, to cilmes īpašības ir apšaubāmas. Šie rezultāti atbilst Orciani un kolēģu atklājumiem (Orciani et al., 2015) bet mūsu rezultāti par parenhimālajiem marķieriem un somatiskajām mutācijām liecina, ka šīs šūnas neatspoguļo audzēju.

Vēsturiski MSC ir identificētas un iegūti no kaulu smadzenēm, un tās tiek uzskatīti par zelta standarta MSC pētījumiem. Lai gan pašlaik šūnas, kas atbilst plašajam MSC aprakstam, ir identificētas praktiski visos postnatālajos orgānos un audos, tām ir dokumentētas atšķirības proliferācijā, plasticitātē, virsmas marķieros, transkripcijas un proteomiskajā profilā no dažādiem avotiem. Tas norāda uz dažādu MSC apakšpopulāciju esamību ar atšķirīgiem ekspresijas profiliem un funkcionālajām īpašībām (Galland and Stamenkovic, 2020). Tāpēc sagaidāms, ka MSC populāciju ar dažām raksturīgām atšķirībām varētu atrasties arī hipofīzes audos.

Kopumā MSC ir spējīgas migrēt uz audzēja atrašanās vietām. Šāda MSC mobilizācija ir novērota vairākos vēža veidos. Kad MSC ir mobilizētas, audzēja radītie signāli var modulēt šo audzēju rekrutēto MSC fenotipu, kuras pēc tam kļūst par audzēja masas sastāvdaļām un satur pazīmes, kas atšķiras no normālu šūnu īpašībām (Galland and Stamenkovic, 2020; Kidd et al., 2009). PitNET gadījumā mēs nevaram stingri apstiprināt, ka šīs šūnas ir migrējušas audzējā no citām struktūrām, taču atšķirības starp PitNET audu paraugiem un atvasinātajām MSC kultūrām mutāciju un hipofīzes parenhīmas marķieru ekspresijas profilos norāda uz šādu iespēju. Šīs ģenētiskās atšķirības atbilst arī vispārējai tendencei literatūrā, analizējot MSC saistībā ar audzējiem, kur MSC galvenokārt tiek parādītas kā blakus esošas šūnas, kuras audzēji ietekmē un mobilizē, nevis pašas galvenās audzēju veidojošās šūnas. (Galland and Stamenkovic, 2020; Kucerova et al., 2015; Nwabo Kamdje et al., 2017; Poggi and Giuliani, 2016; Xing et al., 2013). Ir nepieciešami turpmāki pētījumi, lai noskaidrotu šo MSC izcelsmi, kā arī to lomu PitNET.

### 3.2 Hipofīzes sfēras veidojošās šūnas

Otrajā mēģinājumā iegūt šūnu kultūru pēc audu dezintegrācijas un fermentatīvās apstrādes šūnu masas paraugi tika audzēti serumu nesaturošā DMEM-F12 barotnē, pievienojot EGF, bFGF un B27 piedevu. Šie apstākļi rezultātējās no PitNET audiem iegūtu brīvi peldošu sfēru kultūras augšanā.



**1. attēls.** No PitNET paraugiem izolēto sfēru un MSC morfoloģija. Reprezentatīvi fāzes-kontrasta attēli no īstermiņā (4 dienas) kultivētām hipofīzes sfērām (A, C) un pirmās pasāžas MSC kultūras (B, D), kas izolēti no pacienta PitNET audu paraugiem PA03 (A, B) un PA05 (C, D). 200x palielinājums hipofīzes sfērām un 400x palielinājums MSC.

Sfēru veidošanas spēja arvien vairāk tiek uzskatīta par cilmes šūnu pazīmi. Spēja veidot sfēras bieži tiek izmantota, lai raksturotu dažādus cilmes šūnu marķierus ekspresējošo šūnu faktiskās cilmes šūnām raksturīgās īpašības. (Ando et al., 2018; Roose et al., 2017; Würth et al., 2017). Neskatoties uz to, PitNET hipofīzes sfēras veidojošo šūnu faktiskās īpašības ir nepietiekami pētītas, lai noskaidrotu to lomu PitNET tumorgēnēzē.

Visi analizētie sfēru paraugi ekspresēja hipofīzes parenhīmas marķierus PIT1 vai SF1, kas atbilst sākotnējo PitNET paraugu histoloģiskajiem un klīniskajiem tipiem. Šie atklājumi liecina, ka sfēras veidojošajām šūnām, visticamāk, ir vienāds izcelsmes modelis ar

hipofīzes parenhimālajām šūnām. Lielākā daļa analizēto hipofīzes paraugu ekspresēja gliā fibrilāri skābo proteīnu (GFRA2), kas, kā pierādīts, tiek ekspresēts hipofīzes cilmes/progenitorajās šūnās, kuras spēj veidot sfēras un diferencēties par hormonālajām šūnām (Vankelecom and Gremeaux, 2010). Visi analizētie hipofīzes sfēru paraugi ekspresēja CD15. Kamēr audos CD15 ekspresija tika novērota galvenokārt izolētās šūnās vai mazos klasteros, tā ekspresija sfērās bija visaptverošāka. Iepriekš ir ticis pierādīts, ka CD15 ekspresējošajām PitNET šūnām ir sfēru veidošanas, kā arī audzēja ierosināšanas spēja (Manoranjan et al., 2016). Šie atklājumi kopā liek domāt, ka iegūtās hipofīzes sfēras veidojošās šūnas rodas no hipofīzes un ka tās ir iesaistītas audzēja veidošanā.

Eksomu sekvencēšanas datu analīze atklāja zemu somatisko mutāciju skaitu katrā audzēja eksomā (vidējais = 5, 2, diapazons 3–7). Salīdzinot to ar rezultātiem no attiecīgajiem PitNET atvasinātajiem MSC un sfēru paraugiem, tika konstatēts, ka PitNET atvasinātās MSC nesatur mutācijas, kas raksturīgas oriģinālajiem audu paraugiem, kā minēts 3.1 nodaļā. Tikmēr oriģinālajos audzēja audu paraugos atrastās mutācijas var atrast un tās sakrīt ar mutācijām, kas konstatētas hipofīzes sfērās. Tas norāda, ka hipofīzes sfēras ģenētiski atbilst PitNET audiem, kas nozīmē, ka hipofīzes sfēras saturošās šūnas, iespējams, veido galveno audzēja audu masu.

Šie atklājumi kopā norāda, ka, lai gan MSC atrodas PitNET un tās ir salīdzinoši viegli kultivēt, ir jāturpina analizēt to ietekmi uz audzēju veidošanos un funkcijām, kā arī pielietojamību PitNET pētījumos kopumā. Tikmēr hipofīzes sfēras var izmantot kā PitNET veidojošo šūnu cilvēku modeļus.

Nesen Zhang un kolēģi izveidoja cilvēka PitNET audzēja modeli, kas uztur ļoti diferencētu AKTH sekretējošo kortikotrofo audzēju kultūru fenotipu (Zhang et al., 2021). Līdz šim publicētie rezultāti norāda uz iespēju, ka šis audzēja modelis varētu būt noderīgs, lai analizētu šūnas, kas veido PitNET hormonālo šūnu grupu. Tikmēr mūsu hipofīzes sfēru modeli varētu izmantot, lai analizētu šūnas, kas veido galveno audzēja masu. Lai gan šis modelis neietver audzēja parenhimālās šūnas, varētu būt noderīgi turpināt pētīt tā ietekmi uz kopējo audzēja augšanu un izmantot kā terapeitisku mērķi, lai samazinātu audzēja apjomu pirms citām, iespējams, ķirurģiskām intervencēm.

### 3.3 PitNET cirkulējošā audzēja DNS

cfDNS kopumā un ctDNS jo īpaši ir plaši pētītas kā perspektīvs šķidro biopsiju marķieris audzēja prognostikai un uzraudzībai. To noteikšana ir izrādījusies noderīga vairākiem vēža veidiem (Hirsch et al., 2006; Takeshita et al., 2017), taču ctDNS nav plaši pētīta PitNET kontekstā. Daļēji tas ir tāpēc, ka PitNET parasti ir lēni augoši audzēji, tāpēc sagaidāms, ka tiem būs zema ctDNS koncentrācija asinīs, taču, attīstoties molekulārās testēšanas metodēm, šī problēma kļūst mazāk aktuāla. Turklāt daļēji tas ir arī tāpēc, ka PitNET parasti ir zems mutācijas slogs, kā minēts 3.2 nodaļā.

Pirmajā mēģinājumā analizēt ctDNS no PitNET promocijas darba ietvaros tika izvēlēts labi zināms bieži sastopams somatiskais variants (c.601C>T) GNAS. Ir ziņots, ka mutācijas šajā gēna lokusā ir aptuveni 40% no visiem somatotrofajiem PitNET (Hayward et al., 2001; Välimäki et al., 2019). Variants tika identificēts sDNS paraugos no trim somatotrofajiem PitNET audu paraugiem, un tā nebija attiecīgo pacientu gDNS. Lai noteiktu šo variantu cfDNS, kas iegūts no attiecīgo pacientu plazmas, tika izmantoti cast-PCR un alēlēm specifiski TaqMan testi. Tā kā cfDNS daudzums, ko varēja iegūt no pacientu plazmas paraugiem, neatbilda cast-PCR ražotāja prasībām, katrai reakcijai tika izmantots maksimālais cfDNS daudzums neatkarīgi no tā koncentrācijas. Neskatoties uz salīdzinoši augsto cast-PCR varianta noteikšanas robežu 0,1–1,0% (Han et al., 2017), analizētais variants netika atklāts nevienā no cfDNS paraugiem. Teorētiski varētu spriest, ka atšķirīgus rezultātus varētu iegūt, ja cfDNS koncentrācija atbilstu cast-PCR ražotāja prasībām, bet pētījumā tika izmantotas metodes, kurām šādā gadījumā būtu nepieciešams pārāk liels sākotnējais asins parauga tilpums praktiskai adaptācijai klīniskajā praksē.

Otrajā mēģinājumā analizēt ctDNS no PitNET tika atlasīti 24 ģenētiskie varianti. Visi varianti tika atklāti PitNET pacientu sDNS, bet to nebija attiecīgo pacientu gDNS. cfDNS fragmenti, kas provizoriski satur šos variantus, tika tālāk amplificēti, iegūstot labas kvalitātes PCR fragmentus 17 no šiem variantiem no sešiem pacientiem. No šiem amplikoniem tika sagatavotas nākamās paaudzes sekvencēšanas bibliotēkas un sekvencētas ar Ion Torrent platformu. Deviņi no šiem variantiem nebija nosakāmi pārliecinošā līmenī, bet trīs varianti tika konstatēti 0,5-5,0% no kopējā nolasījumu skaita. Šie varianti ietvēra c.601C>T GNAS gēnā, ko nevarēja iepriekš identificēt ar cast-PCR un alēles specifisko TaqMan testu.

**1. tabula.** NGS rezultātu kopsavilkums. wt — savvaļas tipa alēle, alt — alternatīva alēle, **treknrakstā** norādīts alternatīvo alēļu pārklājums, *slīprakstā* norāda savvaļas tipa alēļu pārklājumu.

Pacienta ID	Gēns	Mutācijas pozīcija	W/alt alēle	Totālais pārklājums	Pārklājums			
					A	C	G	T
<b>Alternatīvā alēle sastāda no 40,00 % līdz 60,00 % no kopējā nolasījumu skaita</b>								
HA065	VPS13D	chr1:12368563	C/T	10585	6	5420	11	5148 (48.63 %)
HA065	LDLRAD2	chr1:22150575	C/T	7641	3	4033	8	3597 (47.07 %)
HA065	SPEN	chr1:16256795	A/G	444	225	0	218 (49.10 %)	1
HA066	GPATCH4	chr1:156565233	C/T	8726	9	3611	1	5105 (58.50 %)
HA066	G6PC2	chr2:169764546	C/G	1567	0	869	697 (44.48 %)	1
<b>Alternatīvā alēle sastāda no 0,50 % līdz 5,00 % no kopējā nolasījumu skaita</b>								
HA073	MPRIP	chr17:17068722	C/T	3066	0	2949	5	112 (3.65 %)
HA070	RYR1	chr19:38964226	G/A	882	20 (2.27 %)	0	862	0
HA090	GNAS	chr120:58909365	C/T	1744103	76	1730527	118	13382 (0.77 %)
<b>Nav alternatīvas alēles vai ir ar tādu pašu frekvenci kā tehnoloģiskās kļūdas</b>								
HA070	CLEC1B	chr12:10149329	G/A	2560	0	0	2539	1
HA073	ATF4	chr22:39918305	C/A	1336	0	0	1336	0
HA067	CLCNKA	chr1:16358671	C/G	1666	0	1664	0	2
HA067	SMARCAD1	chr4:95174031	A/G	8968	8958	2	8	0
HA067	PDE3A	chr12:20774260	G/A	13014	5	1	13008	0
HA067	MTFMT	chr15:65316064	A/T	5964	5950	0	13	1
HA070	CCDC138	chr2:109473249	G/A	4833	4	0	4829	0
HA070	FXR1	chr3:180633413	T/A	3117	1	6	1	3109
HA067	PRPF8	chr17:1563731	A/G	8239	8227	0	12	0

Var secināt, ka ctDNS koncentrācija PitNET gadījumā atrodas uz detekcijas robežas noteikšanai ar pusvadītāju sekvencēšanas tehnoloģijām. Šī iemesla dēļ, lai gan ar izmantoto metodi ir iespējams iegūt pozitīvus rezultātus, tas padara tās pielietojumu audzēja variantu novērošanai klīniskā vidē apšaubāmu. Citas molekulārās metodes, piemēram, digitālo pilienu PCR, varētu turpināt analizēt, lai izstrādātu jutīgākas uzraudzības metodes.

Diviem pacientiem pieci no analizētajiem variantiem tika atklāti 40%-60% nolasījumu. Jāpiemin, ka šo pacientu audzējos bija lielāks somatisko variantu skaits (272 un 671), nekā parasti novērots PitNET, taču netika novērotas klīniskas izpausmes, kas liecinātu par paaugstinātu agresivitāti vai recidīvu. Varētu izvirzīt hipotēzi, ka lielais ģenētisko izmaiņu daudzums šajos PitNET var veicināt mehānismus, kas ir iesaistīti ctDNS izdalīšanā, vai arī šie varianti varētu būt sastopami arī citos pacientu ķermeņa audos.

Šie atklājumi kopumā norāda, ka, lai gan pacientu asins plazmā ir iespējams noteikt PitNET somatiskos variantus, ir jāturpina analizēt jutīgākas metodes, lai tās būtu izmantojamas klīniskajos apstākļos. Jāturpina analizēt arī to, vai konstatēto cfDNS variantu avots ir PitNET.

## SECINĀJUMI

1. PitNET satur MSC, kas ģenētiski atšķiras no šūnām, kas veido galveno audzēja masu, un kurām trūkst audzējam raksturīgās vispārējās funkcionālās īpašības.
2. MSC klātbūtne PitNET un to proliferācijas spēja nav saistīta ar sākotnējā audzēja klīniskajām izpausmēm vai pacientu vecumu.
3. PitNET satur šūnas ar sfēru veidošanas spēju, kurām, visticamāk, ir kopīgs izcelsmes modelis ar hipofīzes parenhimālajām šūnām.
4. Hipofīzes sfēras ģenētiski atbilst PitNET galvenajai audzēja masai, un tās var izmantot kā PitNET audzēja šūnu funkcionalitātes modeli.
5. Somatiskās mutācijas, kas atrodas PitNET audos, ir atrodamas atbilstošos pacientu plazmas cfDNS paraugos, taču to detektējamība atšķiras starp pacientiem un arī starp viena un tā paša pacienta mutācijām.
6. Ir nepieciešams izpētīt efektīvākas cfDNS izolācijas metodes un jutīgākas mutāciju noteikšanas metodes, vienādojot cfDNS mutāciju noteikšanu starp pacientiem un atsevišķām mutācijām, lai izstrādātu uz ctDNS balstītu testu PitNET pacientiem.

## AIZSTĀVAMĀS TĒZES

1. MSC neatspoguļo PitNET funkcionalitāti, un to pielietojamība kā PitNET šūnu modelim ir apšaubāma.
2. PitNET satur šūnas ar sfēru veidošanas spēju, kas, iespējams, veido audzēju ierosinošās šūnas.
3. Hipofīzes sfēru modeli varētu izmantot kā cilvēka PitNET modeli šo audzēju padziļinātai izpētei.
4. Somatiskās mutācijas, kas atrodas PitNET audos, var atrast attiecīgo pacientu asins plazmas šķidrās biopsijās.
5. PitNET neinvazīva diagnostika, izmantojot asins plazmas cfDNS, varētu būt iespējama, pēc metodes jutīguma palielināšanas un klīniskas validācijas.

## ORIĢINĀLO PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

1. **Megnis K.**, Mandrika I., Petrovska R., Stukens J., Rovite V., Balcere I., Jansone L.S., Peculis R., Pirags V., Klovinis J. 2016. Functional Characteristics of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Pituitary Adenomas. *Stem Cells International*, 2016:1-11.
2. **Megnis K.**, Peculis R., Rovite V., Laksa P., Niedra H., Balcere I., Caune O., Breiksa A., Nazarovs J., Stukens J., Konrade I., Pirags V., Klovinis J. 2019. Evaluation of the Possibility to Detect Circulating Tumor DNA From Pituitary Adenoma. *Frontiers in Endocrinology*, 10:615.
3. Peculis R., Mandrika I., Petrovska R., Dortane R., **Megnis K.**, Nazarovs J., Balcere I., Stukens J., Konrade I., Pirags V., Klovinis J., Rovite V. 2020. Pituispheres Contain Genetic Variants Characteristic to Pituitary Adenoma Tumor Tissue. *Frontiers in Endocrinology*, 11:313.



## PĒTĪJUMA APROBĀCIJA

1. **Megnis K.**, Mandrika I., Balcer I., Caune O., Valtere A., Konrāde I., Nazarovs J., Breikša A., Stučēns J., Pīrāgs V., Kloviņš J. Functional Characteristics of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Pituitary Adenomas. LKI Simpozījs “Liquid Biopsies & Cancer”. Lēvena, Beļģija, 2017.
2. **Megnis K.**, Mandrika I., Balcer I., Caune O., Valtere A., Konrāde I., Nazarovs J., Stučēns J., Pīrāgs V., Kloviņš J. Adenohipofīzes adenomu multipotentu mezinhimāli stromālo šūnu funkcionālais raksturojums. RSU Zinātniskā Konference, Rīga, Latvija 2017.
3. Rovite V., Peculis P., Mandrika I., Petrovska R., **Megnis K.**, Balcere I., Stučēns J., Konrāde I., Breiksa A., Nazarovs J., Pīrāgs V., Kloviņš J. Tracing origin of cultured pituitary adenoma cells using “omics” analysis. Eiropas Cilvēka Ģenētikas Konference, Gēteborga, Zviedrija, 2019.
4. Niedra H., **Megnis K.**, Peculis R., Rovite V., Balcere I., Konrade I., Stukens J., Pirags V., Klovinš J. Detection of adenoma derived circulating cell-free DNA of human pituitary adenoma using semiconductor sequencing. Eiropas Cilvēka Ģenētikas Konference, Gēteborga, Zviedrija, 2019.
5. Saksis R., Silamikelis I., Laksa P., **Megnis K.**, Peculis R., Mandrika I., Rogoza O., Petrovska R., Balcere I., Konrade I., Steina L., Stukens J., Breiksa A., Nazarovs J., Sokolovska J., Pirags V., Klovinš J., Rovite V. Transcriptome alterations in pituitary neuroendocrine tumour tissue”, RSU Research Week 2021 online, Knowledge for Use in Practice, e-poster presentation, March 24 - 26th 2021.
6. Saksis R., Silamikelis I., Laksa P., **Megnis K.**, Peculis R., Mandrika I., Rogoza O., Petrovska R., Balcere I., Konrade I., Steina L., Stukens J., Breiksa A., Nazarovs J., Sokolovska J., Pirags V., Klovinš J., Rovite V. Transcriptome alteration landscape of pituitary neuroendocrine tumour tissue. Eiropas Endokrinoloģijas Kongress, Prāga, Čehijas Republika, 2021.

## PATEICĪBAS

Pētījums atbalstīts ar ERAF granta 2.1.1.1.0/14/APIA/VIAA/058 “Jaunu in vitro diagnostikas un prognostiskas līdzekļu izstrāde individualizētai audzēju un mitohondriālo saslimšanu ārstēšanai”, ERAF granta 1.1.1.1/16/A/066 “Molekulāro marķieru identificēšana hipofīzes adenomu veidošanās, attīstības gaitas un terapijas efektivitātes prognozēšanai”, ERAF grants 1.1.1.1/18/A/089 “Molekulārie RNS faktori hipofīzes adenomas attīstībā”, EEZ-NFI grants EEZ/NFI/S/2015/019 “Cilvēka kapitāla un zināšanu uzlabošana veselības zinātnēs ar iestāžu sadarbošanos un mobilitāti starp Latvijas Universitāti un trīs Norvēģijas universitātēm”, 8.2.2.0/20/I/006 "LU doktorantūras kapacitātes stiprināšana jaunā doktorantūras modeļa ietvarā" un Roche Akadēmijas projekta grants "Hipofīzes adenomas audu imunohistoķīmiskā analīze"

Sirsnīgi pateicos Valsts Iedzīvotāju genoma datu bāzei par iesaistīšanos dalībnieku rekrutēšanā un bioloģisko paraugu uzglabāšanā.

Īpašs paldies manai darba vadītājai Dr. biol. Vitai Rovītei par padomu un vadīšanu un kolēģiem no Molekulārās un funkcionālās genomikas grupas par atbalstu manā pētnieciskajā darbā.

Paldies Dr. biol., prof. Jānim Kloviņam un kolēģiem no Cilvēka ģenētikas un molekulārās medicīnas grupas, kā arī manu publikāciju līdzautoriem par lielisko darbu un sadarbību.

Īpašs paldies manām bijušajām studentēm Laimai Kondratovičai, Polai Ļaksai un Oļesjai Rogozai par ieguldījumu un praktisko palīdzību šī pētnieciskā darba īstenošanā.

Visbeidzot, es vēlos pateikties savai ģimenei un draugiem par morālo atbalstu, iedrošinājumu un sapratni visu studiju laikā.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

- Aflorei, E.D., Korbonits, M., 2014. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. *J. Neurooncol.* 117, 379–94.
- Agustsson, T.T., Baldvinsdottir, T., Jonasson, J.G., Olafsdottir, E., Steinthorsdottir, V., Sigurdsson, G., Thorsson, A. V., Carroll, P. V., Korbonits, M., Benediktsson, R., 2015. The epidemiology of pituitary adenomas in Iceland, 1955-2012: a nationwide population-based study. *Eur. J. Endocrinol.* 173, 655–64.
- Alexander, J.M., Biller, B.M., Bikkal, H., Zervas, N.T., Arnold, A., Klibanski, A., 1990. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J. Clin. Invest.* 86, 336–40.
- Ando, M., Goto, M., Hojo, M., Kita, A., Kitagawa, M., Ohtsuka, T., Kageyama, R., Miyamoto, S., 2018. The proneural bHLH genes Mash1, Math3 and NeuroD are required for pituitary development. *J. Mol. Endocrinol.* 61, 127–138.
- Asa, S.L., Ezzat, S., 2002. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat. Rev. Cancer* 2, 836–49.
- Asa, S.L., Ezzat, S., 2009. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annu. Rev. Pathol.* 4, 97–126.
- Atiya, H., Frisbie, L., Pressimone, C., Coffman, L., 2020. Mesenchymal Stem Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1234, 31–42.
- Belaya, Z., Khandaeva, P., Nonn, L., Nikitin, A., Solodovnikov, A., Sitkin, I., Grigoriev, A., Pikunov, M., Lapshina, A., Rozhinskaya, L., Melnichenko, G., Dedov, I., 2020. Circulating Plasma microRNA to Differentiate Cushing's Disease From Ectopic ACTH Syndrome. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 11, 331.
- Beylerli, O., Beeraka, N.M., Gareev, I., Pavlov, V., Yang, G., Liang, Y., Aliev, G., 2020. MiRNAs as Noninvasive Biomarkers and Therapeutic Agents of Pituitary Adenomas. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–15.
- Caffarini, M., Orciani, M., Trementino, L., Di Primio, R., Arnaldi, G., 2018. Pituitary adenomas, stem cells, and cancer stem cells: what's new? *J. Endocrinol. Invest.* 41, 745–753.
- Caimari, F., Korbonits, M., 2016. Novel Genetic Causes of Pituitary Adenomas. *Clin. Cancer Res.* 22, 5030–5042.
- Cakir, M., Dworakowska, D., Grossman, A., 2010. Somatostatin receptor biology in neuroendocrine and pituitary tumours: part 2--clinical implications. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2585–91.
- Castinetti, F., Davis, S.W., Brue, T., Camper, S.A., 2011. Pituitary stem cell update and potential implications for treating hypopituitarism. *Endocr. Rev.* 32, 453–71.
- Čukuranović Kokoris, J., Jovanović, I., Pantović, V., Krstić, M., Stanojković, M., Milošević, V., Ugrenović, S., Stojanović, V., 2017. Morphometric analysis of the folliculostellate cells and luteinizing hormone gonadotropic

- cells of the anterior pituitary of the men during the aging process. *Tissue Cell* 49, 78–85.
- Daly, A.F., Rixhon, M., Adam, C., Dempegioti, A., Tichomirowa, M.A., Beckers, A., 2006. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 4769–75.
- Delemer, B., 2012. MEN1 and pituitary adenomas. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 73, 59–61.
- Delfin, L., Mete, O., Asa, S.L., 2021. Follicular cells in pituitary neuroendocrine tumors. *Hum. Pathol.* 114, 1–8.
- Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, L.A., Goodman, S.N., David, K.A., Juhl, H., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 2005. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 16368–16373.
- 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* 8, 315–7.
- Ezzat, S., Asa, S.L., Couldwell, W.T., Barr, C.E., Dodge, W.E., Vance, M.L., McCutcheon, I.E., 2004. The prevalence of pituitary adenomas. *Cancer* 101, 613–619.
- Fauquier, T., Rizzoti, K., Dattani, M., Lovell-Badge, R., Robinson, I.C.A.F., 2008. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2907–12.
- Galland, S., Stamenkovic, I., 2020. Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J. Pathol.* 250, 555–572.
- Garcia-Lavandeira, M., Diaz-Rodriguez, E., Bahar, D., Garcia-Rendueles, A.R., Rodrigues, J.S., Dieguez, C., Alvarez, C. V., 2015. Pituitary Cell Turnover: From Adult Stem Cell Recruitment through Differentiation to Death. *Neuroendocrinology* 101, 175–92.
- Garcia-Lavandeira, M., Quereda, V., Flores, I., Saez, C., Diaz-Rodriguez, E., Japon, M.A., Ryan, A.K., Blasco, M.A., Dieguez, C., Malumbres, M., Alvarez, C. V., 2009. A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary. *PLoS One* 4, e4815.
- Gossing, W., Frohme, M., Radke, L., 2020. Biomarkers for Liquid Biopsies of Pituitary Neuroendocrine Tumors. *Biomedicines* 8.
- Gruppetta, M., Mercieca, C., Vassallo, J., 2013. Prevalence and incidence of pituitary adenomas: a population based study in Malta. *Pituitary* 16, 545–53.
- Han, X., Wang, J., Sun, Y., 2017. Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* 15, 59–72.

- Hauser, B.M., Lau, A., Gupta, S., Bi, W.L., Dunn, I.F., 2019. The Epigenomics of Pituitary Adenoma. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 10, 290.
- Hayward, B.E., Barlier, A., Korbonits, M., Grossman, A.B., Jacquet, P., Enjalbert, A., Bonthron, D.T., 2001. Imprinting of the G(s)alpha gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. *J. Clin. Invest.* 107, R31-6.
- Herman, V., Fagin, J., Gonsky, R., Kovacs, K., Melmed, S., 1990. Clonal origin of pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 1427–33.
- Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M., Bunn, P.A., Franklin, W.A., Dziadziuszko, R., Thatcher, N., Chang, A., Parikh, P., Pereira, J.R., Ciuleanu, T., von Pawel, J., Watkins, C., Flannery, A., Ellison, G., Donald, E., Knight, L., Parums, D., Botwood, N., Holloway, B., 2006. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 24, 5034–42.
- Hodgson, A., Pakbaz, S., Shenouda, C., Francis, J.-A., Mete, O., 2020. Mixed Sparsely Granulated Lactotroph and Densely Granulated Somatotroph Pituitary Neuroendocrine Tumor Expands the Spectrum of Neuroendocrine Neoplasms in Ovarian Teratomas: the Role of Pituitary Neuroendocrine Cell Lineage Biomarkers. *Endocr. Pathol.* 31, 315–319.
- Hongpaisan, J., 2000. Inhibition of proliferation of contaminating fibroblasts by D-valine in cultures of smooth muscle cells from human myometrium. *Cell Biol. Int.* 24, 1–7.
- Iyer, P., Molitch, M.E., 2011. Positive prolactin response to bromocriptine in 2 patients with cabergoline-resistant prolactinomas. *Endocr. Pract.* 17, e55-8.
- J, Z., Y, T., Y, Z., N, Q., C, C., D, T., L, X., 2015. MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy. *Cancer Cell Int.* 15.
- Jacoby, L.B., Hedley-Whyte, E.T., Pulaski, K., Seizinger, B.R., Martuza, R.L., 1990. Clonal origin of pituitary adenomas. *J. Neurosurg.* 73, 731–5.
- Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J.L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V.L., Weil, M., Andreeff, M., Marini, F.C., 2009. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 27, 2614–23.
- Knosp, E., Steiner, E., Kitz, K., Matula, C., 1993. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery* 33, 610–7; discussion 617-8.
- Kucerova, L., Zmajkovic, J., Toro, L., Skolekova, S., Demkova, L., Matuskova, M., 2015. Tumor-driven Molecular Changes in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Cancer Microenviron.* 8, 1–14.
- Larkin, S., Ansorge, O., 2000. Development And Microscopic Anatomy Of The Pituitary Gland, Endotext. MDText.com, Inc.
- Manoranjan, B., Mahendram, S., Almenawer, S.A., Venugopal, C., McFarlane, N., Hallett, R., Vijayakumar, T., Algird, A., Murty, N.K., Sommer, D.D.,

- Provias, J.P., Reddy, K., Singh, S.K., 2016. The identification of human pituitary adenoma-initiating cells. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 125.
- Marques, P., Korbonits, M., 2017. Genetic Aspects of Pituitary Adenomas. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 46, 335–374.
- Mete, O., Asa, S.L., 2020. Structure, Function, and Morphology in the Classification of Pituitary Neuroendocrine Tumors: the Importance of Routine Analysis of Pituitary Transcription Factors. *Endocr. Pathol.*
- Mete, O., Lopes, M.B., 2017. Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr. Pathol.* 28, 228–243.
- Micko, A.S.G., Wöhrer, A., Wolfsberger, S., Knosp, E., 2015. Invasion of the cavernous sinus space in pituitary adenomas: endoscopic verification and its correlation with an MRI-based classification. *J. Neurosurg.* 122, 803–11.
- Molitch, M.E., 2017. Diagnosis and Treatment of Pituitary Adenomas: A Review. *JAMA* 317, 516–524.
- Monson, J.P., 2000. The epidemiology of endocrine tumours. *Endocr. Relat. Cancer* 7, 29–36.
- Németh, K., Darvasi, O., Likó, I., Szücs, N., Czirják, S., Reiniger, L., Szabó, B., Krokker, L., Pállinger, É., Igaz, P., Patócs, A., Butz, H., 2019. Comprehensive analysis of circulating microRNAs in plasma of patients with pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104, 4151–4168.
- Neou, M., Villa, C., Armignacco, R., Jouinot, A., Raffin-Sanson, M.-L., Septier, A., Letourneur, F., Diry, S., Diedisheim, M., Izac, B., Gaspar, C., Perlemoine, K., Verjus, V., Bernier, M., Boulin, A., Emile, J.-F., Bertagna, X., Jaffrezic, F., Laloe, D., Baussart, B., Bertherat, J., Gaillard, S., Assié, G., 2020. Pangenomic Classification of Pituitary Neuroendocrine Tumors. *Cancer Cell* 37, 123-134.e5.
- Newey, P.J., Nesbit, M.A., Rimmer, A.J., Head, R.A., Gorvin, C.M., Attar, M., Gregory, L., Wass, J.A.H., Buck, D., Karavitaki, N., Grossman, A.B., McVean, G., Ansorge, O., Thakker, R. V., 2013. Whole-exome sequencing studies of nonfunctioning pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E796-800.
- Ntali, G., Wass, J.A., 2018. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 21, 111–118.
- Nwabo Kamdje, A.H., Kamga, P.T., Simo, R.T., Vecchio, L., Seke Etet, P.F., Muller, J.M., Bassi, G., Lukong, E., Goel, R.K., Amvene, J.M., Krampera, M., 2017. Mesenchymal stromal cells' role in tumor microenvironment: involvement of signaling pathways. *Cancer Biol. Med.* 14, 129–141.
- Ooi, G.T., Tawadros, N., Escalona, R.M., 2004. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol. Cell. Endocrinol.* 228, 1–21.
- Orciani, M., Davis, S., Appolloni, G., Lazzarini, R., Mattioli-Belmonte, M., Ricciuti, R.A., Boscaro, M., Di Primio, R., Arnaldi, G., 2015. Isolation and characterization of progenitor mesenchymal cells in human pituitary tumors. *Cancer Gene Ther.* 22, 9–16.

- Osamura, R.Y., Kajiya, H., Takei, M., Egashira, N., Tobita, M., Takekoshi, S., Teramoto, A., 2008. Pathology of the human pituitary adenomas. *Histochem. Cell Biol.* 130, 495–507.
- Pariante, C.M., Vassilopoulou, K., Velakoulis, D., Phillips, L., Soulsby, B., Wood, S.J., Brewer, W., Smith, D.J., Dazzan, P., Yung, A.R., Zervas, I.M., Christodoulou, G.N., Murray, R., McGorry, P.D., Pantelis, C., 2004. Pituitary volume in psychosis. *Br. J. Psychiatry* 185, 5–10.
- Pepe, S., Korbonits, M., Iacovazzo, D., 2019. Germline and mosaic mutations causing pituitary tumours: genetic and molecular aspects. *J. Endocrinol.* 240, R21–R45.
- Platta, C.S., Mackay, C., Welsh, J.S., 2010. Pituitary adenoma: a radiotherapeutic perspective. *Am. J. Clin. Oncol.* 33, 408–19.
- Poggi, A., Giuliani, M., 2016. Mesenchymal Stromal Cells Can Regulate the Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Vaccines* 4.
- Roose, H., Cox, B., Boretto, M., Gysemans, C., Vennekens, A., Vankelecom, H., 2017. Major depletion of SOX2+ stem cells in the adult pituitary is not restored which does not affect hormonal cell homeostasis and remodelling. *Sci. Rep.* 7, 16940.
- Rovite, V., Wolff-Sagi, Y., Zaharenko, L., Nikitina-Zake, L., Grens, E., Klovinš, J., 2018. Genome Database of the Latvian Population (LGDB): Design, Goals, and Primary Results. *J. Epidemiol.* 28, 353–360.
- Rupaimoole, R., Calin, G.A., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., 2016. miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov.* 6, 235–46.
- Salomon, M.P., Wang, X., Marzese, D.M., Hsu, S.C., Nelson, N., Zhang, X., Matsuba, C., Takasumi, Y., Ballesteros-Merino, C., Fox, B.A., Barkhoudarian, G., Kelly, D.F., Hoon, D.S.B., 2018. The Epigenomic Landscape of Pituitary Adenomas Reveals Specific Alterations and Differentiates Among Acromegaly, Cushing’s Disease and Endocrine-Inactive Subtypes. *Clin. Cancer Res.* 24, 4126–4136.
- Shen, A.J.J., King, J., Scott, H., Colman, P., Yates, C.J., 2019. Insights into pituitary tumorigenesis: from Sanger sequencing to next-generation sequencing and beyond. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 14, 399–418.
- Song, Z.-J., Reitman, Z.J., Ma, Z.-Y., Chen, J.-H., Zhang, Q.-L., Shou, X.-F., Huang, C.-X., Wang, Y.-F., Li, S.-Q., Mao, Y., Zhou, L.-F., Lian, B.-F., Yan, H., Shi, Y.-Y., Zhao, Y., 2016. The genome-wide mutational landscape of pituitary adenomas. *Cell Res.* 26, 1255–1259.
- Takeshita, T., Yamamoto, Y., Yamamoto-Ibusuki, M., Tomiguchi, M., Sueta, A., Murakami, K., Omoto, Y., Iwase, H., 2017. Analysis of ESR1 and PIK3CA mutations in plasma cell-free DNA from ER-positive breast cancer patients. *Oncotarget* 8, 52142–52155.
- Tortora, G.J., Nielsm, M., 2010. *Principles of Human Anatomy*, 12th ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Trouillas, J., Jaffrain-Rea, M.-L., Vasiljevic, A., Raverot, G., Roncaroli, F.,

- Villa, C., 2020. How to Classify the Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020. *Cancers (Basel)*. 12, 1–17.
- Välämäki, N., Schalin-Jääntti, C., Karppinen, A., Paetau, A., Kivipelto, L., Aaltonen, L.A., Karhu, A., 2019. Genetic and Epigenetic Characterization of Growth Hormone-Secreting Pituitary Tumors. *Mol. Cancer Res.* 17, 2432–2443.
- van Rijn, S.J., Gremeaux, L., Riemers, F.M., Brinkhof, B., Vankelecom, H., Penning, L.C., Meij, B.P., 2012. Identification and characterisation of side population cells in the canine pituitary gland. *Vet. J.* 192, 476–82.
- Vankelecom, H., Gremeaux, L., 2010. Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 478–88.
- Wolmarans, E., Nel, S., Durandt, C., Mellet, J., Pepper, M.S., 2018. Side Population: Its Use in the Study of Cellular Heterogeneity and as a Potential Enrichment Tool for Rare Cell Populations. *Stem Cells Int.* 2018, 2472137.
- Würth, R., Barbieri, F., Pattarozzi, A., Gaudenzi, G., Gatto, F., Fiaschi, P., Ravetti, J.-L., Zona, G., Daga, A., Persani, L., Ferone, D., Vitale, G., Florio, T., 2017. Phenotypical and Pharmacological Characterization of Stem-Like Cells in Human Pituitary Adenomas. *Mol. Neurobiol.* 54, 4879–4895.
- Würth, R., Thellung, S., Corsaro, A., Barbieri, F., Florio, T., 2020. Experimental Evidence and Clinical Implications of Pituitary Adenoma Stem Cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 11, 54.
- Xing, B., Kong, Y.G., Yao, Y., Lian, W., Wang, R.Z., Ren, Z.Y., 2013. Study on the expression levels of CXCR4, CXCL12, CD44, and CD147 and their potential correlation with invasive behaviors of pituitary adenomas. *Biomed. Environ. Sci.* 26, 592–8.
- Yavropoulou, M.P., Tsoi, M., Barkas, K., Kaltsas, G., Grossman, A., 2020. The natural history and treatment of non-functioning pituitary adenomas (non-functioning PitNETs). *Endocr. Relat. Cancer* 27, R375–R390.
- Zhang, D., Hugo, W., Redublo, P., Miao, H., Bergsneider, M., Wang, M.B., Kim, W., Yong, W.H., Heaney, A.P., 2021. A human ACTH-secreting corticotroph tumoroid model: Novel Human ACTH-Secreting Tumor Cell in vitro Model. *EBioMedicine* 66, 103294.
- Zhang, J., Wang, Y., Xu, X., Gu, Y., Huang, F., Zhang, M., 2020. Postoperative complications and quality of life in patients with pituitary adenoma. *Gland Surg.* 9, 1521–1529.
- Zhao, S., Li, J., Feng, J., Li, Z., Liu, Q., Lv, P., Wang, F., Gao, H., Zhang, Y., 2019. Identification of Serum miRNA-423-5p Expression Signature in Somatotroph Adenomas. *Int. J. Endocrinol.* 2019, 8516858.



