

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

BAKALaura DARBS

RĪGA 2019

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE

**OGĻSKĀBES ANHIDRĀZES IX EKSPRESIJA GAIŠO ŠŪNU
NIERU KARCINOMAS ŠŪNĀS**

BAKALaura DARBS

Autors: 3. kursa studente **Agnese Rudzīte**

Studenta apliecības Nr.: ar16064

Darba vadītājs: MSc. Chem. Kārlis Pleiko

RĪGA 2019

ANOTĀCIJA

Gaišo šūnu nieru karcinoma mūsdienās ir viens no visbiežāk diagnosticētajiem audzēju veidiem, un, lai gan mirstība no tās samazinās, pašlaik terapijā lietoto medikamentu efektivitāte ir zema. Viens no iemesliem ķīmijterapijas neefektivitātei un ccRCC invazivitātei ir paaugstināta ogļskābes anhidrāzes IX ekspresija. Šajā pētījumā, izmantojot plūsmas citometriju, tika analizēta CA IX ekspresija gaišo šūnu nieru karcinomas šūnu līnijas un primārajās no pacienta izdalītajās ccRCC šūnās. Pētījumā tika apstiprināts zinātniskajā literatūrā aprakstītais, ka ccRCC šūnu līnijā (RCC-MF) attiecībā pret nieru proksimālo kanāliņu šūnu līniju (RC-124) ir novērojama paaugstināta CA IX ekspresija šūnu membrānās, taču, analizējot primārās ccRCC šūnas, CA IX ekspresijas izmaiņas netika novērotas, norādot uz atšķirīgo CA IX ekspresijas profilu no pacienta iegūtajās primārajās šūnās, kas precīzāk reprezentē audzēja heterogenitāti.

Atslēgvārdi: ogļskābes anhidrāze IX, gaišo šūnu nieru karcinoma, plūsmas citometrija

ANNOTATION

Clear cell renal carcinoma nowadays is one of the most commonly diagnosed tumor types, and although mortality is decreasing, the effectiveness of currently used medications is low. One reason for the ineffectiveness of chemotherapy and ccRCC invasiveness is increased expression of carbonic anhydrase IX. In this study CA IX expression in clear cell renal carcinoma cell lines and primary ccRCC cells isolated from patient were analyzed using flow cytometry. The study confirmed statements in scientific literature, that ccRCC cell line (RCC-MF) relative to proximal tubular cell line (RC-124) in cell membranes has elevated CA IX expression, but analyzing the primary ccRCC cells, changes in expression of CA IX were observed, indicating diverse CA IX expression profile in primary cells acquired from patient, which more accurately represents tumor heterogeneity.

Keywords: carbonic anhydrase IX, clear cell carcinoma, flow cytometry

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS	9
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	11
1.1. Nieru šūnu karcinoma un tās apakštipi.....	11
1.1.1. Gaišo šūnu nieru karcinoma	11
1.2. Epidemioloģija un riska faktori.....	12
1.2.1. Ģenētiskās izmaiņas ccRCC	14
1.3. ccRCC pieejamās ārstēšanas metodes	21
1.4. Ogļskābes anhidrāzes	27
1.4.1. Ogļskābes anhidrāze IX	28
1.4.2. pH izmaiņas audzēja šūnās	29
1.4.3. Potenciālās zāļu vielas, kas mērķētas uz CA IX inhibīciju.....	32
2. MATERIĀLI UN METODES	34
2.1. Šūnu atsaldēšana un izsēšana	34
2.2. Šūnu pārsēšana	35
2.3. Plūsmas citometrija.....	36
2.4. CA IX antivielas titrēšana plūsmas citometrijas metodes izstrādei	38
3. REZULTĀTI.....	39
3.1. Šūnu kultivēšana	39
3.2. Šūnu skaitīšana.....	40
3.3. Plūsmas citometrija.....	42
SECINĀJUMI	55
PATEICĪBA	56
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	57
DOKUMENTĀRĀ LAPA	63

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

4E-BP1/eIF4E – 4E-BP1/eikariotu translācijas iniciācijas faktors 4E;

Akt – proteīnkināze B;

APC – allofikocianīns;

ATM – *ataxia-telangiectasia* mutēta proteīnkināze

AXL – AXL receptoru tirozīnkināze;

BAF180 – PBRM1 kodētais proteīns;

BAP1 – ubikvitīna karboksil-termināla hidrolāzes gēns;

BPDE – benzo- α -pirēna-diola epoksīds;

CA – ogļskābes anhidrāze;

ccRCC – gaišo šūnu nieru karcinoma;

CDK – ciklīna atkarīgā kināze;

c-KIT – cilmes šūnu augšanas faktora receptori;

CTLA4 – citotoksisko T limfocītu saistītā olbaltumviela 4;

DUB – kodola deubikvitināze;

E2F1 – E2F transkripcijas faktors 1;

EGF – epidermālais augšanas faktors;

Fab – cilvēka antivielas fragments;

FBS – liellopa fetālais serums;

FGFR – fibroblastu augšanas faktoru receptori;

FKBP12 – citoplazmas proteīna FK506 saistošais proteīns-12;

Flt-3 – FMS līdzīgā tirozīnkināze-3;

GAP – GTF-āzi aktivējošais proteīns;

GLUT-1 – glikozes transportproteīns-1;

GST – glutationa S-transferāze;

H2AK119ub1 – histonu modificētājs (histona-2A monoubitokinēšana lizīnā-119);

H3K36me3 – histonu modificētājs (histona-3 trimetilēšana lizīnā-36);

HCF-1 – transkripcijas proteīnu saimniekšūnu faktors-1;

HIF – hipoksiju izraisošie faktori;

IFN α – interferons alfa;

IGF – insulīnam līdzīgais augšanas faktors;

IL2 – interleikīns 2;

KDM – lizīna (K) demetilāzes gēns;

ĶMI – ķermeņa masas indekss;

LSD1 – histona demetilāze;

mAb – peles monoklonālā antivielā;

MAPK – mitogēna aktivētā proteīnkināze;

MET – MET proto-onkogēns, receptoru tirozīnkināze;

MYC – proto-onkogēni;

MOF – histonu acetiltransferāze;

MTOR – mTOR kodējošais gēns;

mTOR – zīdītāju rapamicīna mērķis;

mTORC – zīdītāju rapamicīna mērķa komplekss;

NF-kB – kodola faktors kappa B;

NNK – 4-metilnitrosamino-1-(3-piridil)-1-butanons;

NNKOAc – NNK prekursors;

OS – kopējā izdzīvošana;

p21 – ciklīna atkarīgās kināzes inhibitors;

p53 – tumorsupresorais gēns;

P70S6K – ribosomālā proteīna S6 kināze beta-1;

PBMR1 – polibromo-1 proteīna gēns;

PBS – fosfora bufera šķīdums;

PD1 – programmētas šūnu nāves receptors 1;

PDGF – trombocītu augšanas faktors;

PDGFR – trombocītu augšanas faktora receptori;

PD-L – programmētas šūnas nāves proteīna ligands;

PHD – polihidroksilāze;

pH_e – ekstracelulārais pH;

pH_i – intracelulārais pH;

PI3K – fosfatidilinozitola-3-kināze;

PIK3CA – p110 α kodējošais gēns;

PIP2 – fosfatidilinositola-(4,5)-bifosfāts;

PIP3 – fosfatidilinositola-(3,4,5)-trifosfāts;

PŅR – polimerāzes ķēdes reakcija;

PTEN – fosfatāzes un tenzīnam homologā proteīna kodējošais gēns;

pVHL – VHL gēna kodētie proteīni;

Rbx – *ring-box protein*;

RCC – nieru šūnu karcinoma;

Set1/MLL1 – histona metiltransferāze;

SETD2 – SET domēnu saturošais gēns 2;

Sin3 – histonu deacetilāze;

SWI/SNF – nukleosomu pārveidojošais komplekss;

TCE – trihloretilēns;

TCEB1 – transkripcijas elongācijas faktors B1;

TGFB – transformējošais augšanas faktors beta;

TGF α – transformējošais augšanas faktors alfa;

TSC – *tuberous sclerosis* komplekss;

UCH – ubikvitīna C-termināla hidrolāze;

uRCC – neklasificētas nieru šūnu karcinomas;

VBC-cul2 – pVHL un elongīna B, elongīna C, *cullin2*, Rbx veidotais komplekss;

VEGF – endotēlija augšanas faktors;

VEGFR – endotēlija augšanas faktoru receptori;

VHL – *von Hippel-Lindau* tumorsupresorais gēns;

VHLs – *von Hippel Lindau* sindroms.

IEVADS

Gaišo šūnu jeb parastā nieru šūnu karcinoma veidojas no nieru proksimālo kanāliņu epitēlijšūnām un ir visizplatītākais nieru šūnu audzēju apakštips. Audzēja attīstību veicina gan ģenētiskās izmaiņas, galvenokārt, von Hippel-Lindau gēnā, gan dzīvesveida un apkārtējās vides mijiedarbība. Von Hippel- Lindau gēns ir iesaistīts hipoksiju izraisošo faktoru degradācijā, taču tā mutāciju rezultātā notiek pastiprināta hipoksijai raksturīgo proteīnu, piemēram, endotēlija augšanas faktora un ogļskābes anhidrāzes IX ekspresija, kas palielina karcinomas vaskularitāti un agresivitāti, kā arī samazina pacientu dzīvildzi.

Mikrovide audzējā un veselos audos būtiski atšķiras – audzēja šūnu starujās proliferācijas dēļ rodas hipoksija, kas var izraisīt acidozi un šūnu augšanas traucējumus. Lai pielāgotos jaunajiem apstākļiem un pasargātu audus no apoptozes, karcinomas šūnas pastiprina hipoksijai raksturīgo gēnu, tostarp ogļskābes anhidrāzes 9 gēna, transkripciju. Ogļskābes anhidrāze IX pieder cinka metalloenzīmu grupai un ir atbildīga par atgriezenisko oglekļa dioksīda hidratāciju uz bikarbonātu un protonu, kas nepieciešams labvēlīga intracelulārā un ekstracelulārā pH uzturēšanai hipoksijas apstākļos. Unikālais pH profils un paalielinātā ogļskābes anhidrāzes IX ekspresija tiek saistīta ar paaugstinātu audzēja invazivitāti un ķīmijterapijas neefektivitāti.

Lielā daļā pētījumu, kas mērķēti uz nieru karcinomas intracelulāro mehānismu izpēti, tiek izmantotas speciāli šim mērķim kultivētas šūnu līnijas. Taču pēdējos gados aizvien lielāka uzmanība tiek vērsta uz šūnu līniju homogenitāti, kas ir pretēja audzējā sastopamajai šūnu heterogenitātei, neļaujot visus uz šūnu līnijām iegūtos datus veiksmīgi pielietot arī praksē. Šis pētījums tika veikts, lai noskaidrotu ogļskābes anhidrāzes IX ekspresiju gaišo šūnu nieru karcinomas šūnu līnijas šūnās un primārajās gaišo šūnu nieru karcinomas šūnās, kas precīzāk reprezentē kopējo audzēja heterogenitāti.

Darba mērķis: Ar plūsmas citometrijas palīdzību noskaidrot ogļskābes anhidrāzes IX ekspresiju gaišo šūnu nieru karcinomas šūnu līnijas šūnās un primārajās no pacienta izolētajās gaišo šūnu nieru karcinomas šūnās.

Hipotēze: Ogļskābes anhidrāzes IX ekspresijas profils ilgstoši kultivētām gaišo šūnu nieru karcinomas šūnu līnijām būs atšķirīgs no primārajām gaišo šūnu nieru karcinomas šūnām, kas izdalītas no pacienta audzēja.

Darba uzdevumi:

1. Apgūt aseptiska darba tehniku laboratorijā, darbojoties ar bioloģisko materiālu;
2. Apgūt plūsmas citometriju un tai paredzēto paraugu sagatavošanu;
3. Veikt plūsmas citometriju ar gaišo šūnu nieru karcinomas šūnām un nieru proksimālo kanāliņu šūnām;
4. Apkopot iegūtos rezultātus, veikt datu analīzi un izdarīt secinājumus.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Nieru šūnu karcinoma un tās apakštipi

Nieru šūnu karcinoma (RCC) pieder pie heterogēno ļaundabīgo audzēju grupas, kas veidojas nieru kanāliņu epitēlija šūnās un sastāda 85% no visiem primāri diagnosticētajiem nieru audzējiem (1). Nieru šūnu karcinomas sastopamība dažādās pasaules vietās ir atšķirīga, ASV katru gadu tiek noteiktas 64 000 jaunas RCC diagnozes, Eiropā- 115 000, kā arī tiek reģistrētas 14 000 un 49 000 ar nieru šūnu karcinomu sasistītas nāves attiecīgi ASV un Eiropā (2).

Attīstoties histopatoloģiskajiem izmeklējumiem un molekulāro mehānismu izpētei, pašlaik ir klasificēti vairāki nieru audzēju apakštipi. Populācijā visbiežāk sastopama gaišo šūnu (ccRCC), papillārā un hromofobā nieru šūnu karcinoma, kas katra tiek novērota ar izplatību $\geq 5\%$ (3). Pārējie nieru audzēju apakštipi ir sastopami salīdzinoši reti ($\leq 1\%$), pie šiem apakštipiem pieder pārejas šūnu karcinoma, nefroblastoma jeb Vilmsa audzējs, nieru savācējkanāliņa audzējs, nieru sarkoma, onkocitoma un nieru medulārā karcinoma (1,3). Katrs apakštips ir atšķirīgs ar savu ģenētisko izcelsmi, bioloģisko uzbūvi, kā arī ar savu attīstību un izplatību organismā. Gadījumos, kad audzējs neatbilst nevienai audzēju apakšklasei, tas tiek iedalīts pie neklasificētām nieru šūnu karcinomām (uRCC), šo audzēju incidence ir $\sim 4\%$ (3,4).

1.1.1. Gaišo šūnu nieru karcinoma

Visizplatītākais histopatoloģiski atsevišķi izdalītais nieru šūnu audzēju tips ir ccRCC, tā sastāda 75-80% no kopējā RCC skaita un tiek dēvēta arī par parasto nieru šūnu karcinomu (4). Gaišo šūnu nieru karcinoma ir agresīva, tā veidojas no proksimālo nieru kanāliņu epitēlijšūnām. Audzēja šūnās novērojama gaiša citoplazma, kas satur daudz lipīdus un glikogēnu (5).

ccRCC parasti ir lodveida masas, kas iekapsulētas un norobežotas no nieru parenhīmas. Tās var rasties jebkurā nieres garozas daļā un bieži izstiepjas ārpus normālas nieres kontūrām, iespējoties arī perifērajos taukaudos (5,6). Karcinomas griezuma vieta ir daudzveidīga- to

veido spilgti dzelteni parenhīma ar pelēcīgu edēmu stromu, asins izplūdumiem, nekrozi un cistām. Gaišo šūnu nieru karcinoma bieži iekļūst nieru vēnu sistēmā, reizēm to piepildot un izplešoties dobajā vēnā vai pat sirds priekškambarī (6).

1.2. Epidemioloģija un riska faktori

Nieru šūnu karcinoma sastāda ~2% no visām noteiktajām audzēju diagnozēm un to izraisītām nāvēm pasaulē (3). Ziemeļamerikā un Eiropā RCC konstatēta salīdzinoši bieži, vislielākā sastopamība ir Čehijā, taču Āfrikā, Āzijā un Dienvidamerikā šie skaitļi ir zemāki (3,7,8). Nieru šūnu karcinomas izplatību ietekmē ne tikai ģeogrāfiskais novietojums, bet arī dzimums un etniskā piederība. Vīrieši ar RCC saslimst divas reizes biežāk nekā sievietes, un Āzijas/Klusā okeāna salu iedzīvotāji nieru šūnu audzēju iegūst retāk par baltās rases pārstāvjiem (7).

RCC pašlaik ir devītais izplatītākais audzējs vīriešu vidū un 14 izplatītākais audzējs sievietes vidū, to incidences biežumam katru gadu pieaugot (8). Pēdējo gadu laikā mirstība no nieru šūnu karcinomas samazinās, pateicoties ātrākai tās diagnostikai, taču 20-40% ar RCC diagnosticētie pacienti nespēj izdzīvot līdz audzēja izārstēšanai. Svarīga loma nieru šūnu karcinomas attīstībā ir arī vecumam. Visbiežāk nieru šūnu audzējs tiek diagnosticēts sestajā un septītajā gadu desmitā, kamēr 80% no visiem RCC pacientiem ir vecumā no 40 līdz 69 gadiem (9). ASV vidējais RCC pacientu vecums ir 64 gadi (3).

Tabakas dūmi tiek saistīti ar palielinātu RCC attīstības risku, taču pašlaik nav pieejami dati, kas viennozīmīgi raksturotu riska līmeni. *Hunt et al.* savā pētījumā secināja, ka riska līmenis pieaug, paaugstinot devu un ka, salīdzinot ar nesmēķētājiem, vīriešiem risks pieaug par 54%, bet sievietēm par 22%, taču smēķēšanas atmešana, ilgāka par 10 gadiem, var atkal mazināt šo risku (10). Pieaugot izsmēķēto cigarešu skaitam, pieaug arī saslimšanas risks, kā arī smēķētāju organismā audzējs biežāk veido metastāzes un izplešas limfmezglos. Pastāv hipotēze, ka smēķēšana palielina saslimšanas risku, toksiski iedarbojoties uz nieru kanāliņiem, radot endotēlija disfunkciju, oksidatīvo stresu un audu hipoksiju (11). Turklāt pašlaik ir atklāti kancerogēni mehānismi, kas padara noteiktus smēķētājus jutīgākus nieru šūnu karcinomas attīstībai. Piemēram, cigarešu dūmos atrodamais 4-metilnitrosamino-1-(3-piridil)-1-butanons

(NNK) ir kancerogēns N-nitrozamīns, kas izraisa DNS bojājumus perifērajos asins limfocītos. 2009. gadā tika veikts pētījums, kurā tika pierādīts, ka NNK prekursors NNKOAc veicina RCC attīstību, turklāt attīstības risks pieaug līdz ar NNKOAc devas palielināšanos (12). Viela benzo- α -pirēna-diola epoksīds (BPDE) arī ir sastopams cigarešu dūmos. BPDE izraisa hromosomu aberācijas 3p lokusā, kas ir saistīta ar jutību pret smēķēšanas izraisītiem vēža veidiem, tostarp RCC. Nieru šūnu karcinomas veidošanās risks pieaug pacientiem ar augstāku jutību pret BPDE 3p21.3 lokusā, kas bieži uzrāda heterozigotitātes zudumu audzēja audos (13).

Arī citas toksiskās vielas palielina nieru šūnu audzēju attīstības risku. Deviņdesmitajos gados tikai veikts internacionāls pētījums, kas centās noskaidrot RCC riska saistību ar apkārtējās vides apstākļiem. Tajā konstatēja, ka cilvēki, kas darbā saskaras ar kadmiju, koka krāsniem, tēraudu un azbestu, ir vairāk pakļauti RCC attīstībai (14). Pašlaik plaši tiek pētīta trihloretilēna (TCE) ietekme uz audzēja epidemioloģiju, jo tas tiek plaši lietots un pēdējā laikā kļuvis par apkārtējās vides piesārņotāju. Dati par TCE atstātajām sekām uz cilvēku ir pretrunīgi, taču dzīvnieku modeļos tam ir pierādīta kancerogenitāte (7,9). Lauksaimniecībā plaši lietotajiem pesticīdiem ir atklāta negatīva ietekme uz RCC veidošanos. Pētījumā, kas tika veikts Eiropā, konstatēja, ka, nonākot ilgstošā saskarē ar pesticīdiem, nieru šūnu audzēja risks būtiski pieaug, turklāt tā palielināšanās tiek saistīta arī ar glutaciona S-transferāzes (GST) gēnu polimorfismu. Tika atklāts, ka pesticīdu iedarbībai pakļautajiem pacientiem ar aktīvām GSTM1 un GSTT1 alēlēm ir lielāks RCC risks, kas vērš uzmanību uz gēnu un vides mijiedarbības ietekmi uz audzēju attīstību (15).

Aptaukošanās, hipertensija un jau iepriekš minētā smēķēšana ir galvenie RCC riska faktori, tie tiek konstatēti aptuveni pusei no visiem ar nieru šūnu karcinomu diagnosticētajiem pacientiem ASV (3). Tiek rēķināts, ka vīriešiem ar lieko svaru RCC risks pieaug par 24% uz katriem 5kg/m^2 ķermeņa masas indeksa (KMI) pieauguma, bet sievietēm – par 34% (7). Hipertensija divkārtšo nieru šūnu karcinomas attīstību, kas ir augstāka pie slikti kontrolētas hipertensijas, un, lai gan hipertensija bieži kombinējas ar lieko svaru, katra no tām ir atsevišķi stāvošs riska faktors (7,11).

RCC epidemioloģiskie pētījumi ir atklājuši, ka saslimšanas risku palielina hroniska nieru slimība, hemodialīze, nierakmeņi, nieru transplantācija, nieru cistiskā slimība, iepriekšēja RCC diagnoze un cukura diabēts (3,7,11,16). Dažos pētījumos ir atklāta saistība starp dzemdību daudzumu un nieru šūnu karcinomas attīstību sievietēm. Šajos pētījumos tika konstatēts, ka dzemdējušām sievietēm RCC risks pieaug, kā arī tas ir lielāks vairākkārt dzemdējušām sievietēm (17, 18). Tika atklāts, ka sievietes vecumam, kad notikušas pirmās dzemdības, arī ir

nozīme RCC attīstībā, riskam pieaugot, ja pirmās dzemdības notikušas agrākā vecumā (<26 gadiem) (18).

Ir veikti vairāki pētījumi, lai noskaidrotu uztura paradumu ietekmi uz nieru šūnu karcinomas attīstību. Dažos informācijas avotos tiek minēts, ka uzturs, kas satur daudz dārzeņus un augļus, mazina RCC risku, taču citos pētījumos tas nav apstiprinājies, pretrunīgi rezultāti iegūti arī, pētot gaļas un zivju patēriņa ietekmi uz RCC rašanos (3,7,9). Tomēr alkohola mērena lietošana (~1 dzēriens/dienā) tiek saistīta ar mazāku nieru šūnu audzēja rašanās risku (19,20). Pētījumā, kas tika veikts Ķīnā, savukārt konstatēja, ka zaļās tējas lietošana 500 ml/dienā arī var mazināt RCC attīstības iespēju (16). Jauktus rezultātus par nieru kancerogenitāti uzrāda akrilamīds, kas sastopams ikdienā lietotajos ceptajos ēdienos, un, lai arī tā toksiskais efekts cilvēkiem vēl nav pierādīts, tiek veikts regulārs akrilamīda kancerogenitātes monitorings (21).

1.2.1. Ģenētiskās izmaiņas ccRCC

Gaišo šūnu nieru karcinoma visbiežāk tiek asociēta ar von Hippel-Lindau (VHL) tumorsupresora gēna inaktivāciju, taču neseni pētījumi, izmantojot sekvencēšanas metodes, ir atklājuši, ka mutācijas notikušas arī citos gēnos, kā, piemēram – transkripcijas elongācijas faktorā B1 (TCEB1 - kodē elongīnu C), SET domēnu saturošajā gēnā 2 (SETD2), lizīna (K) demetilāzes gēnos KDM, ubikvitīna karboksil-termināla hidrolāzes gēnā BAP1 un polibromo-1 proteīna gēnā PBRM1. 20% ccRCC gadījumu ir notikusi zīdītāju rapamicīna mērķa kompleksa (mTORC) signālceļa aktivitātes izmaiņas, ko izraisa mutācijas rapamicīna mērķī mTOR, *tuberous sclerosis* kompleksā 1 TSC1, p110 α kodējošajā gēnā PIK3CA un fosfatāzes un tenzīnam homologā proteīna kodējošajā gēnā PTEN. Turklāt jaunākie atklājumi norāda uz audzēja epigenētiskām izmaiņām, kas sevī ietver DNS metilēšanu, histonu modifikācijas un izmainītu nekodējošās RNS ekspresiju (22,23).

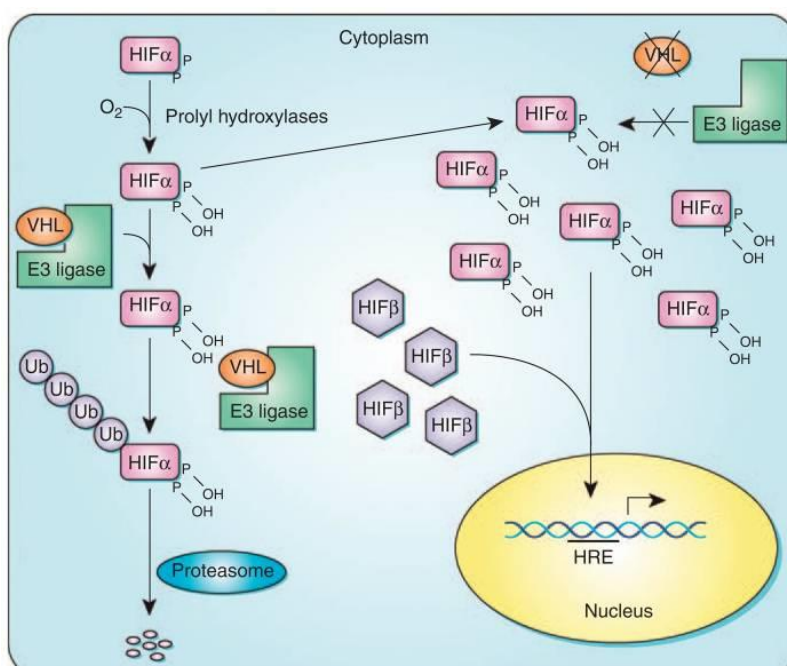
1.2.1.1. VHL signālceļš

VHL gēna zudums vai izmaiņas tajā tiek saistītas ar von Hippel Lindau sindroma (VHLs) attīstību. VHLs ir neoplastiska autosomāli dominanti iedzimstoša saslimšana, kas raksturojas ar labdabīgu un ļaundabīgu audzēju attīstību centrālajā nervu sistēmā, aizkuņģa dziedzerī, reproduktīvajā sistēmā, nierēs un virsnierēs. Visbiežāk VHLs gadījumā veidojas hemangioblastomas galvas un muguras smadzenēs, un tīklenē, feohromocitomas un paragangliomas, neuroendokrīnie un endolimfātiskie audzēji, kā arī attīstās gaišo šūnu nieru karcinoma (24,25).

VHL anti-onkogēnās īpašības uzrādošais gēns atrodas 3 hromosomas īsajā plecā (3p25-26), tas satur 3 eksonus un, pateicoties alternatīvai translācijai, kodē divus funkcionāli ļoti līdzīgus proteīnus (pVHL) attiecīgi ~28-30 kDa un 19 kDa lielus (23,26,27). Ģenētiskas izmaiņas vai VHL zudums tiek novērots ~80% kopējo ccRCC gadījumu, turklāt ir noskaidrots, ka līdz pat 40% VHLs neārstētu pacientu nāves cēlonis ir bijusi agresīva gaišo šūnu nieru karcinoma (26,28).

VHL proteīni ir multiadaptori, tie spēj saistīties ar vairāk nekā 30 dažādiem proteīniem, un tie sastāv no diviem funkcionāliem (α un β) domēniem (29,30). Karcinomas attīstības gadījumā nozīmīga ir abu pVHL domēnu spēja šūnas citoplazmā savienoties ar E3 ligāzes kompleksā esošajiem proteīniem - elongīnu B, elongīnu C, *cullin2* un Rbx (*ring-box protein*), veidojot kompleksu VBC-cul2 (30). VBC-cul2 spēj ubikvitinēt proteīnus, iezīmējot tos tālākai proteosomālai degradēšanai, šo proteīnu skaitā galvenokārt ietilpst hipoksiju izraisošie faktori (HIF) (24). Par svarīgākajām HIF grupām uzskata HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α , HIF1 β un HIF2 β (23). Turklāt pašam HIF2 α pētījumos ir atklāta onkogēna iedarbība, kas rodas no saistīšanās ar proto-onkogēniem (MYC) (31). HIF α un HIF β savā starpā spēj veidot kompleksu HIF α/β , kas pārvietojas uz kodolu, saistās ar hipoksijas gēnu promoteriem DNS un regulē organisma pielāgošanos hipoksijas apstākļiem (23,24).

Normālos apstākļos, skābekļa klātbūtnē, notiek HIF α hidroksilēšana ar enzīma poli-hidroksilāzes (PHD) palīdzību, kas ļauj VBC-cul2 kompleksam ar to saistīties (23). PHD darbībai nepieciešams dzelzs, askorbāts un 2-oksoglutarāts, un tā izmanto skābekli, lai pievienotu hidroksilgrupas prolīna atlikumiem HIF α molekulas α -subvienībā. Taču, kad šūnā skābekļa daudzums ir niecīgs, hidroksilēšana nenotiek, VBC-cul2 komplekss nespēj saistīt HIF α , tas netiek pienācīgi degradēts un saistās ar līdzīgo molekulu HIF β , izveidojot kompleksu, kas, nonākot kodolā, pastiprina tādu hipoksijai raksturīgo proteīnu, kā, piemēram, endotēliju augšanas faktora (VEGF), trombocītu augšanas faktora (PDGF), transformējošā augšanas faktora alfa (TGF α), ogļskābes anhidrāzes IX (CA IX), eritropoetīna un glikozes transportproteīna-1 (GLUT-1), pastiprinātu sintēzi (23,24). Skatīt 1.2.1.1. attēlu.



1.2.1.1. att. VHL un HIF α (24)

Ģenētiskās izmaiņas, piemēram, punktveida mutācijas, insercijas, delēcijas un epiģenētiskas izmaiņas VHL gēnā, kā arī pilnīgs 3p25 zudums noved pie HIF α uzkrāšanās šūnā, kas pēc iepriekš aprakstītā mehānisma noved pie hipoksijai raksturīgo gēnu pastiprinātas transkripcijas (3). Šādā gadījumā izmainītais pVHL nespēj saistīties ar E3 ligāzes proteīniem un, neatkarīgi no HIF α hidroksilēšanas pakāpes, nespēj to iezīmēt tālākai degradācijai (24). ccRCC gadījumā HIF α / β komplekss aktivē gēnus, kas atbildīgi par angiogēnēzi, lipoģenēzi, glikolīzi, izmaina šūnas normālo ciklu un nodrošina antiapoptozi (31). pVHL ir iesaistīts arī daudzu citu efektoro proteīnu darbības koordinēšanā, kas ietekmē citoskeleta mikrotubuļu stabilitāti, tumorsupresorā gēna p53 aktivāciju, neironu apoptozi, šūnu novecošanās procesus, RNS polimerāzes II ubikvitinēšanu un regulē kodola faktora kapa B (NF- κ B) darbību (30).

1.2.1.2. Mutācijas PBRM1

Gaišo šūnu nieru karcinomas gadījumā otrs visbiežāk mutētais gēns aiz VHL ir PBRM1, kas arī atrodas trešajā hromosomā (3p21), un tā mutācijas tiek konstatētas ~41% ccRCC pacientu (23). PBRM1 kodē proteīnu BAF180, kas ir nukleosomu pārveidojošā kompleksa SWI/SNF sastāvdaļa. Eikariotos DNS ir apvīts ap nukleosomām, un tādēļ tā ir grūtāk pieejama transkripcijai, taču nukleosomu pārveidojošie kompleksi spēj saistīties ar nukleosomām, tās pārvietojot un mainot to stabilitāti (32). SWI/SNF komplekss ir novietots ap ATF-āzes subvienību, kas nodrošina enerģiju hromatīna struktūras pārveidošanai, kontrolējot šūnai vitāli svarīgus procesus, piemēram, vielmaiņu, DNS labošanu, šūnu dzīves ciklu un to bojāeju (22,33).

PBRM1 darbojas kā divpakāpju tumorsupresora gēns, un visbiežāk tā mutācijas rodas no hromosomas īsā pleca saīsināšanās un rezultējas ar proteīna iztrūkumu. PBRM1 inaktivācija rada nepareizas formas nefunkcionējošu proteīnu, kas, savukārt, noved pie palielinātas šūnu proliferācijas un migrācijas – attīstās audzējs, taču atkārtota tā ekspresija ccRCC šūnās, kur iepriekš tā līmenis ir bijis zems, pētījumos uzrāda pretējus efektus, paaugstinot ciklīna atkarīgās kināzes inhibitora p21 līmeni (1,23). Turklāt PBRM1 piemīt spēja kontrolēt pašas šūnas un tās citoskeleta kustības, regulējot gēnus, kas atbildīgi par šūnu savstarpējo signalizāciju un adhēziju (23). ccRCC gadījumos PBRM1 mutācijas tiek saistītas ar agresīvāku audzēja attīstību, tā ekstrarenālu izplešanos un kopumā sliktāku pacientu kopējo izdzīvošanu (3,32).

1.2.1.3. Mutācijas BAP1 gēnā

BAP1 atrodas trešajā hromosomā starp VHL un PBRM1 gēniem (3p21.1), tas ir mutēts 10-15% ccRCC gadījumos, un tā mutācijas noved pie proteīna zuduma (23,34). BAP1 kodē kodola deubikvitināzi (DUB), tā pieder ubikvitīna C-termināla hidrolāžu (UCH) enzīmu ģimenei, kas ir mutēta vairākos audzējos – ādas un acu (*uveal*) melanomās, mezoteliomās, krūts audzējos un arī citās nieru šūnu karcinomās (22,23,35). Funkcionāli BAP1 tiek pieskaitīts pie

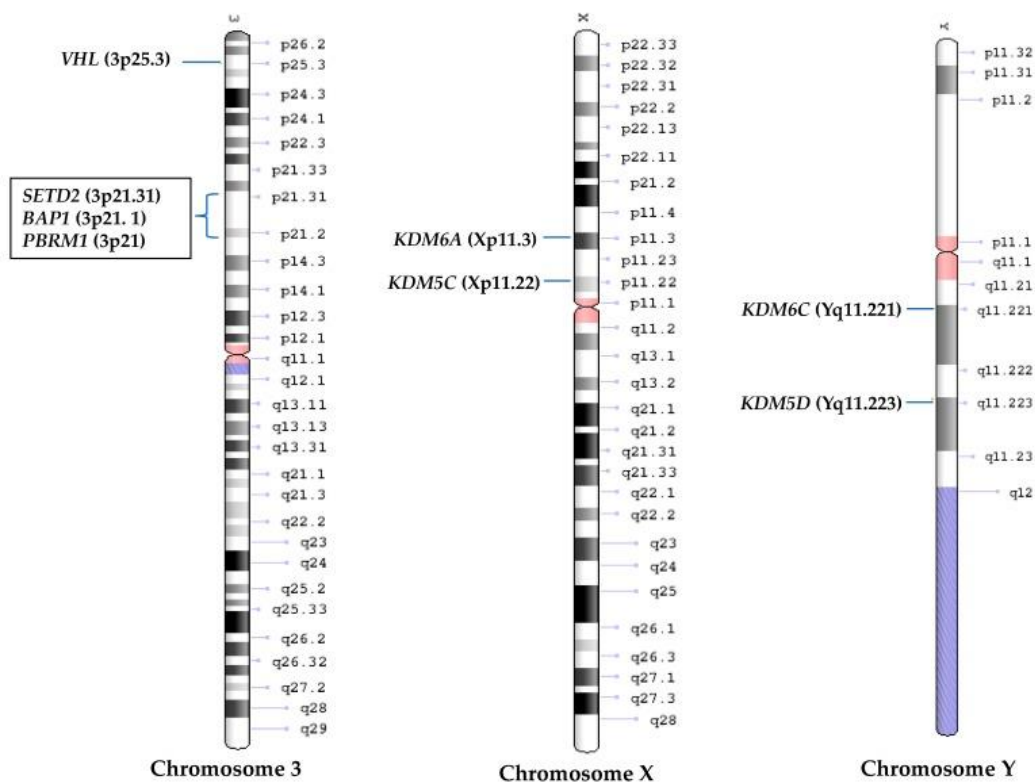
spēcīgiem audzēju supresorgēniem, jo tas spēj regulēt nozīmīgus šūnas procesus, kā šūnu proliferāciju, diferenciāciju, apoptozi, glikoneoģenēzi un šūnu atbildi uz DNS bojājumiem (34).

BAP1 regulē šūnu ciklu, mijiedarbojoties ar transkripcijas proteīnu saimniekšūnu faktoru-1 (HCF-1), kam ir būtiska nozīme hromatīna pārveidošanas reakcijās (1,35). HCF-1 saista BAP1 proteīnu ar E2F transkripcijas faktora 1 (E2F1) reaģētspējīgajiem promoteriem. Kad ir notikusi BAP1 proteīna piesaistīšana, tas uz promoteriem spēj ubikvitinēt histonu modificētāju H2AK119ub1, paātrinot šūnu cikla nonākšanu līdz S fāzei. Taču, ja BAP1 darbība ir traucēta, palielinās H2AK119ub1 līmenis uz E2F reaģētspējīgajiem promoteriem, un tas izraisa aktīvu G1 fāzi. Turklāt BAP1 proteīna zudums mazina G1/S fāzu kontrolpunktu precizitāti, novedot pie nekontrolētas šūnu augšanas un dalīšanās (23). Normālos apstākļos HCF-1 saistīšanās ar E2F promoteriem veicina arī citu transkripcijai nozīmīgu enzīmu aktivāciju – šūnu reakcijās iesaistās histonus modificējoši enzīmi, piemēram, Set1/MLL1 histona metiltransferāzes, LSD1 histona demetilāze, Sin3 histonu deacetilāzes un MOF histona acetiltransferāzes (35).

1.2.1.4. Mutācijas SETD2 gēnā

SET domēnu saturošais gēns (SETD2) arī atrodas trešās hromosomas īsajā plecā (3p21.31), tas kopumā ir mutēts 4-8% ccRCC gadījumu, taču SETD2 ir otrs vismutētākais gēns pacientiem ar sporādisko gaišo šūnu nieru karcinomu (36,37). SETD2 kodē metiltransferāzi, kas ir atbildīga par histona-3 trimetilēšanu lizīnā-36 (H3K36me3), kā arī tā tiek piesaistīta aktīvas transkripcijas vietās, kur mijiedarbojas ar RNS polimerāzes II C-gala domēnu (36).

Jaunākie pētījumi liecina, ka SETD2 proteīna metiltransferāzes darbība ir nepieciešama ATM (*ataxia-telangiectasia* mutētās proteīnkināzes) un p53 mediēto DNS bojājumu kontrolpunktu aktivēšanā, kas nepieciešama kļūdu labošanai DNS ķēdēs un kopējai genoma stabilizēšanai. Turklāt eksperimentos atklājās, ka PBRM1 mutācijas darbojas kopā ar SETD2 mutācijām, traucējot šūnu cikla kontrolpunktu pareizu darbību (23). Kopumā zema SETD2 gēna aktivitāte tiek saistīta ar agresīvākiem audzēja fenotipiem un zemāku ccRCC pacientu izdzīvošanas spēju (37). ccRCC attīstībā iesaistīto gēnu novietojumu hromosomā var aplūkot 1.2.1.4. attēlā.



1.2.1.4. att. **ccRCC gadījumā visbiežāk mutēto gēnu novietojums hromosomās** Trešās hromosomas īsais plecs 3p satur ~50Mbs reģionu, kas satur četrus tumorsupresorgēnus – VHL, SETD2, BAP1, PBRM1, trim no tiem atrodoties viens otram blakus. Turklāt histonus modificējoši gēni KDM, kas darbojas, kā lizīna demetilāzes, ir novietoti dzimumhromosomās. KDM5D un KDM6C, kas atrodas Y hromosomā, ir attiecīgi KDM5C un KDM6A homologi. Interesanti ir tas, ka šie X-hromosomai homologie Y hromosomas gēni parasti ir izdzēsti vīriešu dzimuma ccRCC pacientiem (23).

1.2.1.5. mTOR signālceļš

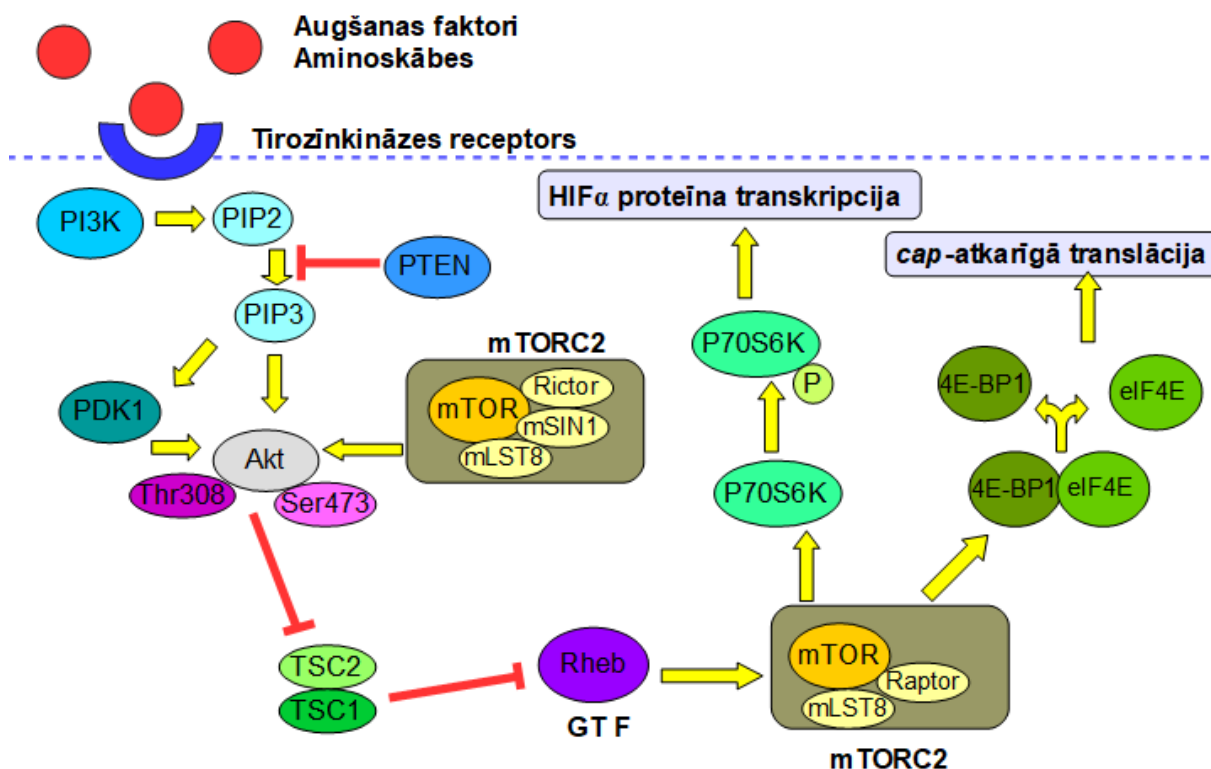
mTOR signālceļš spēj reaģēt gan uz iekšējiem, gan ārējiem stimuliem, tādā veidā regulējot dažādus šūnu procesus, piemēram, šūnu proliferācijas spēju, barības vielu izlietojumu un proteīnu sintēzi (38). Zīdītāju rapamicīna mērķis (mTOR) ir daudzfunkcionāla serīna-treonīna proteīnkināze, ko kodē MTOR gēns. MTOR ir mutēts ~5% ccRCC gadījumā, no kurām lielākā daļa ir *missense* mutācijas (1,9,22). mTOR savas bioloģiskās funkcijas veic,

veidojot divus atšķirīgus kompleksus - mTORC1 un mTORC2 (39). Ja mTOR saistās ar *raptor* (mTOR regulatoro proteīnu), veidojas mTORC1, bet, ja mTOR saistās ar *riCTOR* (pret rapamicīnu nejutīgo mTOR daļu), veidojas mTORC2 (9).

mTOR signālceļa aktivācija sākas ar dažādu augšanas faktoru (piem. epidermālā augšanas faktora EGF, insulīnam līdzīgā augšanas faktora IGF) un barības vielu, galvenokārt, aminoskābju, iedarbību uz to receptoriem, kas, savukārt, izraisa fosfatidilinozītola-3-kināzes PI3K aktivāciju (1,9,39). PI3K veicina fosfatidilinositola-(3,4,5)-trifosfāta (PIP3) veidošanos no fosfatidilinositola-(4,5)-bifosfāta (PIP2), šo reakciju nomācot tumorsupresorgēnam PTEN. PIP3 tieši saistās ar Akt (proteīnkināzes B) PH domēnu un veicina tās pārvietošanos uz šūnas membrānu, kur tā tiek aktivēta, fosforilējot to divos saitos (treonīna 308 un serīna 473 saitā) (39). Viena no Akt funkcijām ir tieša *tuberous sclerosis complex 2* TSC2 (*tuberin*) fosforilēšana un inhibēšana, kas normālos apstākļos veido heterodimēru ar TSC1 (*hamartin*) (9,38,39). TSC1/TSC2 komplekss darbojas kā tumorsupresors, turklāt tas kalpo arī kā GTP-āzi aktivējošs proteīns (GAP) (9,38). Kad TSC1/TSC2 kompleksa darbība ir nomākta, šūnā palielinās Rheb GTP-āzes daudzums, kas spēj tieši saistīties ar mTORC1 kināzes domēnu un veicināt tās aktivitāti (9,23,39,40). Skatīt 1.2.1.5. attēlu.

Aktivētais mTORC1 komplekss fosforilē ribosomālo proteīna S6 kināzi beta-1 (P70S6K) un 4E-BP1/eikariotu translācijas iniciācijas faktoru 4E (4E-BP1/eIF4E). Fosforilētā P70S6K aizceļo uz kodolu, kur veicina HIF α proteīna transkripciju, pastiprinot angiogēnētisko proteīnu, piemēram, VEGF, PDGF un TGFB (transformējošā augšanas faktora beta) sintēzi (1). Savukārt 4E-BP1/eIF4E fosforilēšana (un inaktivēšana) veicina *cap*-atkarīgo translāciju, fosforilētais 4E-BP1/eIF4E atbrīvo eIF4E - proteīnu, kas saistās ar šūnu mRNS 5' m7G vāciņu struktūru un atvieglo translāciju, pastiprinot mRNS saistību ar RNS helikāzi un ribosomas saistošajiem proteīniem (39).

Izmainītu mTOR signālceļa darbību 1 – 5% ccRCC gadījumu izraisa mutācijas PTEN gēnā, kas rezultējas ar tā tumorsupresīvās darbības zudumu. Vēl no 2% līdz 5% gadījumu mutēts ir PIK3CA gēns, kas atbildīgs par PI3K sintēzi, un visbiežāk šīs ir *missense* mutācijas. ~4% gaišo šūnu nieru karcinomas pacientu ir mutēti gēni, kas kodē tumorsupresoros TSC1 un TSC2, kamēr tirozīnkināzes receptoru mutācijas ir retas (23).



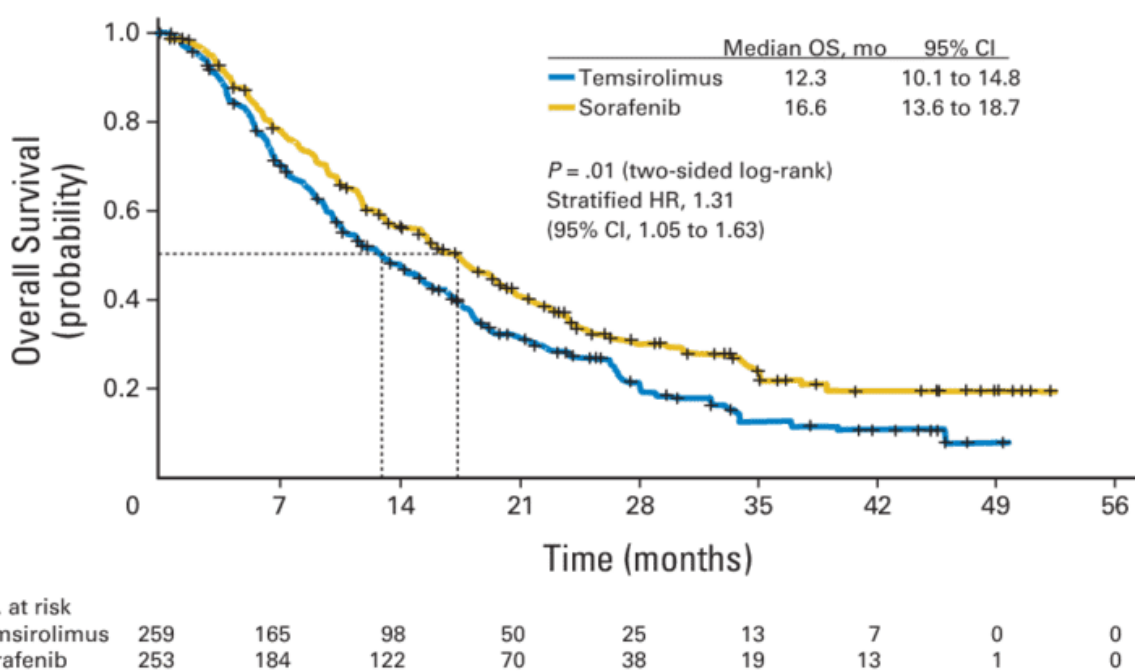
1.2.1.5. att. **Vienkāršots mTOR signālcēļš** Augšanas faktoriem un aminoskābēm mijiedarbojoties ar tirozīnkināzes receptoriem, aktivējas PI3K, kas veicina PIP2 pārvēršanos uz PIP3. Savukārt PIP3, PDK1 un mTORC2 iedarbojoties uz Akt, notiek tumorsupresorā TSC2/TSC1 kompleksa inhibēšana, kas caur Rheb GTF-āzes paaugstināto līmeni aktivē mTORC1. mTORC1, fosforilējot P70S6K un 4E-BP1/eIF4E, pastiprina HIFα proteīna transkripciju un aktivē *cap*-atkarīgo translāciju. PDK1 – fosfoinoizīdā atkarīgā kināze 1; mSIN1 – mitogēna aktivētās proteīnkināzes saistītais proteīns 1; mLST8 – zīdītāju letālais SEC13 proteīns 8.

1.3. ccRCC pieejamās ārstēšanas metodes

Gaišo šūnu nieru karcinomas ir ļoti vaskulāri audzēji, tādēļ lielai daļai terapeitisko līdzekļu molekulārais mehānisms ir vērsts uz angiogēnēzes mazināšanu, ierobežojot endotēlija augšanas faktora un citu hipoksijai raksturīgo molekulu darbību. ASV un Eiropas Savienībā apstiprinātās pirmās un otrās izvēles zāļu vielas, kas darbojas uz VHL – VEGF signālcēļu ir *sorafenib*, *sunitinib*, *pazopanib*, *axitinib*, *lenvatinib* un *cabozantinib*, kā arī mTOR signālcēļa

inhibitori *everolimus* un *temsirolimus* (3). Lielas devas interleikīna 2 imuniterapija un monoklonālās antivielas *bevacizumab* kombinācija ar interferonu α (IFN α) arī var tikt lietota primārajā terapijā (41). Un, lai arī pašlaik ir pieejamas vairākas zāļu vielas ccRCC ārstēšanai, ķirurģiska iejaukšanās joprojām ir visefektīvākā metode lokalizēta nieru šūnu audzēja likvidēšanai. Turklāt agresīva nefrektomija un trombektomija, pašlaik ir standarta terapeitiskā pieeja pacientiem, kam audzējs ir izpleties labajā sirds kambarī vai apakšējā dobajā vēnā (42).

Kā pirmais medikaments ccRCC ārstēšanai 2005. gadā tika apstiprināts *sorafenib* (43). *Sorafenib* ir orāli lietojams multitirozīnkināzes inhibitors, kas specifiski iedarbojas uz audzēja šūnām un asinsvadiem, inhibējot Raf-1 proteīnkināzi, B-Raf receptorus, asinsvadu endotēlija augšanas faktora receptorus 2 un 3 (VEGFR 2-3), trombocītu augšanas faktora receptoru (PDGFR), Flt-3 (FMS līdzīgā tirozīnkināze-3) un cilmes šūnu augšanas faktora receptorus c-KIT. Kopumā *sorafenib* ir ļoti efektīvs un labi panesams līdzeklis gan pirmās, gan otrās audzēja smaguma pakāpes pacientiem ar metastāžu gaišo šūnu, hromofobo un papildāro nieru karcinomu (44). 1.3.1. attēlā var aplūkot *sorafenib* un *temsirolimus* kopējās izdzīvošanas līknes.



1.3.1. att. Kaplan-Meier temsirolimus un sorafenib kopējās izdzīvošanas (OS) līknes metastātiskas RCC pacientiem Temsirolimus intravenozi 12 mg 1x nedēļā; sorafenib orāli 400 mg 2x dienā (45).

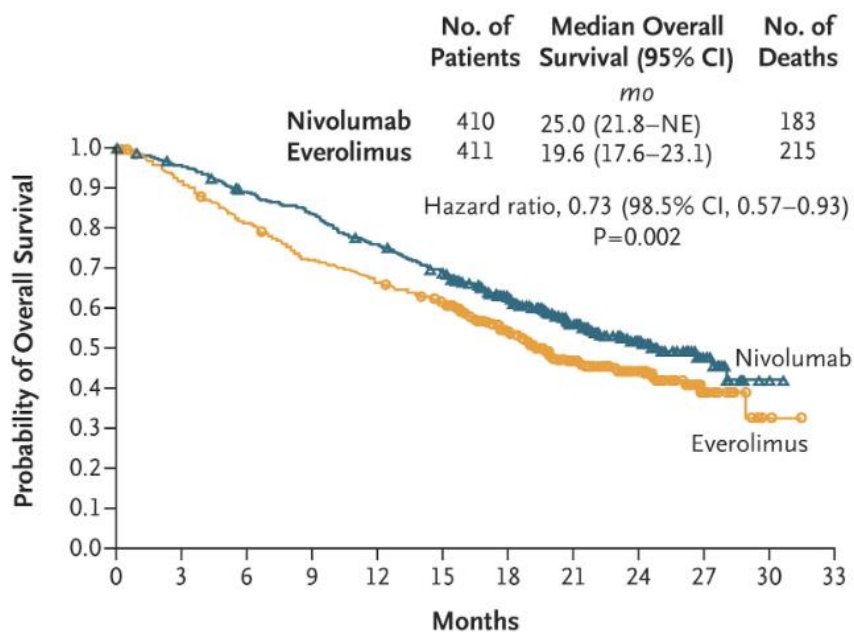
Sunitinib un *pazopanib* ir perorāli multitirozīnkināzes inhibitori, tie darbojas pēc tāda paša principa, kā *sorafenib*, neitralizējot VEGFR 1-3, c-KIT, PDGFR un Flt-3 receptorus (43). *Pazopanib* ir otrās paaudzes medikaments, salīdzinošajos pētījumos pret *sunitinib* tika atklāts, ka *pazopanib* lietotājiem biežāk izpaudās diareja un hepatotoksicitāte, kamēr *sunitinib* lietotājiem biežāk konstatē palmāri-plantāro eritrodizestēziju un nogurumu, turklāt *Escudier et*

al., veicot dubultaklu pētījumu, konstatēja, ka RCC pacienti labprātāk lieto *pazopanib* nevis *sunitinib* (2).

Axitinib un *cabozantinib* ir otrās paaudzes orāli lietojamie multitirozīnkināzes inhibitori, kas abi ir apstiprināti kā otrās izvēles preparāti, taču nesenos pētījumos ir atklājies, ka *cabozantinib* ir efektīvs arī kā pirmās izvēles medikaments pacientiem ar augsti attīstītu ccRCC (3,46). *Axitinib* lietošana Eiropas Savienībā tika apstiprināta 2007. gadā, un tas iedarbojas uz VEGFR 1-2-3 receptoriem, mazinot angiogēzi (2). Savukārt *cabozantinib* ir salīdzinoši jauns medikaments, kas ES ieviests 2016. gadā, un tā darbības mehānisms balstās uz VEGFR 1-2-3 inhibēšanu un MET (MET proto-onkogēns, receptoru tirozīnkināzes) un AXL (AXL receptoru tirozīnkināzes) gēnu aktivitātes samazināšanu, kas ir paaugstināta pie ilgstošas *sunitinib* lietošanas un veicina audzēja rezistences attīstību pret pirmās izvēles medikamentiem (46).

Lenvatinib ir vēl viens salīdzinoši jauns medikaments ccRCC ārstēšanai, kas Eiropas Savienībā ieviests 2016. gadā (2). *Lenvatinib* ir multitirozīnkināzes inhibitors, kas sākotnēji tika apstiprināts monoterapijā, taču pašlaik labākas efektivitātes dēļ tiek lietots kopā ar *everolimus* pēc primāras antiangiogēnētiku lietošanas pie augsti diferencētas nieru šūnu karcinomas (47). *Lenvatinib* savu pozitīvo darbību veic, inhibējot VEGFR 1-2-3, fibroblastu augšanas faktora receptorus 1, 2, 3 un 4 (FGFR1-4), PDGFR α , RET gēnu un c-KIT (41).

Everolimus un *temsirolimus* ir savienojuma rapamicīna atvasinājumi, kas dabiski atrodams *Streptomyces hygroscopicus* (39). *Temsirolimus* ir intravenozi ievadāms mTOR inhibitors, kas organismā sākotnēji tiek pārveidots uz tikpat aktīvu formu *sirolimus*. *Sirolimus* saistās ar citoplazmas proteīna FK506 saistošo proteīnu-12 (FKBP12) un izveido kompleksu, kas tālāk saistās pie mTORC1 un inhibē tā darbību (2). *Temsirolimus* Eiropas Savienībā tika apstiprināts 2007. gadā, un tas tiek lietots kā pirmās izvēles medikaments pacientiem ar sliktām ārstēšanas prognozēm (43). *Everolimus* ES tika ieviests 2009. gadā, un tas ir perorāli lietojams medikaments (2). Atšķirībā no *temsirolimus*, *everolimus*, nonākot organismā, ar augstu afinitāti tieši saistās ar FKBP12 un izveido kompleksu, kas tieši inhibē mTORC1 darbību. Bloķētā mTORC1 darbība neļauj fosforilēties P70S6K un 4E-BP1/eIF4E, tādā veidā kavējot hipoksijas un šūnu cikla regulatoro gēnu transkripciju un tālāku translāciju (48). *Everolimus* un *nivolumab* kopējās izdzīvošanas līknes var aplūkot 1.3.2. attēlā.



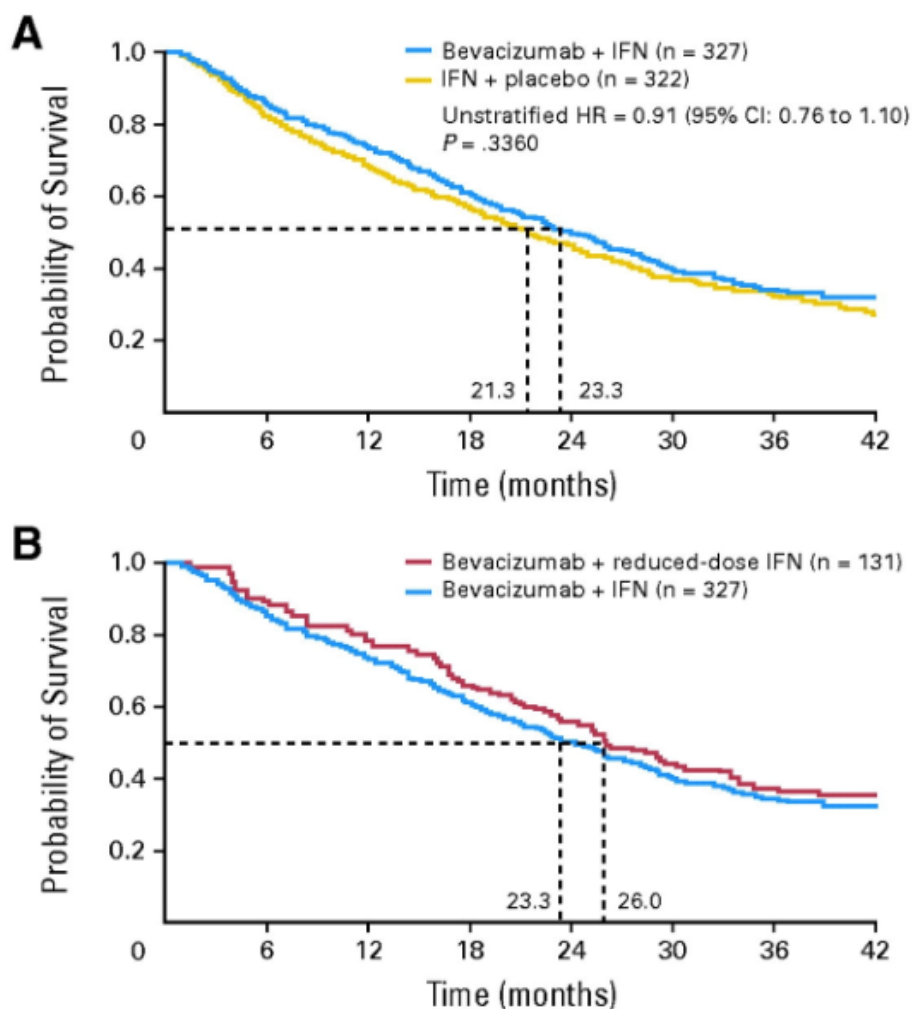
No. at Risk

Nivolumab	410	389	359	337	305	275	213	139	73	29	3	0
Everolimus	411	366	324	287	265	241	187	115	61	20	2	0

1.3.2. att. **Kaplan-Meier nivolumab un everolimus kopējās izdzīvošanas (OS) liknes** **advancētas un metastātiskas RCC pacientiem** *Nivolumab* intravenozi 3 mg/kg 1x divās nedēļās; *everolimus* orāli 10 mg 1x dienā (49).

Bevacizumab kombinācijā ar $\text{INF}\alpha$ Eiropas Savienībā tika reģistrēts 2007. gadā kā pirmās izvēles preparāts pacientiem, kam ir metastāžu RCC un kam izārstēšanās iespējas ir labas vai vidējas (2). *Bevacizumab* ir monoklonālā anti viela pret VEGFR-A, savu terapeitisko efektu īstenojot caur angiogēnēzes mazināšanu, turklāt pētījumos ir konstatēts, ka *bevacizumab* pozitīvi ietekmē pacientu dzīves ilgumu, skatīt 1.3.3. attēlu (50).

ccRCC ārstēšanā nozīmīga loma ir arī imunoterapijai, kas jau kopš 90tajiem gadiem tiek lietota praksē kā augstas devas interleikīna 2 (IL2) un $\text{INF}\alpha$ ievadīšana pacientiem. Pašlaik vairāki pētījumi koncentrējas uz jaunākās paaudzes imunoterapeitiskajiem aģentiem, kā, piemēram, antivielām pret programmētu šūnas nāves proteīna liganu 1 un 2 (PD-L1-2), antivielām pret programmētu šūnas nāves receptoru 1 (PD1) un citotoksisko T limfocītu saistīto olbaltumvielu 4 (CTLA4) inhibitoriem (3).

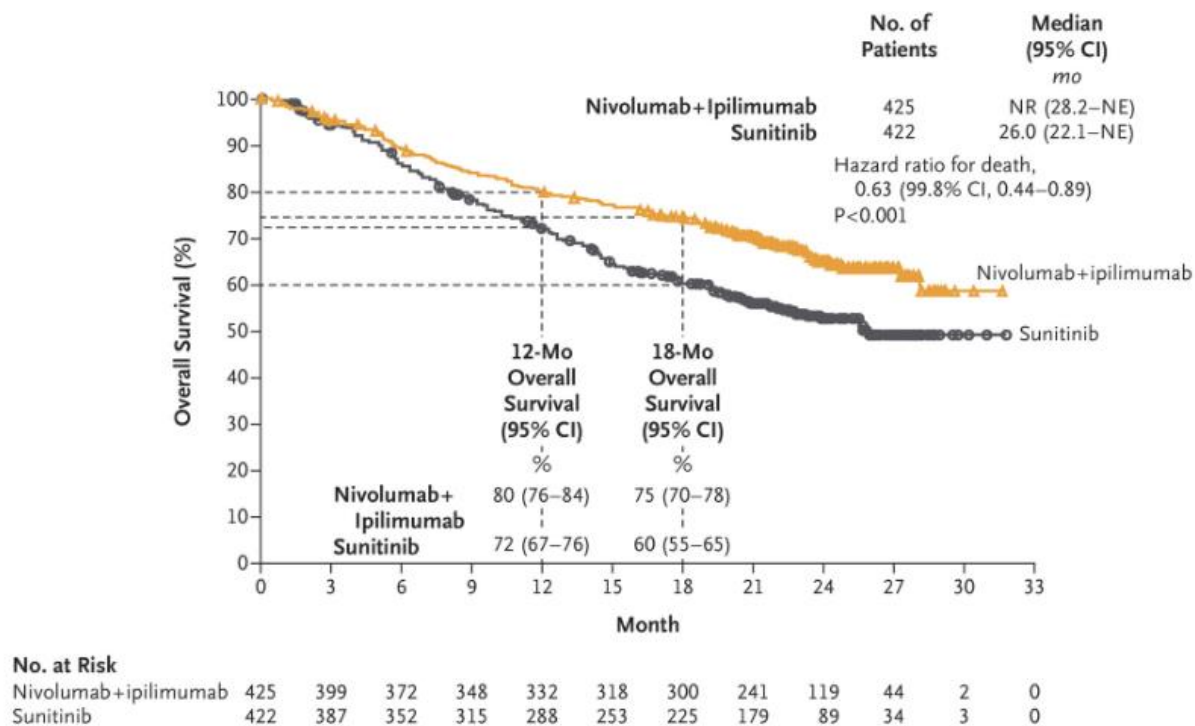


1.3.3. att. **Kaplan-Meier kopējās izdzīvošanas (OS) līknes metastātiskas RCC pacientiem (A)** *Bevacizumab* intravenozi 10 mg/kg 1x divās nedēļās + INF subkutāni 9 MIU 3x nedēļā; INF subkutāni 9 MIU 3x nedēļā + placebo 1x divās nedēļās; (B) *Bevacizumab* intravenozi 10 mg/kg 1x divās nedēļās + INF subkutāni 3 vai 6 MIU 3x nedēļā; *bevacizumab* intravenozi 10 mg/kg 1x divās nedēļās + INF subkutāni 9 MIU 3x nedēļā (51).

PD1 receptors ir šūnu membrānas proteīns, kas atrodas uz citotoksisko T limfocītu virsmas. PD1 receptoru aktivē PD-L1-2, kas savukārt lielā daudzumā tiek ekspresēti uz audzēju šūnu virsmas. PD1 aktivācija noved pie citotoksisko T limfocītu inaktivācijas, ļaujot audzēja šūnām nekontrolēti vairoties (1). Tādēļ PD1 receptora inaktivācija aktivē imūnās atbildes reakcijas, kas cīnās pret karcinomas šūnām. 2016. gadā ES tika reģistrēts *nivolumab*, kas ir cilvēka imūnglobulīns G4 un kas darbojas pret PD1 receptoriem, un tas terapijā tiek lietots kā otrās izvēles preparāts (2).

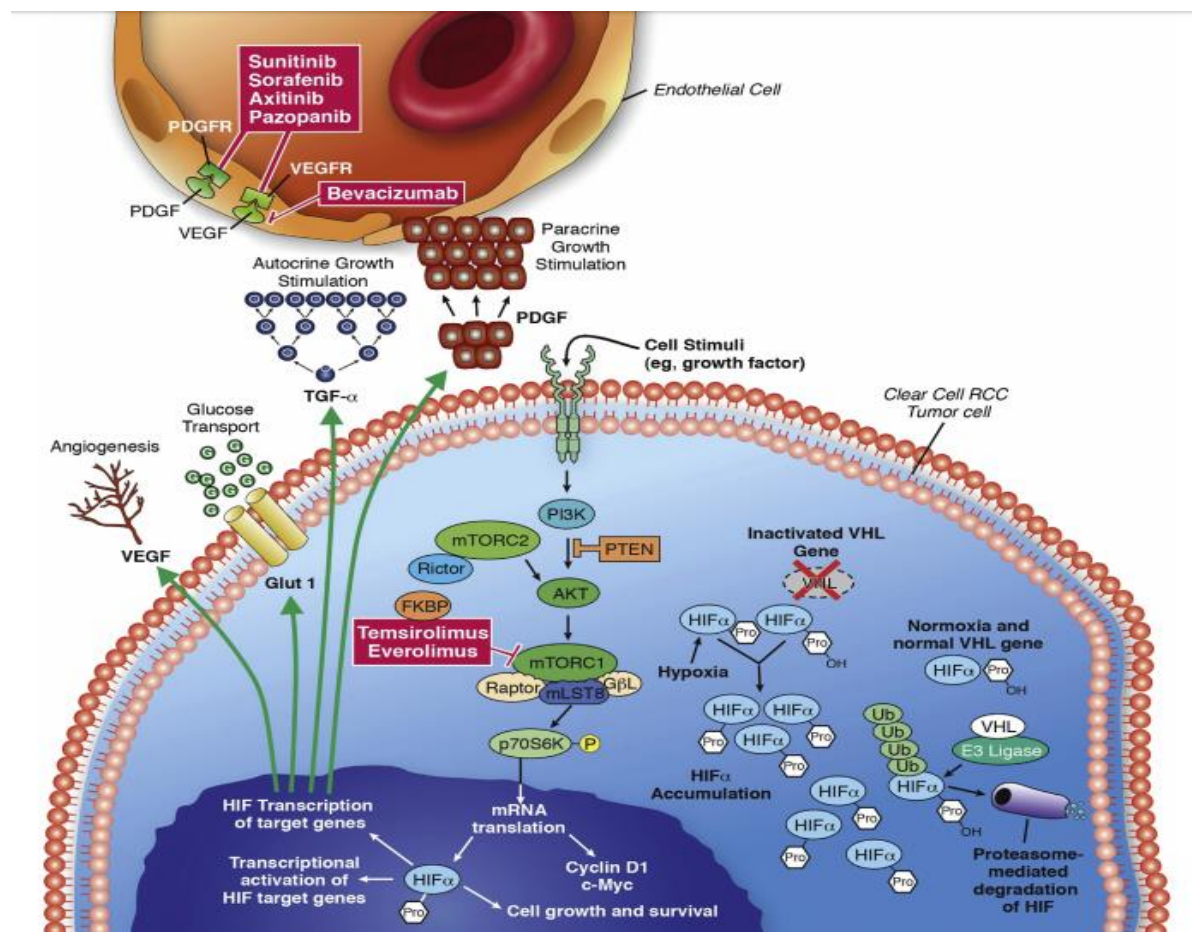
Veiksmīgie pētījumi ar PD1 receptoru inhibēšanu veicināja interesi arī par tā ligandu (PD-L1-2) darbības kontrolēšanu terapeitiskiem nolūkiem. PD-L1 ekspresē B šūnas, makrofāgi, dendrītiskās šūnas, asinsvadu endotēlija šūnas, aizkuņģa dziedzerā salīņu šūnas un miera stāvoklī esošas T šūnas, kamēr PD-L2 ekspresē tikai makrofāgi un dendrītiskās šūnas. PD-L1 un PD-L2 inhibē T limfocītu proliferāciju, adhēziju un kavē citokīnu produkciju (52). *Avelumab*

ir cilvēka imūnglobulīns G1, kas saistās ar PD-L1 un neļauj tam saistīties ar PD1 receptoru, tādā veidā aktivējot organisma pretaudzēju imūnās reakcijas, kā arī PD-L1 anti viela *atezolizumab* pētījumos uzrāda daudzsološus rezultātus RCC ārstēšanā (2,52). Nieru šūnu karcinomas terapijā var pielietot arī CTLA-4 kontrolpunkta inhibitoru *ipilimumab*, kas, inhibējot CTLA-4, pastiprina T šūnu aktivitāti. Pētījumos ir pierādīta *ipilimumab* un *nivolumab* kombinētās terapijas efektivitāte pie augsti attīstītas ccRCC (1.3.4. att.) (53).



1.3.4. att. **Kaplan-Meier *nivolumab* + *ipilimumab* un *sunitinib* kopējās izdzīvošanas (OS) līknes metastātiskas RCC pacientiem** *Nivolumab* intravenozi 3 mg/kg + *ipilimumab* intravenozi 1 mg/kg 1x trīs nedēļās indukcijas fāzē, pēc 4 devu saņemšanas *nivolumab* monoterapijā intravenozi 3 mg/kg 1x divās nedēļās; četras nedēļas no sešu nedēļu cikla *sunitinib* orāli 50 mg 1x dienā (54).

Uz ccRCC karcinoģenēzē iesaistīto signālceļu modificēšanu vērsto medikamentu darbības mehānismu var aplūkot 1.3.5. attēlā.



1.3.5. att. ccRCC karcinoģenēzē iesaistīto signālcēļu raksturojums, uz tiem mērķētie medikamenti, un to iedarbības vietas (43)

1.4. Ogļskābes anhidrāzes

Ogļskābes anhidrāzes (CA) tiek iedalītas sešās evolucionāri atšķirīgās grupās (α , β , γ , δ , ζ un η). Šiem enzīmiem ir svarīga loma jonu transportā, skābju-bāzu regulēšanā, gāzu apmaiņā, fotosintēzē un CO_2 fiksācijā. α grupa ir vislabāk raksturotā un parasti atrodama mugurkaulniekos, β un γ grupas atrodamas augstākajos augos un dažos prokariotos, un δ un ζ grupas ir novērotas tikai kramalģēs, savukārt η grupa tika atklāta salīdzinoši nesēn malārijas patogēnā *Plasmodium falciparum* (55).

α -CA ģimenē ietilpst 16 katalītiski aktīvi cinka metalloenzīmi, kas tiek iesaistīti atgriezeniskajā oglekļa dioksīda hidratācijā uz bikarbonātu un protonu. Šo enzīmu izoformas parasti savā starpā atšķiras ar to katalītisko aktivitāti, atrašanās vietu audos un lokalizāciju šūnā

– pašlaik izšķir citosola, mitohondriālās, sekretētās un ar membrānu saistītās CA izoformas. CA IX un CA XII izoformu pārmērīga ekspresija tiek novērota vairākos audzējos, kā arī tā tiek saistīta ar karcinomu palielinātu agresivitāti un proliferācijas spēju. Turklāt līdz pat 94% gaišo šūnu nieru karcinomas šūnās novēro palielinātu CA IX ekspresiju (56).

1.4.1. Ogļskābes anhidrāze IX

CA IX ir homodimērs, transmembrāns α -CA ģimenes cinka metalloenzīms, ko kodē devītajā hromosomā (9p12-13) atrodamais CA9 gēns. Ogļskābes anhidrāze IX ir 414 aminoskābes garš proteīns, kas var tikt sadalīts piecos dažādos domēnos. CA IX ekstracelulārā daļa satur signālpeptīda, proteoglikāna un katalītisko domēnu, bet membrānā atrodas hidrofobs transmembrānas domēns, kam seko intracelulārais domēns. Signālpeptīda domēns ir raksturīgs tieši CA IX un tiek saistīts ar šūnu adhēzijas spēju un katalītisko īpašību saglabāšanu skābā vidē. Ogļskābes anhidrāzes IX molekulmasa ir 49,5 kDa, taču SDS-PAGE (poliakrilamīda gēla elektroforēzes paveids) pārvietojas kā duplets ar molekulmasu 54 kDa un ar molekulmasu 58 kDa pēc post-translācijas modifikācijām (57).

Ogļskābes anhidrāze IX nietiek ekspresēta normālos nieru audos, taču hipoksijas un VHL gēna inaktivācijas rezultātā akumulējas HIF-1 α , kas savukārt veicina CA IX ekspresiju un ccRCC attīstību (58). Ogļskābes anhidrāzes IX ekspresija tiek novērota arī veselos audos – piemēram, gastrointestinālā trakta audos, ar visaugstāko ekspresijas līmeni kuņģa endotēlija šūnu bazolaterālajā virsmā un gļotādās. Neskaitot gaišo šūnu nieru karcinomu, ar CA IX pozitīvi paraugi ir iegūti no plaušu, smadzeņu, resnās zarnas, aizkuņģa dziedzera, aknu, krūts, barības vada, endometrija, olnīcu un ādas karcinomām (57). CA IX ekspresiju audzējā var noteikt ar imūnhistoķīmijas testiem (*ELISA* un *Western blot*) un, izmantojot reālā laika PQR, kas papildus morfoloģiskai audzēja diagnostikai palīdz apstiprināt attiecīgo diagnozi (58,59).

CA9 gēns hipoksijas laikā tiek ekspresēts visvairāk, jo tam ir būtiska loma intracelulārā pH uzturēšanā normas robežās, tādējādi palīdzot karcinomas šūnām pielāgoties toksiskajiem ekstracelulārās vides efektiem. Turklāt CA IX palielinātā aktivitāte veicina audzēja šūnu izplatīšanos organismā, paaugstinot audzēja agresivitāti un invazivitāti (60).

1.4.2. pH izmaiņas audzēja šūnās

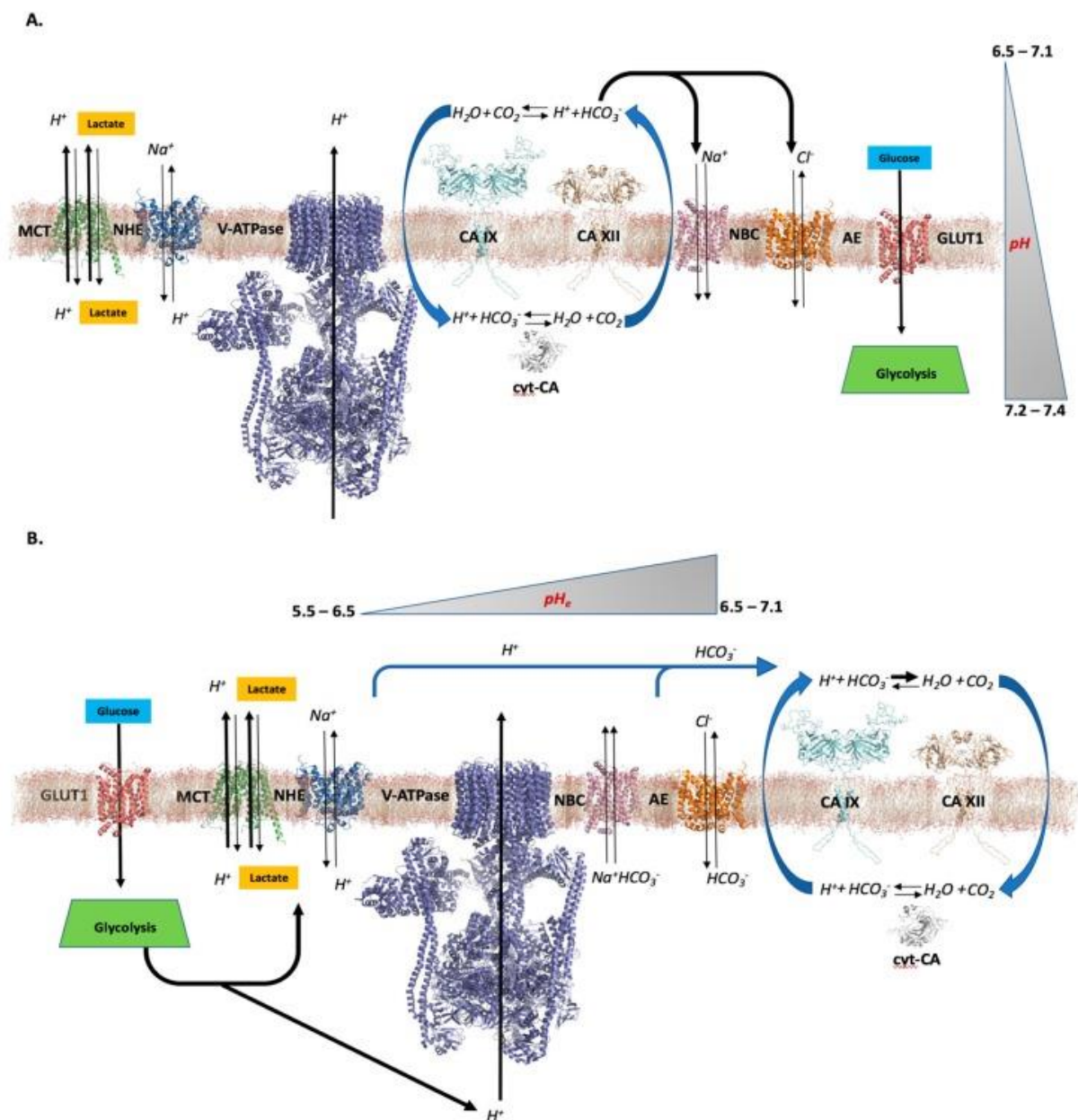
Visa ķermeņa skābju-bāzu regulēšanas pamatprincips ir labvēlīga ekstracelulārā pH (pH_e) uzturēšana normas robežās ($pH_e \sim 7,4$). pH_e ir atkarīgs no CO_2 un HCO_3^- koncentrācijas, kas veido bioloģisko buferšķīdumu. Organismā plaušas un nieres nodrošina nemainīgu pH_e , kontrolējot plazmas CO_2 koncentrāciju, tā parciālo spiedienu, kā arī bikarbonātu koncentrāciju (HCO_3^-). Ja skābju-bāzu līdzsvars tiks izjaukts, nevēlamā ietekme uz pH_e tiks mazināta, pateicoties momentānai reakcijai ar bioloģisko buferšķīdumu, kam sekos lēnākas fizioloģiskās izmaiņas, kas centīsies atgriezt sākotnējo CO_2 parciālo spiedienu un bikarbonātu koncentrāciju. Galvenokārt skābes organismā rodas no aerobas un anaerobas šūnu elpošanas, kas veido CO_2 un pienskābi. Ja skābe šūnā tiktu uzkrāta, intracelulārais pH (pH_i) samazinātos līdz bīstami zēmam līmenim, kas novestu pie šūnu darbības, augšanas un dalīšanās traucējumiem, kā arī izraisītu šūnu apoptozi. Taču, lai izvairītos no šādām sekām, šūnas spēj izveidot membrānas transporta mehānismus, kas var transportēt skābes ekstracelulārajā telpā, tādā veidā uzturot labvēlīgu $pH_i \sim 7,2$ (61).

Lielākajai daļai audu normālos apstākļos pH_e ir sārmainis savukārt pH_i tuvinās neitrālam, taču *Otto Warburg* 1930tajos gados pierādīja, ka audzēju šūnas, neatkarīgi no pieejamā skābekļa daudzuma, lielos daudzumos ražo pienskābi, kas kopā ar nepietiekamu šūnu apasiņošanu un hipoksiju noved pie acidozes. Vēlākos pētījumos tika atklāts, ka audzēju šūnās acidoze ir novērojama tikai ekstracelulārajā telpā, taču intracelulārajā telpā pH svārstības bija minimālas, pH_i drīzāk esot sārmainam, netraucējot audzēja šūnām proliferāciju. Šobrīd jau ir noskaidrots, ka zems pH_e palīdz vēža šūnām augt un attīstīties, kā arī veidot metastāzes (61). Skābais pH_e uzlabo ekstracelulārā matricas reorganizējošo proteāžu, piemēram, matricas metalloproteināžu un katepsīna B ekspresiju, turklāt paaugstinātais pH_i rada vidi, kas uzlabo jaunu aktīva pavedienu veidošanos, aktivējot kofilīnu, villīnu, profilīnu, tvinfilīnu un talīnu (55).

Šis unikālais pH profils audzēja šūnām ļauj apiet šūnu cikla pārbaudes punktus un izvairīties no apoptozes ceļiem. Kad $pH_i \geq 7,2$, palielinās ciklīna atkarīgās kināzes (CDK), īpaši CDK1, aktivitāte, kas palielina mitogēna aktivētās proteīnkināzes (MAPK) ceļu aktivitāti, kas savukārt stimulē šūnu progresēšanu no G2/M fāzes uz S fāzi, kurā audzēja šūnas ir mazāk jutīgas pret ķīmijterapiju un staru terapiju. Turklāt paaugstināts pH_i mazina kontrolpunktu

aktivitāti, kas atbildīgi par DNS bojājumiem un normālos apstākļos kavētu šūnu izešanu no G2/M fāzes un tālāku šūnu proliferāciju (55).

Audzēja mikrovide būtiski ietekmē karcinomas veidošanās procesu, un bieži vien apasiņošana strauji proliferējošajām audzēju šūnām nav pietiekama, radot hipoksiju un liekot šūnām pielāgoties jaunajiem apstākļiem. Viena no būtiskākajām izmaiņām ir audzēja šūnu pāriešana uz anaerobo glikolīzi, kā rezultātā pastiprinās šūnu acidoze (60). Papildus tam audzēja šūnas caur HIF-1 α pastiprina hipoksijai raksturīgo gēnu transkripciju, kā arī CA9 transkripciju – *Wykoff et al.* pētījumā atklāja, ka CA9 gēna promotera darbību regulē HIF (62). Pēdējo gadu laikā ir atklāts, ka α -CA ģimene nodrošina audzēju šūnām labvēlīgo ekstracelulāro un intracelulāro pH atšķirību. Pašlaik precīzs darbības mehānisms nav zināms, taču pastāv divas hipotēzes, skatīt 1.4.2. att. (55). Turklāt *Andreucci et al.* pētījumā konstatēja, ka pārejas un hroniskas ekstracelulārās acidozes laikā audzēja šūnas palielina CA IX ekspresiju (63).



1.4.2. att. CA funkcionālā loma hipoksiskā audzēja mikrovidē (A) 1. hipotēze: CA IX un CA XII atrodas ekstracelulārajā membrānā blakus transportproteīniem, kas iesaistīti pH regulēšanā. Šajā gadījumā CA IX un CA XII darbojas kopā ar cyt-CA, lai pārstrādātu ūdens substrātus, CO_2 , HCO_3^- un protonus, lai saglabātu diferenciālo pH mikrovidi šūnā. (B) 2. hipotēze: ekstracelulārā CA IX un CA XII darbojas, lai paaugstinātu pH_e , kas ir samazinājies līdz $<6,0$ glikolīzes blakusproduktu pārmērīgas izdalīšanas dēļ. Šajā gadījumā CA IX un CA XII katalītiski veicina HCO_3^- dehidratāciju un protonu sekvestrāciju. Tikmēr cyt-CA darbojas, pārvēršot lieko CO_2 uz HCO_3^- , tādējādi buferējot pH_i un nodrošinot substrātus, kas tiek nogādāti uz ekstracelulāro virsmu, kur tos tālāk izmanto CA IX un CA XII (55).

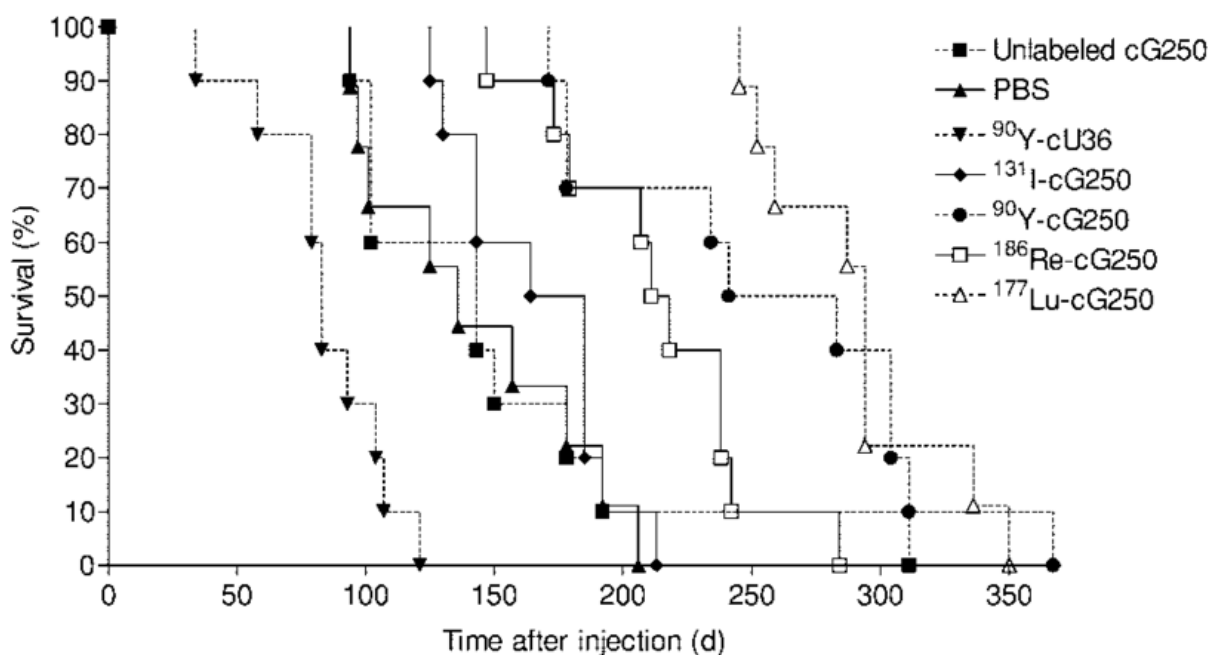
1.4.3. Potenciālās zāļu vielas, kas mērķētas uz CA IX inhibīciju

Karcinomām raksturīgā mikrovide veicina audzēja šūnu attīstību, kā arī mazina terapeitisko līdzekļu efektivitāti un palielina rezistences rašanās iespēju. CA IX ir viens no enzīmiem, kas palīdz karcinomas šūnām pielāgoties un izmainīt metabolisma ceļus, tādēļ pašlaik tiek pētītas vairākas vielas, kas šos mehānismus nomāktu (64). Tādas mazas molekulas, kā SLC-0111 un E7070, un monoklonālās antivielas, piemēram, G250 tiek pārbaudītas klīniskajos pētījumos, un, līdz šim iegūtie dati, norāda uz to efektivitāti un nākotnes pielietošanas iespējām (57).

SLC-0111 (4-(4-fluorfenilureido)-benzolsulfonamīds) ir sulfonamīda ogļskābes anhidrāzes inhibitors, kas dzīvnieku modeļos uzrāda augstu CA IX un CA XII inhibīciju, nodrošinot pretaudzēja un metastāzes mazinošas īpašības. Turklāt pēc ārstēšanas ar SLC-0111 novēro audzēja cilmes šūnu populācijas samazināšanos (65). 2014. gadā tas nonāca klīnisko pētījumu pirmajā fāzē, kuru veiksmīgi noslēdza 2016. gadā, ar iespējamo indikāciju pie advancētām hipoksiskām karcinomām ar metastāzēm (57,65).

E7070 jeb *indisulam* ir hlorindolilsulfonamīda pretvēža līdzeklis, kas izraisa devas un laika atkarīgu šūnu cikla apstāšanos G1 fāzē un G1/S kontrolpunkta darbības traucējumus, un S-fāzes progresijas aizkavi (66). Sākotnēji tika domāts, ka *indisulam* savu pretaudzēja darbību galvenokārt realizē caur saistīšanos ar CA IX cinka-saistošo grupu, taču pētījumos tika atklāts, ka šūnu cikla progresiju regule tā saistīšanās ar ciklīna – atkarīgajām kināzēm un tālāka to inhibīcija. *Indisulam* gan Eiropā, gan ASV klīnisko pētījumu pirmajā fāzē nonāca 2005. gadā, un pašlaik tā iedarbība un panesamības spēja tiek pētīta jau klīnisko pētījumu otrajā fāzē (57).

G250 jeb *girentuximab* ir peles monoklonālās antivielas (mAb) IgG1 k vieglās ķēdes himēriska versija, kas atpazīst CA IX kā antigēnu. *Girentuximab* pretvēža aktivitāte rodas no antivielu atkarīgās šūnu citotoksicitātes, taču nevar izslēgt arī citus mehānismus. Tomēr jaunākajos klīniskajos pētījumos ar augsta riska ccRCC pacientiem netika atklāti būtiski *girentuximab* klīniskie ieguvumi (67). G250 var tikt konjugēts ar radioaktīviem aģentiem un ķīmijterapijas zālēm, tādējādi palīdzot tās specifiski nogādāt uz audzēja šūnām. Klīniskajos pētījumos ir nonākusi *girentuximab* konjugācija ar radioaktīvo I^{131} un konjugācija ar radioaktīvo I^{124} , kas tiek testēti karcinomu *radio-immuno* detekcijai un radioimunoterapijai, kas tieši mērķēta uz cilvēka CA IX (57). Turklāt citas *girentuximab* konjugācijas, piemēram, ar ^{177}Lu un ^{90}Y peļu modelī uzrāda vēl lielāku terapeitisko efektu (skatīt 1.4.3.1. att.) (68).



1.4.3.1. att. Izdzīvošanas līknes ¹³¹I-cG250, ¹⁸⁶Re-MAG3-cG250, ⁹⁰Y-ITC-Bz-DTPA-cG250, ¹⁷⁷Lu-ITC-Bz-DTPA-cG250 un kontroles grupām – cG250, PBS un 5,6 MBq [150 mCi] ⁹⁰Y-cU36 Dati tika iegūti, analizējot dzīvotspēju pelēm ar subkutāniem nieru šūnu audzējiem.

Vēl viena potenciāli nieru karcinomas terapijā pielietojama viela ir BAY 79-4620, kas ir antivielas-zāļu konjugāts. Šis konjugāts tika veidots no cilvēka antivielas fragmenta (Fab), kas specifisks CA IX, un no citotoksiska ķīmijterapijas līdzekļa monometiluristatīna E. BAY 79-4620 preklīniskajos pētījumos peļu modeļos uzrādīja spēcīgu pretvēža efektivitāti, un dažos pētāmajos modeļos konstatēja daļēju vai pilnīgu audzēja saraušanos pat pēc vienreizējas devas saņemšanas (69).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Šūnu atsaldēšana un izsēšana

Aprīkojums: centrifūga, ūdens vanna-termostats, laminārās plūsmas skapis, inkubators ar kontrolētu CO₂ un t⁰ režīmu;

Materiāli un reaģenti: seroloģiskās pipetes, šūnu kultivēšanas flakoni (T75), sterili 15 mL centrifugēšanas stobriņi, sasaldētas RCC-MF un RC-124 šūnas, barotnes – sagatavota RPMI 1640 barotne ar 4,5 g/L L-glutamīnu (Gibco, Nr. 61870-010) un 10% liellopa fetālo serumu (FBS) (50 mL=45 mL + 5 mL) RCC-MF šūnām un McCoy's 5A barotne ar 4,5 g/L glikozi, L-glutamīnu (Gibco, Nr. 26600-023) un 10% FBS RC-124 šūnām.

Sagatavošanās darbam: 10-20 min pirms darba uzsākšanas dezinficē laminārās plūsmas skapi ar UV gaismu un tad apstrādā ar 70% etilspirta šķīdumu. Barotnes ūdens vannā uzsilda līdz ~37⁰ C. Flakonus marķē, norādot šūnu līniju, pasāžas numuru, izsēšanas datumu un darba veicēja iniciāļus. Visus piederumus un reaģentu traukus, kas nav uzskatāmi par steriliem, pirms ienešanas laminārā dezinficē ar 70% etilspirta šķīdumu.

Darba gaita:

1. 15 mL centrifugēšanas stobriņā iepilda 9 mL uzsildītās barotnes;
2. Sasaldētās šūnas atkausē, maigi šūpojot kriostobriņu ūdens vannā ~1 min;
3. Ar seroloģisko pipeti pārnes kriostobriņa saturu 15 mL centrifugēšanas stobriņā ar barotni;
4. Centrifugē iegūto suspensiju 5min pie 300 g, lai atbrīvotos no dimetilsulfoksīda;
5. Nolej centrifugātu, un resuspendē šūnas 10 mL barotnes;
6. Ar seroloģisko pipeti pārnes barotni ar šūnām uz atbilstoši nomarkēto T75 flakonu, to aizskrūvē un nedaudz pašūpo, lai šūnas vienmērīgi sadalītos pa flakona laukumu;
7. Šūnas kultivē inkubatorā 37⁰ C pie 5% CO₂;
8. Darbības atkārto ar otras līnijas šūnām.

Darba beigšana: izslēdz izmantoto aprīkojumu, izmet atkritumos vienreiz lietojamus piederumus, ar deterģenta palīdzību neitralizē bioloģisko materiālu, izmazgā, noslauka un ar 70% etanola šķīdumu dezinficē lietotos traukus, notīra laminārās plūsmas skapi ar 70% etilspirta šķīdumu, un tad to 10-20 min apstrādā ar UV gaismu. Atlikušās barotnes ievieto 4⁰ C

temperatūrā. Nākamajā dienā ar seroloģisko pipešu palīdzību nomaina barotnes, lai atbrīvotos no šūnām iespējams toksiskām vielām.

2.2. Šūnu pārsēšana

Aprīkojums: gaismas mikroskops (AMG EVOS xl), laminārās plūsmas skapis, inkubators ar kontrolētu CO₂ un t⁰ režīmu, centrifūga, ūdens vanna-termostats;

Materiāli un reaģenti: seroloģiskās pipetes (10 mL, 5 mL), šūnu kultivēšanas flakoni (T75), sterili 15 mL centrifūgas stobriņi, Tryple Express, fosfora bufera šķīdums (PBS), barotnes – sagatavota RPMI 1640 barotne ar 4,5 g/L L-glutamīnu (Gibco, Nr. 61870-010) un 10% FBS RCC-MF šūnām vai McCoys 5A barotne ar 4,5 g/L glikozi, L-glutamīnu (Gibco, Nr. 26600-023) un 10% FBS RC-124 šūnām.

Sagatavošanās darbam: Izmantojot mikroskopu, nosaka, vai barotne ar šūnām nav kontaminēta un vai šūnas ir sasniegušas izmērus, kad tās nepieciešams pārsēt (saplūdušas $\geq 80\%$ šūnu). 10-20 min pirms darba uzsākšanas dezinficē laminārās plūsmas skapi ar UV gaismu un tad apstrādā ar 70% etilspirta šķīdumu. Jaunās barotnes un Tryple Express ūdens vannā uzsilda līdz $\sim 37^{\circ}\text{C}$. Jaunos flakonus marķē, norādot šūnu līniju, pasāžas numuru, pārsēšanas datumu un darba veicēja iniciāļus. Visus piederumus un reaģentu traukus, kas nav uzskatāmi par steriliem, pirms ienešanas laminārā dezinficē ar 70% etilspirta šķīdumu.

Darba gaita:

1. Pārsējamo šūnu flakonu izņem no inkubatora;
2. Ar seroloģiskās pipetes palīdzību no flakona izlej veco barotni;
3. Šūnas uzmanīgi skalo ar 10mL PBS;
4. Ar seroloģiskās pipetes palīdzību nolej PBS, un ar jaunu seroloģisko pipeti pievieno 3mL Tryple Express;
5. Aizskrūvē flakonu, un ar rotējošām kustībām noklāj šūnu slāni ar Tryple Express, liek flakonu inkubatorā 37°C uz ~ 4 min;

6. Ar mikroskopu pārbauda, vai šūnas ir atdalījušās no flakona sienīnām un brīvi peld šķīdumā. Nepieciešamības gadījumā atdalīšanos stimulē mehāniski, viegli piesitot flakona sienīnām no ārpusē;
7. Flakonā pievieno jauno barotni līdz kopējam šķīduma tilpumam 10 mL, pārnes iegūto suspensiju 15 mL centrifugēšanas stobriņā, ko ievieto centrifūgā uz 5 min ar 300 g;
8. Nolej centrifugātu, resuspendē iegūtās šūnu nogulsnes 3 mL jaunās barotnes;
9. 1/3 daļu (1 mL) suspensijas pārnes iepriekš nomarkētajā T75 flakonā, pievieno 10mL jaunās barotnes, flakonu aizskrūvē, un šūnas kultivē inkubatorā 37⁰ C pie 5% CO₂ koncentrācijas.

Darba beigšana: izslēdz izmantoto aprīkojumu, izmet atkritumos izlietos flakonus un vienreiz lietojamus piederumus, ar deterģenta palīdzību neitralizē bioloģisko materiālu, izmazgā, noslauka un ar 70% etanola šķīdumu dezinficē lietotos traukus, notīra laminārās plūsmas skapi ar 70% etilspirta šķīdumu, un tad to 10-20 min apstrādā ar UV gaismu. Atlikušās barotnes un Tryple Express ievieto 4⁰ C temperatūrā.

2.3. Plūsmas citometrija

Aprīkojums: ūdens vanna-termstats, centrifūga, laminārās plūsmas skapis, plūsmas citometrs Amnis ImageStreamX MKII, Luna šūnu skaitītājs.

Materiāli un reaģenti: seroloģiskās pipetes, mikropipetes, pipešu uzgaļi, 1 mL šļirces, 40 μm šūnu streineris, parafilma, šūnu skaitīšanas kambaris, šūnu skaitītājs, 15 mL centrifugēšanas stobriņi, 1,5 mL centrifugēšanas stobriņi, PBS, FBS, Tryple Express, tripānzilā krāsviela, antivielas anti-CA9-APC (R&D Systhems, Nr. FAB2188A) un anti-IgG2a-APC (R&D Systhems, Nr. IC003A), PBS + 4% FBS šķīdums, PBS + 10% FBS šķīdums, barotnes – sagatavota RPMI 1640 barotne ar 4,5 g/L L-glutamīnu (Gibco, Nr. 61870-010) un 10% liellopa fetālo serumu (FBS) RCC-MF šūnām vai McCoys 5A barotne ar 4,5 g/L glikozi, L-glutamīnu (Gibco, Nr. 26600-023) un 10% FBS RC-124 šūnām.

Sagatavošanās darbam: 10-20 min pirms darba uzsākšanas dezinficē laminārās plūsmas skapi ar UV gaismu un tad apstrādā ar 70% etilspirta šķīdumu. Barotnes un Tryple Express ūdens

vannā uzsilda līdz $\sim 37^{\circ}\text{C}$. Visus piederumus un reaģentu traukus, kas nav uzskatāmi par steriliem, pirms ienešanas laminārā dezinficē ar 70% etilspirta šķīdumu.

Darba gaita:

1. Plūsmas citometrijai paredzētās šūnu līnijas flakonu izņem no inkubatora;
2. Ar seroloģiskās pipetes palīdzību no flakona izlej barotni;
3. Šūnas skalo ar 10 mL PBS;
4. Ar seroloģiskās pipetes palīdzību nolej PBS, un ar jaunu seroloģisko pipeti T75 flakonam pievieno 3 mL Tryple Express.
5. Flakonu aizskrūvē un ar rotējošām kustībām noklāj šūnu slāni ar Tryple Express, liek flakonu inkubatorā 37°C uz ~ 4 min;
6. Flakonā pievieno 8 mL barotnes, pārnes iegūto suspensiju uz 15 mL centrifugēšanas stobriņu, un to centrifugē 5 min pie 300 g;
7. Nolej centrifugātu, resuspendē iegūtās šūnu nogulsnes 1 mL barotnes;
8. Skaita šūnas:
 - a) 10 μm resuspendēto šūnu pārnes uz parafilmas;
 - b) Šūnām pievieno 10 μL tripānzilās krāsvielas;
 - c) Kārtīgi sapipetē un 10 μL iepilda šūnu skaitīšanas kambarī, šūnu skaitīšanu veicot ar Luna skaitītāju;
 - d) Šūnu skaitīšanas kambari ievieto šūnu skaitītājā, iegūst šūnu skaitu 1 mL šķīduma;
9. Pārnes 3 paraugiem nepieciešamo šūnu skaitu (katrā paraugā $2,5 \cdot 10^5$ šūnas, tātad kopā $7,5 \cdot 10^5$ šūnas) uz 1,5 mL centrifugēšanas stobriņu un papildina ar 1 mL PBS + 4% FBS šķīdumu;
 - a) Ņem aptuveni 130-150% no nepieciešamā skaita, jo darba gaitā var rasties zudumi;
10. Šūnas ar šļirces palīdzību laiž caur šūnu 40 mikrometru neilona sietu, pārnesot tās jaunā 1,5 mL centrifugēšanas stobriņā;
11. Šūnas centrifugē 3 minūtes pie 300 g;
12. Nolej centrifugātu, un 10 min istabas temperatūrā inkubē šūnas 1 mL PBS + 10% FBS, lai samazinātu nespecifisko antivielu saistīšanos. Tikmēr sagatavo 3 plūsmas citometrijas stobriņus un antivielas;
13. Tad atkal veic parauga centrifugēšanu 3 min pie 300 g;
14. Nolej centrifugātu, un resuspendē šūnas ar PBS + 4% FBS līdz aptuvenai koncentrācijai $0,75 \times 10^6$ šūnas/100 μL ;

15. Katrā plūsmas citometrijas stobriņā iepilda ~50 µL iegūtās šūnu suspensijas. Viens stobriņš tiks izmantots izotipu kontrolei ar anti-IG2a-APC, otrs – inkubācijai ar CA IX antivielu anti-CA9-APC, bet trešais – negatīvajai kontrolei, stobriņus attiecīgi nomarkē;
16. Izotipu kontroles paraugam pievieno 9 µL PBS + 4% FBS šķīdumu un 1 µL anti-IgG2a-APC, lai antivielas gala atšķaidījums būtu 1:60;
17. CA9 testa paraugam pievieno 9 µL PBS + 4% FBS šķīdumu un 1 µL anti-CA9-APC, lai antivielas gala atšķaidījums būtu 1:60;
18. Negatīvās kontroles paraugam pievieno 10 µL PBS + 4% FBS šķīdumu;
19. Visus trīs paraugus inkubē istabas temperatūrā 30 minūtes. Inkubācijas laikā sagatavo darbam plūsmas citometru;
20. Pēc inkubācijas paraugus centrifugē 3 min pie 300 g, tad nolej centrifugātu;
21. Šūnas divas reizes mazgā ar 500 µL PBS + 4% FBS šķīdumu (vienreiz pievieno 500 µL, centrifugē pie 300 g, nolej centrifugātu, darbību atkārto);
22. Pēc mazgāšanas iegūtās šūnu nogulsnes resuspendē 30 µL PBS + 4% FBS šķīdumā;
23. Veic plūsmas citometriju, izmantojot Amnis ImageStreamX MKII, analizē iegūtos datus;
24. Darbības atkārto ar RCC-MF/RC-124 šūnām.

Darba beigšana: izslēdz izmantoto aprīkojumu, izmet atkritumos vienreiz lietojamus piederumus, ar deterģenta palīdzību neitralizē bioloģisko materiālu, izmazgā, noslauka un ar 70% etanola šķīdumu dezinficē lietotos traukus, notīra laminārās plūsmas skapi ar 70% etilspirta šķīdumu, un 10-20 min to apstrādā ar UV gaismu. Atlikušās barotnes, Tryple Express un antivielas ievieto 4⁰ C temperatūrā.

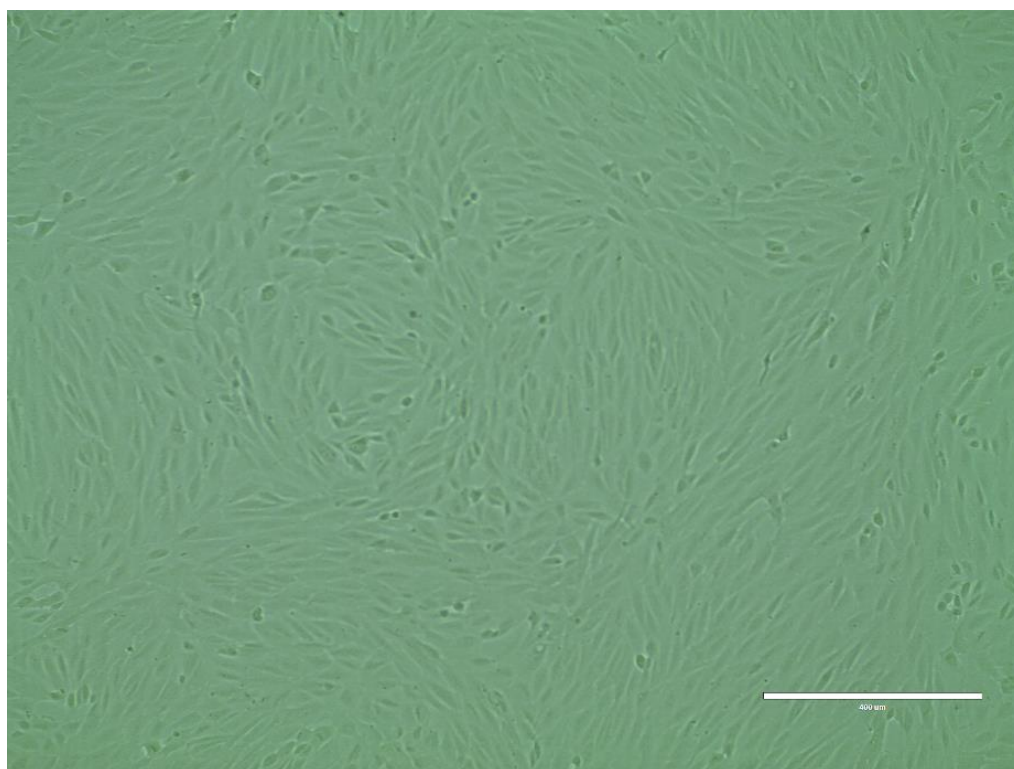
2.4. CA IX antivielas titrēšana plūsmas citometrijas metodes izstrādei

Paraugu sagatavošana notiek atbilstoši iepriekš aprakstītajam plūsmas citometrijas protokolam, izmantojot RCC-MF un RC-124 šūnu līnijas, un antivielu anti-CA9-APC (R&D Systems, Nr. FAB2188A). Katrai šūnu līnijai tiek pagatavoti 6 paraugi ar atšķirīgu kopējo antivielas gala atšķaidījumu – 1:60, 1:120, 1:240, 1:480, 1:960 un paraugs bez pievienotas antivielas. Lai noskaidrotu optimālo koncentrāciju, kurā anti-CA9-APC visefektīvāk saistās ar tai specifisko proteīnu, ar visiem paraugiem tiek veikta plūsmas citometrija.

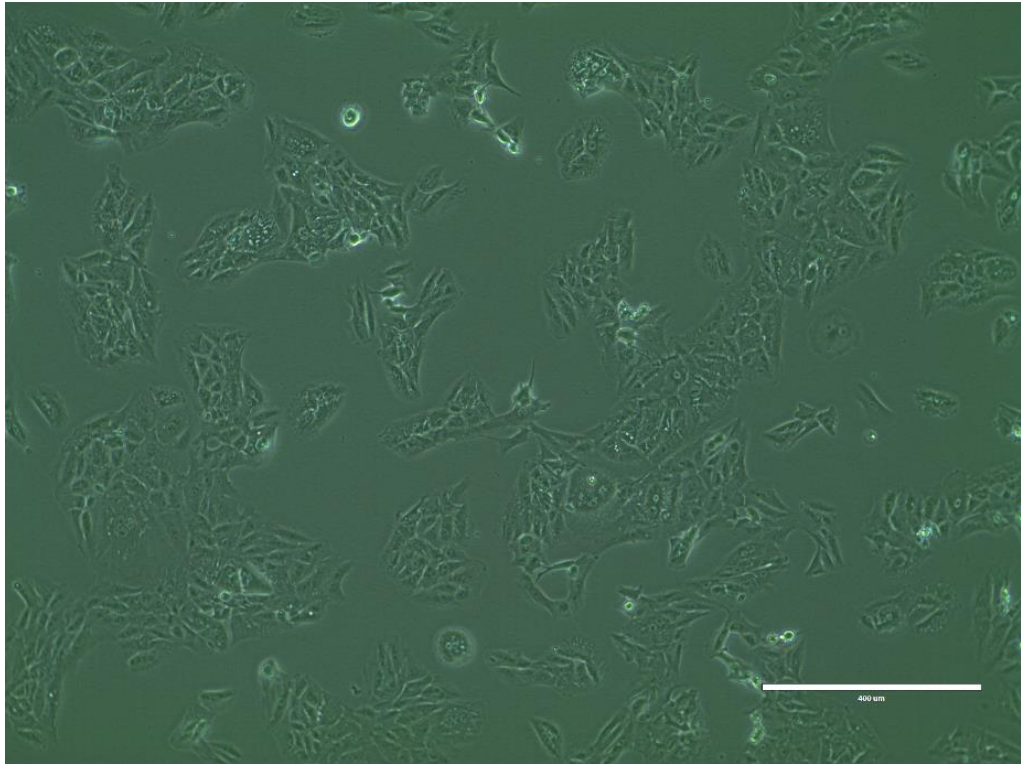
3. REZULTĀTI

3.1. Šūnu kultivēšana

Lai šūnas varētu izmantot plūsmas citometrijai, tās pēc izsēšanas tika audzētas aptuveni nedēļu. RC-124 un RCC-MF šūnu līniju morfoloģiskā uzbūve var tikt aplūkota 3.1.1. un 3.1.2. attēlā, kas iegūti, šūnas aplūkojot ar gaismas mikroskopu (AMG EVOS xl). RC-124 šūnas ir aptuveni vienāda lieluma, blīvi noklājušas flakona pamatni, šūnām novērojama fibroblastiem raksturīgā vārpstveida forma, taču RCC-MF šūnas dažāda izmēra un formas, nevienmērīgi noklājot flakona pamatni. Attēli tika uzņemti 3 dienas pēc šūnu izsēšanas 10x palielinājumā. Aplūkojot tos, var novērot atšķirīgo šūnu līniju morfoloģiju un augšanas ātrumu. RC-124 šūnas nākamajā dienā tika pārsētas, lai izvairītos no šūnu bojāejas, ko izraisītu to pārāk lielais blīvums barotnē.



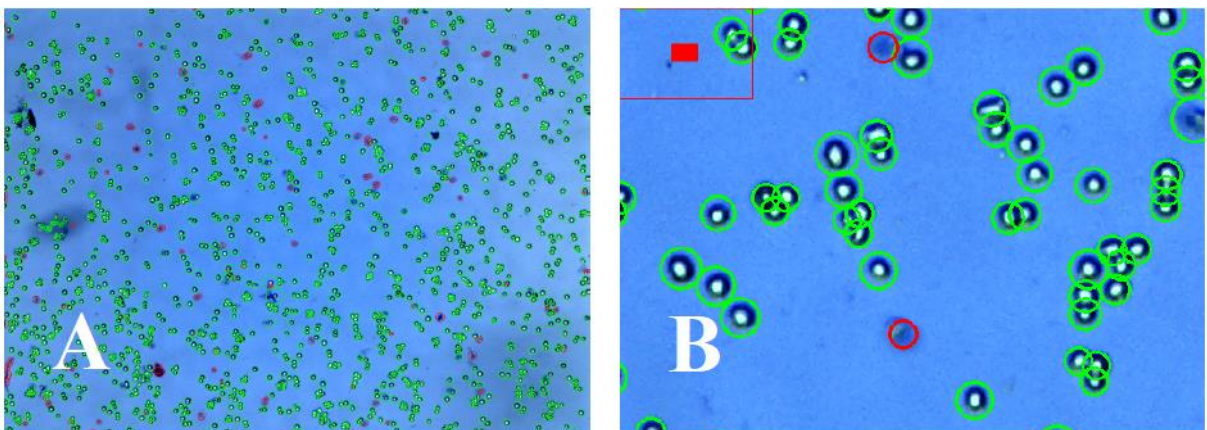
3.1.1. att. RC-124 šūnas 10x palielinājumā Nogriežņa mērogs 400 μm



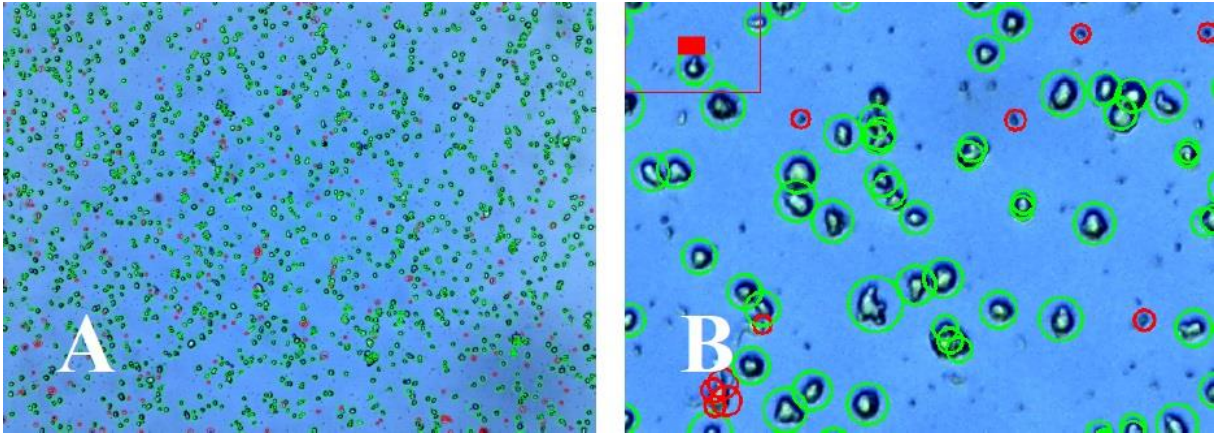
3.1.2. att. RCC-MF šūnas 10x palielinājumā Nogriežņa mērogs 400 μm

3.2. Šūnu skaitīšana

Šūnu skaitīšanai tika izmantots Luna šūnu skaitītājs, RC-124 un RCC-MF šūnu skaitīšanas attēlus var aplūkot 3.2.1. un 3.2.2. attēlā.

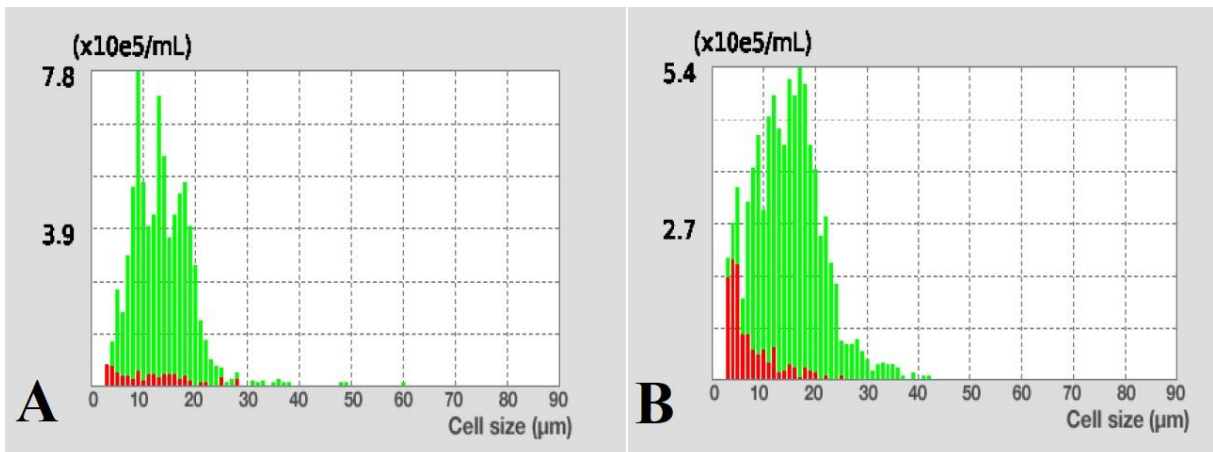


3.2.1. att. RC-124 šūnu skaitīšanas attēli (A) 1x palielinājums; (B) 16x palielinājums; zaļš – veselas šūnas, sarkans – bojātās šūnas (K. Pleiko pers. ziņ.)



3.2.2. att. **RCC-MF šūnu skaitīšanas attēli** (A) 1x palielinājums; (B) 16x palielinājums; **zaļš** – veselas šūnas, **sarkans** – bojātās šūnas (K. Pleiko pers. ziņ.)

RC-124 šūnas uzrādīja 93,8% dzīvotspēju un vidējo šūnu izmēru 13,4 μm , savukārt RCC-MF šūnas uzrādīja 87% dzīvotspēju un vidējo šūnu izmēru 14,8 μm . RC-124 paraugā kopējā šūnu koncentrācija bija 7.68×10^6 šūnas/mL, kamēr dzīvo šūnu koncentrācija bija 7.21×10^6 šūnas/mL un apoptotisko šūnu koncentrācija bija 4.77×10^5 šūnas/mL. RCC-MF paraugā kopējā šūnu koncentrācija bija 8.32×10^6 šūnas/mL, dzīvo šūnu koncentrācija bija 7.24×10^6 šūnas/mL, bet apoptotisko šūnu koncentrācija bija 1.08×10^6 šūnas/mL, šūnu koncentrācijas atkarībā no šūnu lieluma var aplūkot 3.2.3. attēlā.



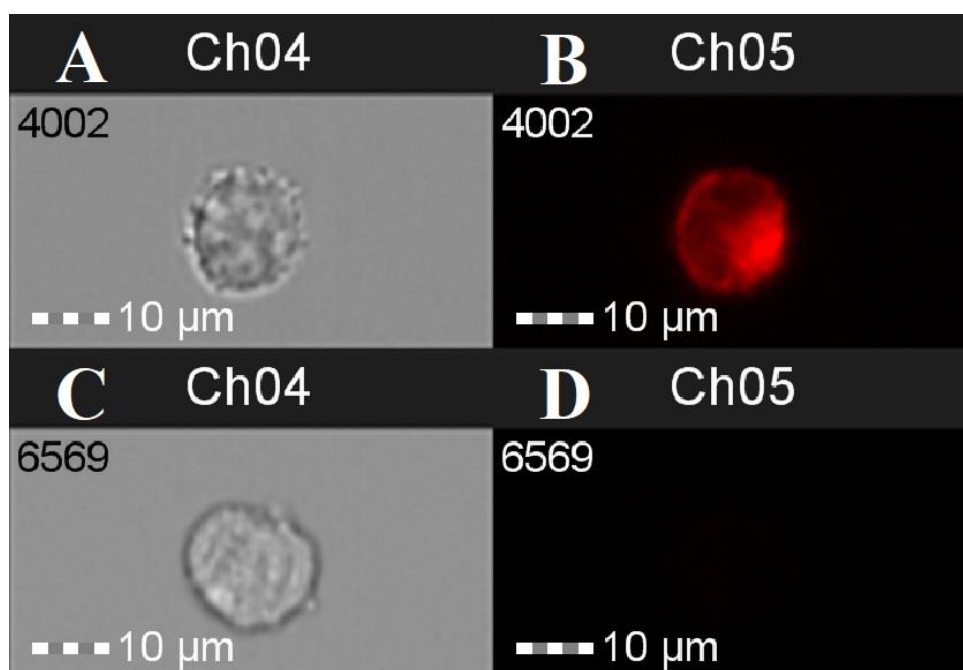
3.2.3. att. **Histogrammas šūnu koncentrācijai atšķirīgos šūnu lielumos** (A) – RC-124; (B) – RCC-MF; **zaļš** – dzīvās šūnas, **sarkans** – apoptotiskās šūnas (K. Pleiko pers. ziņ.)

Augstāk minētie dati raksturo vidējos RC-124 un RCC-MF šūnu parametrus, kas tiek iegūti parauga sagatavošanā un raksturīgi konkrētai šūnu līnijai.

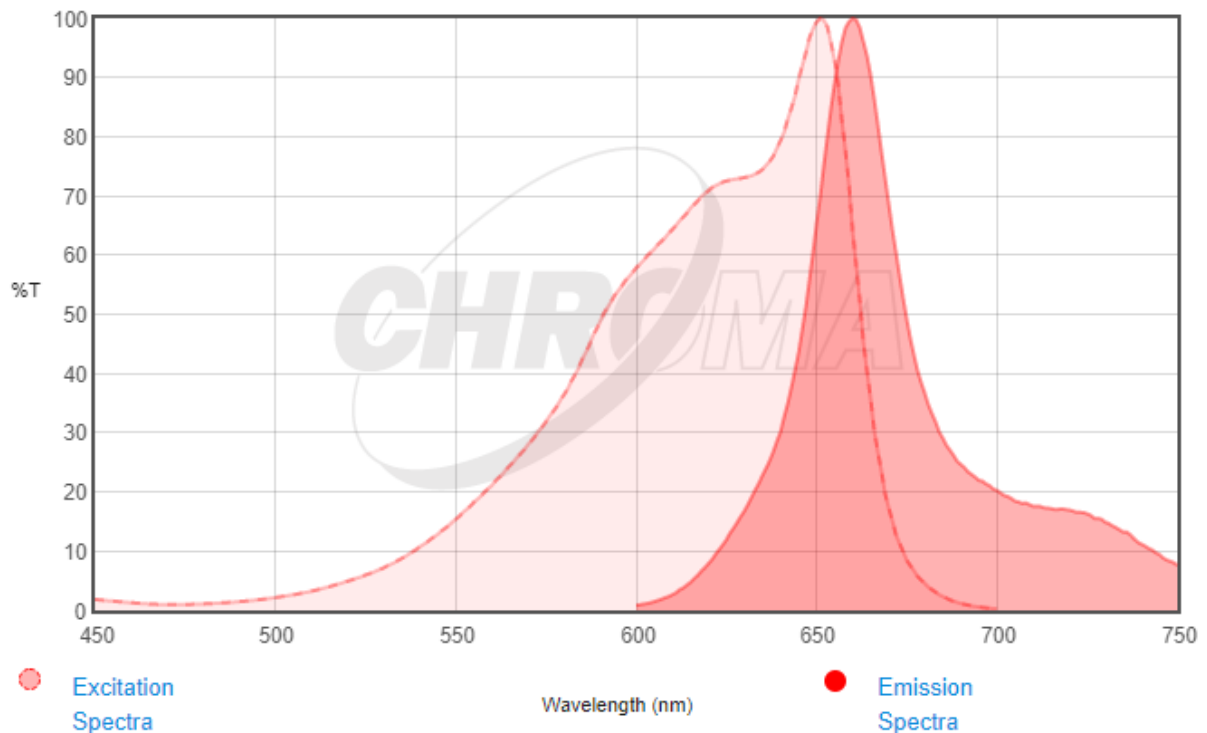
3.3. Plūsmas citometrija

Plūsmas citometrija tika veikta gaišo šūnu nieru karcinomas šūnām RCC-MF, kam raksturīga CA IX ekspresija, un nieru proksimālo kanāliņu epitēlija šūnām RC-124. No katras šūnu līnijas tika sagatavoti trīs paraugi – CA IX (ar anti-CA9-APC), izotipu kontroles (ar anti-IgG2-APC) un negatīvās kontroles paraugi.

Veicot plūsmas citometriju ar RCC-MF un RC-124 šūnu līniju CA IX paraugiem, uz RCC-MF šūnu membrānām novēroja fluorescenci pie 650-700 nm (sarkana krāsa), kas liecināja par CA IX ekspresiju, taču RC-124 šūnām fluorescence pie šāda viļņa garuma netika novērota, skatīt 3.3.1. attēlu. APC (allofikocianīna) fluorohroma ierosināšanas mediāna ir ~650 nm, bet emisijas maksimums – 660 nm, APC ierosināšanas un emisijas spektru var aplūkot 3.3.2. attēlā (70).

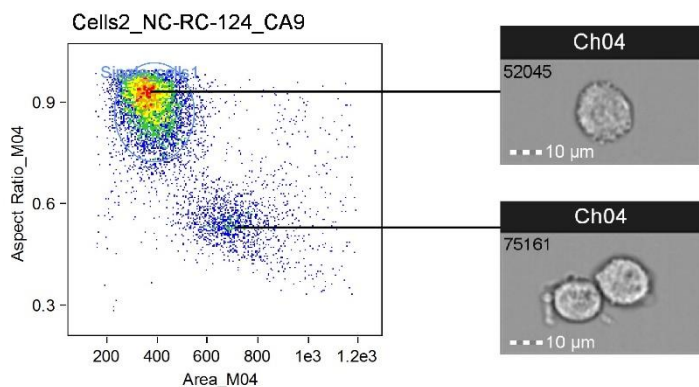


3.3.1. att. CA IX ekspresija uz šūnu membrānās RCC-MF un RC-124 šūnām (A) – RCC-MF CA IX parauga šūna Brightfield lāzera kanālā; (B) – ar 642 nm lāzeri ierosināta fluorescence RCC-MF CA IX parauga šūnā; (C) – RC-124 CA IX parauga šūna Brightfield lāzera kanālā; (D) – ar 642 nm lāzeri ierosināta fluorescence RC-124 CA IX šūnā



3.3.2. att. APC fluorohroma ierosināšanas un emisijas spektri (70)

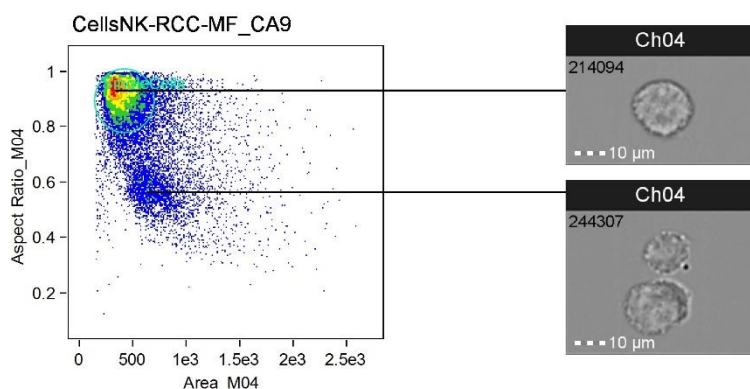
Lai sekmīgi veiktu datu analīzi, bija nepieciešams atlasīt individuālu šūnu populāciju (veikt *Gating*). Tas ļāva analizēt atsevišķas konkrēta izmēra šūnas, analizē neiekļaujot šūnu dupletus un parauga sagatavošanas laikā bojātās šūnas, kā arī to atsevišķas daļiņas. *Gating* tika veikts abu šūnu līniju negatīvās kontroles paraugiem, atlasot šūnas noteiktā reģionā un izveidojot veidnes, kas tika izmantotas, lai atlasītu šūnu populācijas izotipu kontroles un CA IX paraugos, nodrošinot vienotu principu šūnu atlasei. *Gating* veikšanas principus un atlasītās šūnu populācijas var aplūkot 3.3.3. un 3.3.4. attēlā.



Area_M04

Population	Count	%Gated	Mean	Median	Std. Dev.	CV	Mode
RC-124_NC_All_Cells	8110	100	442.17, 0.8294	391.75, 0.8857	167.22, 0.1485	37.82, 17.9	350.88, 0.9325
RC-124_NC_SingleCells	5955	73.4	374.95, 0.8987	371.5, 0.9074	61.33, 0.05582	16.36, 6.212	344.76, 0.934

3.3.3. att. Šūnu populācijas atlase negatīvās kontroles paraugam RC-124 šūnām Attēlā iespējams aplūkot arī vienu atlasītās šūnu populācijas pārstāvi ar Nr. 52045 un analizē neiekļautās šūnu populācijas pārstāvi ar Nr. 75161, kā arī šūnu statistiskos rādītājus. Šajā gadījumā datu analizē iekļautā šūnu populācija saturēja 73,4% no visām negatīvās kontroles parauga šūnām, un atlasītās populācijas vienas šūnas vidējais laukums bija 374,95 μm^2 .

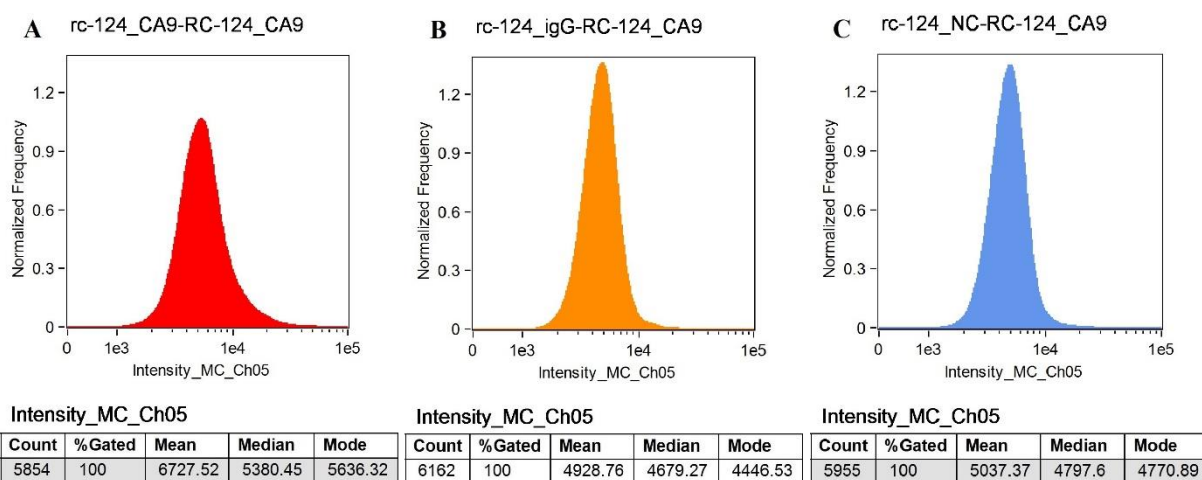


Area_M04

Population	Count	%Gated	Mean	Median	Std. Dev.	CV	Mode
RCC-MF_All_NK_Cells	15017	100	539.14, 0.8221	462.5, 0.8835	275.69, 0.154	51.13, 18.73	334.31, 0.9465
RCC-MF_NK_SingleCells	9417	62.7	406.35, 0.9129	392.5, 0.921	105.8, 0.04882	26.04, 5.348	331.45, 0.944

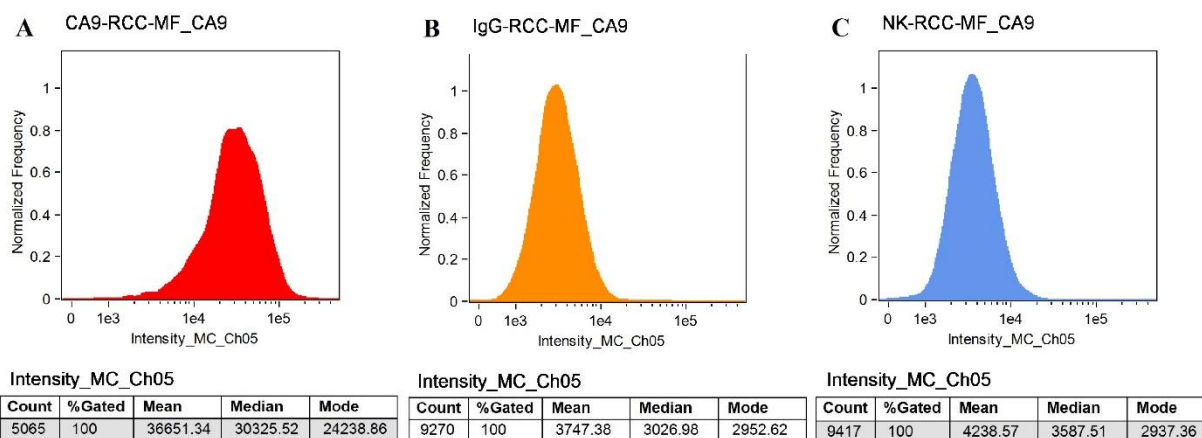
3.3.4. att. Šūnu populācijas atlase negatīvās kontroles paraugam RCC-MF šūnām Attēlā iespējams aplūkot arī vienu atlasītās populācijas pārstāvi ar Nr. 214094 un analizē neiekļautās šūnu populācijas pārstāvi ar Nr. 244307, kā arī šūnu statistiskos rādītājus. Šajā gadījumā datu analizē iekļautā šūnu populācija saturēja 62,7% no visām negatīvās kontroles parauga šūnām, un atlasītās populācijas vienas šūnas vidējais laukums bija 406,35 μm^2 .

Šūnu fluorescences intensitātes un biežuma noteikšanai katram paraugam, atbilstoši iegūtajiem datiem, tika izveidotas histogrammas. RC-124 šūnu līnijai gan CA IX, gan izotipu, gan negatīvās kontroles paraugos šūnām emisija novērojama robežās no 10^3 līdz 10^4 (3.3.5. attēls). CA IX paraugam emisijas intensitātes moda bija 5636,32, bet mediāna – 5380,45. Izotipu kontroles paraugam emisijas intensitātes moda bija 4446,53, bet mediāna – 4679,27. Negatīvās kontroles parauga statistiskie dati bija ļoti līdzīgi izotipu kontroles paraugam, emisijas modu uzrādot intensitātē 4770,89, bet mediānu – 4797,6.



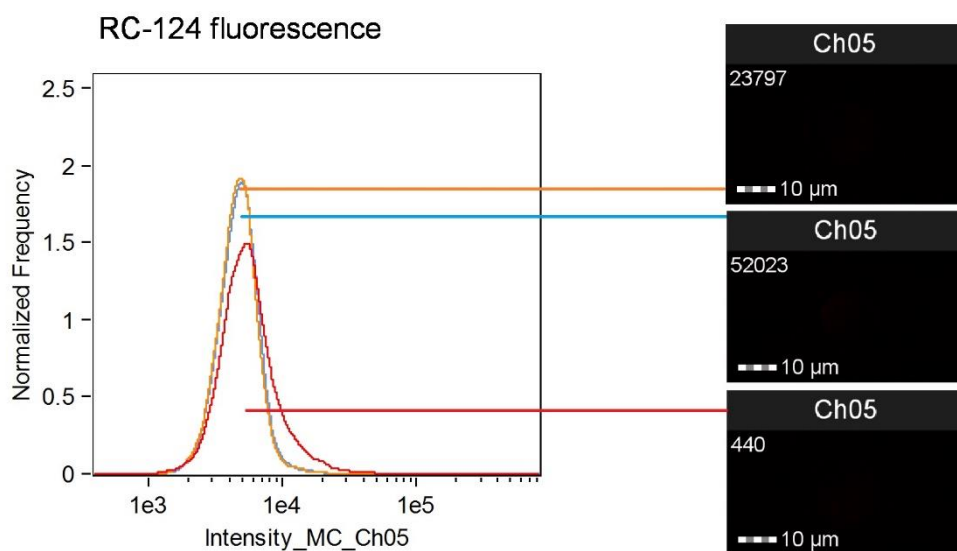
3.3.5. att. RC-124 šūnu līnijas paraugu fluorescences intensitāte (A) – CA IX paraugs; (B) – izotipu kontroles paraugs; (C) – negatīvās kontroles paraugs.

RCC-MF šūnu līnijas paraugu histogrammās varēja novērot, ka izotipu un negatīvās kontroles paraugos šūnu gaismas emisijas maksimums joprojām bija robežās no 10^3 līdz 10^4 , taču CA IX parauga histogrammā emisijas intensitātes līkne savu maksimumu sasniedza robežās no 10^4 līdz 10^5 (3.3.6. attēls). CA IX paraugam emisijas intensitātes moda bija 24238,86, bet mediāna – 30325,52, kas būtiski atšķīrās no izotipu kontroles un negatīvās kontroles paraugiem. Izotipu kontroles parauga emisijas moda ir 2952,62, mediāna – 3026,98. Savukārt negatīvās kontroles parauga emisijas moda bija 2937,36, bet mediāna – 3587,51.



3.3.6. att. RCC-MF šūnu līnijas paraugu fluorescences intensitāte (A) – CA IX paraugs; (B) – izotipu kontroles paraugs; (C) – negatīvās kontroles paraugs.

Rezultātu uzskatāmākai analīzei histogrammas šūnu līnijas ietvaros tika savstarpēji pārklātas, skatīt 3.3.7. un 3.3.8. attēlu. Kā var novērot, tad RC-124 šūnu līnijas paraugu emisijas maksimumi atrodas ļoti tuvu viens otram, izotipu kontroles un negatīvās kontroles līknēm pilnībā pārklājoties, kas ir saistīts ar statistisko rādītāju līdzību. CA IX parauga histogramma nedaudz atšķiras no iepriekšējiem paraugiem, taču atšķirība ir maza, intensitātes maksimumam saskaņot ar izotipu un negatīvās kontroles paraugiem (robežās no 10^3 līdz 10^4) un statistiskajiem rādītājiem būtiski neatšķiroties.

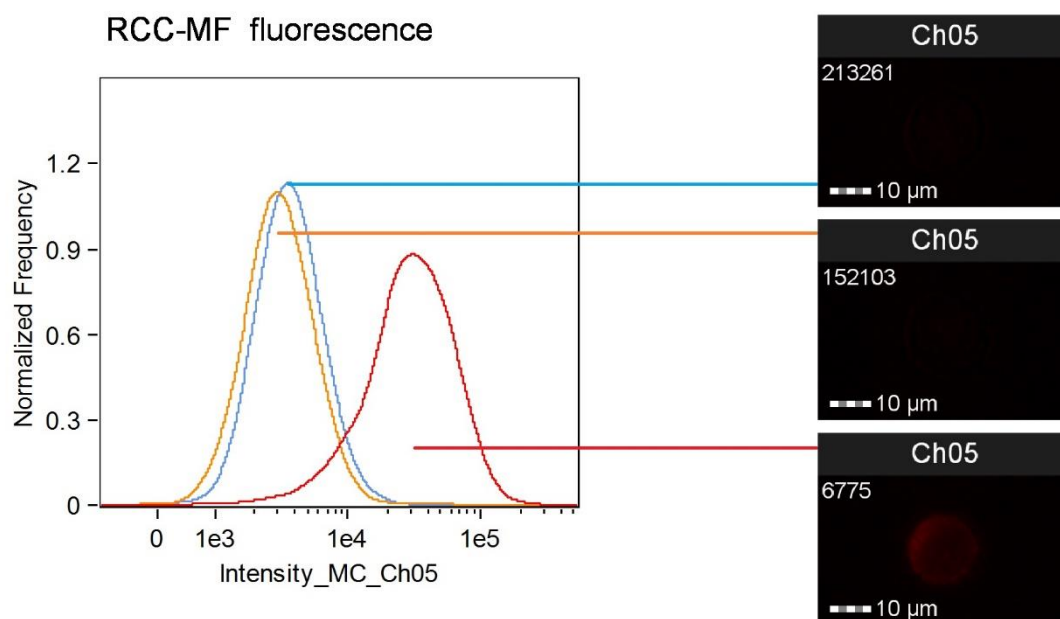


Intensity_MC_Ch05

Population	Count	%Gated	Mean	Median	Std. Dev.	CV	Mode
rc-124_CA9	5854	100	6727.52	5380.45	11363.06	168.9	5636.32
rc-124_igG	6162	100	4928.76	4679.27	2233.92	45.32	4446.53
RC-124_NC_SingleCells	5955	100	5037.37	4797.6	1918.91	38.09	4770.89

3.3.7. att. RC-124 šūnu līnijas fluorescences intensitātes histogrammu pārklājums **sarkans** – CA IX paraugs, **oranžs** – izotipu kontroles paraugs, **zils** – negatīvās kontroles paraugs; Attēlā iespējams aplūkot histogrammu statistiskos rādītājus un katra parauga histogrammas mediānas apvidū fiksēto šūnu attēlus, kas iegūti, tās ierosinot ar 642 nm lāzeri.

Savukārt, aplūkojot RCC-MF šūnu līnijas paraugus, var novērot, ka izotipu un negatīvās kontroles paraugos emisija notiek vienādās robežās (no 10^3 līdz 10^4), kā arī to histogrammu statistiskie rādītāji ir līdzīgi, histogrammu pārklājumā emisijas līknēm esot ļoti tuvu. Taču CA IX parauga fluorescences intensitātes līkne ir nobīdījusies pa labi, intensitātes maksimumu uzrādot robežās no 10^4 līdz 10^5 .



Intensity_MC_Ch05

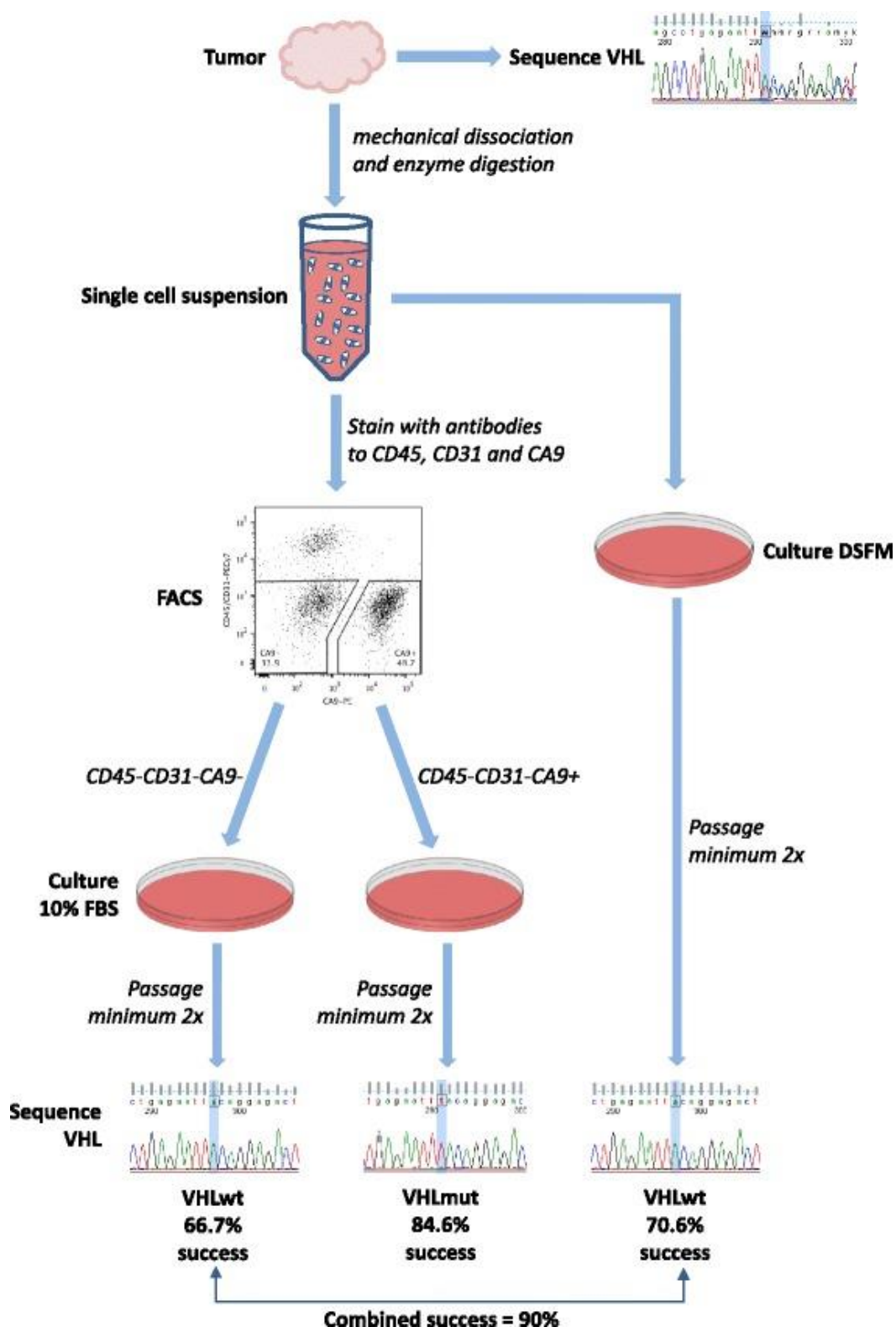
Population	Count	%Gated	Mean	Median	Std. Dev.	CV	Mode
RCC-MF_CA9	5065	100	36651.34	30325.52	26227.48	71.56	24238.86
RCC-MF_IgG	9270	100	3747.38	3026.98	5128.61	136.86	2952.62
RCC-MF_NK	9417	100	4238.57	3587.51	3059.33	72.18	2937.36

3.3.8. att. RCC-MF šūnu līnijas fluorescences intensitātes histogrammu pārklājums **sarkans** – CA IX paraugs, **oranžs** – izotipu kontroles paraugs, **zils** – negatīvās kontroles paraugs; Attēlā iespējams aplūkot histogrammu statistiskos rādītājus un katra parauga histogrammas mediānas apvidū fiksēto šūnu attēlus, kas iegūti, tās ierosinot ar 642 nm lāzeri.

Iegūtie rezultāti norāda, ka gaišo šūnu nieru karcinomas šūnu līnija (RCC-MF) no nieru proksimālo kanāliņu šūnu līnijas (RC-124) atšķiras ar ogļskābes anhidrāzes IX ekspresiju šūnu membrānās. Tādēļ CA IX ekspresija varētu tikt uzskatīta par raksturlielumu, ar ko noteikt ccRCC, turklāt efektīva metode šī mērķa sasniegšanai varētu būt plūsmas citometrija. Taču pašlaik komerciāli pieejamās ccRCC šūnu līnijas nespēj pilnībā atspoguļot audzēja individuālo ģenētisko heterogenitāti (71). Lai gan lielākajai daļai ccRCC gadījumu ir mutēts VHL gēns, kas atbildīgs par CA IX ekspresijas palielināšanu, audzēja attīstība var būt saistīta ar mutācijām citos gēnos, piemēram, izmaiņām PBRM1 vai BAP1 gēnos, kas neizmaina CA IX ekspresiju.

Paaugstināts ogļskābes anhidrāzes IX līmenis ccRCC pacientu asins plazmā tiek saistīts ar vēlāku audzēja attīstības stadiju, kā arī palielinātu VEGF ekspresiju, kas kopumā veicina audzēja šūnu invazivitāti un metastāžu veidošanos (56). Lai veiktu savstarpēju CA IX ekspresijas salīdzinājumu, izmantojot izstrādāto un validēto plūsmas citometrijas CA IX ekspresijas analīzi, tika analizētas no pacienta izolētas gaišo šūnu nieru karcinomas un no blakusesošajiem veselajiem audiem iegūtās primārās šūnas. ccRCC primāro šūnu izdalīšana un kultivēšana tika veikta pēc *Lobo et al.* pētījumā izstrādātā un validētā protokola, kas paredzēts

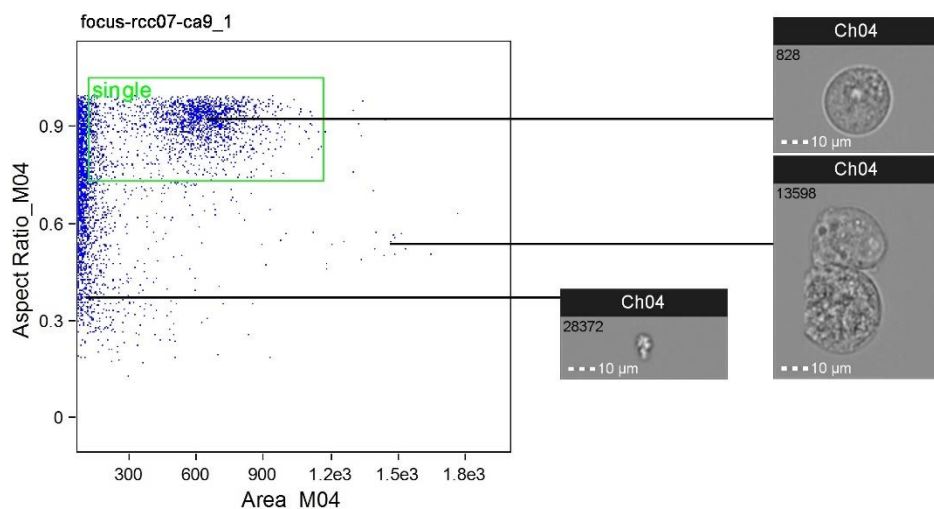
no pacientiem izdalīto primāro šūnu veiksmīgai kultivēšanai un to tālākai izmantošanai pētījumos un personalizētas terapijas izstrādei, skatīt 3.3.9. attēlu (71).



3.3.9. att. No pacientiem izdalīto primāro šūnu kultivēšanas protokola shēma (71)

Kad no pacienta izolētas ccRCC primārās šūnas tika veiksmīgi apstrādātas un kultivētas, ar tām tika veikta plūsmas citometrija. No primārajām ccRCC šūnām tika pagatavoti 3 paraugi – CA IX (anti-CA9-APC), izotipu kontroles (anti-IgG2-APC) un negatīvās kontroles paraugs.

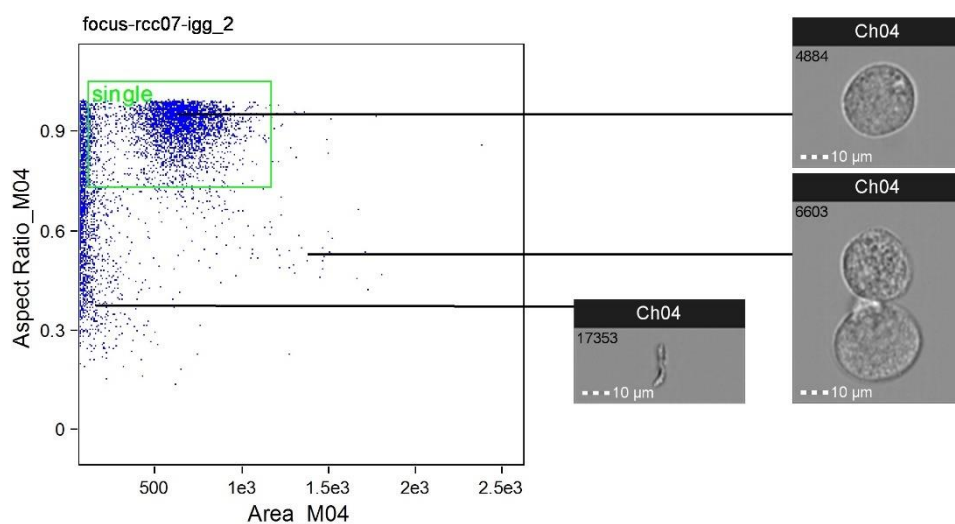
Sekmīgai CA IX ekspresijas datu interpretācijai visos sagatavotajos paraugos tika atlasītas atsevišķās šūnu populācijas, analizē neiekļaujot paraugu sagatavošanas laikā traumētās šūnas un to dupletus. *Gating* veikšanas principu primāro ccRCC šūnu CA IX, izotipu kontroles paraugam un negatīvās kontroles paraugam var aplūkot 3.3.10., 3.3.11. un 3.3.12. attēlā.



Area_M04

Population	Count	%Gated	Mean	Median	Std. Dev.	CV	Mode
focus	37487	100	56.45, 0.8273	16.5, 0.8895	134.51, 0.1605	238.28, 19.4	20.09, 0.9015
single & focus	1908	5.09	548.59, 0.9056	585.38, 0.9189	218.57, 0.06215	39.84, 6.863	575.23, 0.947

3.3.10. att. Šūnu populācijas atlase CA IX paraugam primārajās ccRCC šūnās Attēlā iespējams aplūkot vienu atlasītās šūnu populācijas pārstāvi ar Nr. 828, analizē neiekļauto šūnu populāciju pārstāvi ar Nr. 13598 un pārstāvi ar Nr. 28372, kā arī šūnu statistiskos rādītājus. Šajā gadījumā datu analizē iekļautā šūnu populācija saturēja 5,09% no visām CA IX parauga šūnām, un atlasītās populācijas vienas šūnas vidējais laukums bija 548,59 μm^2 (K. Krims-Dāvis nepubl. dati).

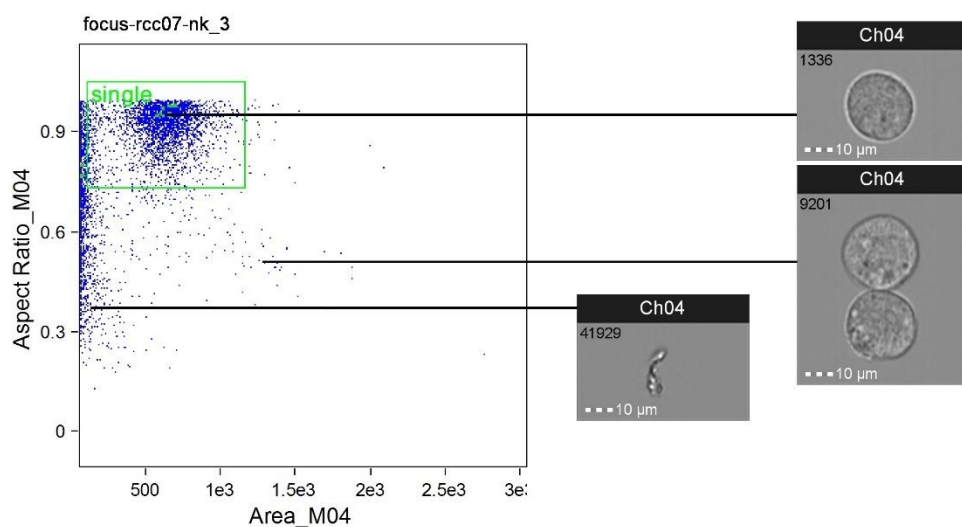


Area_M04

Population	Count	%Gated	Mean	Median	Std. Dev.	CV	Mode
focus	32999	100	87.79, 0.8314	16.5, 0.8934	194.86, 0.1608	221.96, 19.34	27.22, 0.9025
single & focus	3108	9.42	613.79, 0.9139	631, 0.9281	193.56, 0.05845	31.54, 6.395	586.66, 0.948

3.3.11. att. Šūnu populācijas atlase izotipu kontroles paraugam primārajās ccRCC šūnās Attēlā iespējams aplūkot vienu atlasītās šūnu populācijas pārstāvi ar Nr. 4884, analizē neiekļauto šūnu populāciju pārstāvi ar Nr. 6603 un pārstāvi ar Nr. 17353, kā arī šūnu statistiskos rādītājus. Šajā gadījumā

datu analīzē iekļautā šūnu populācija saturēja 9,42% no visām izotipu kontroles parauga šūnām, un atlasītās populācijas vienas šūnas vidējais laukums bija 613,79 μm^2 (K. Krims-Dāvis nepubl. dati).

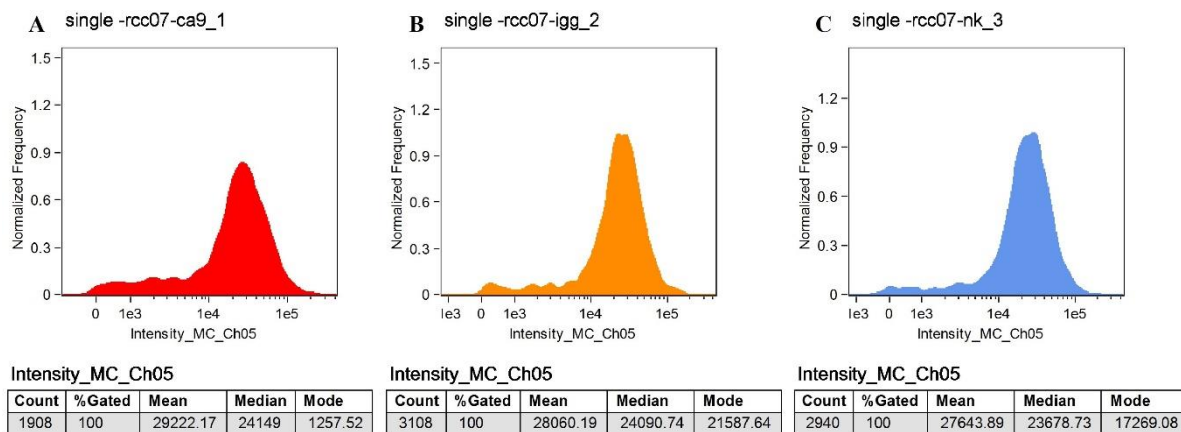


Area_M04

Population	Count	%Gated	Mean	Median	Std. Dev.	CV	Mode
focus	21526	100	115.94, 0.8342	17, 0.8959	228.28, 0.1604	196.89, 19.23	28.52, 0.9025
single & focus	2940	13.7	612.17, 0.9197	623, 0.9367	185.1, 0.05898	30.24, 6.413	614.63, 0.958

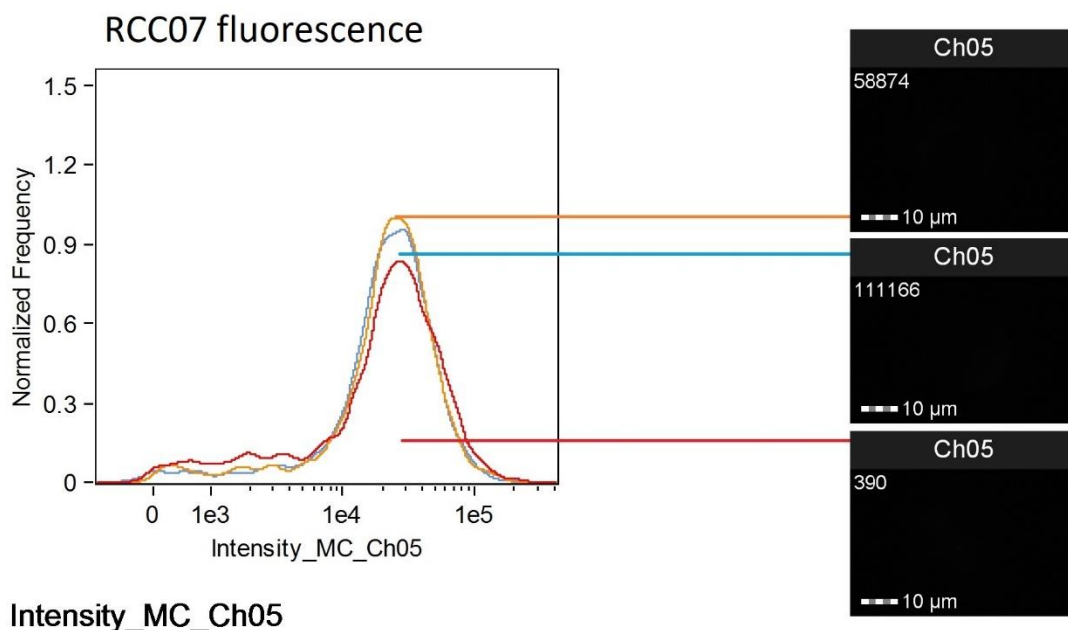
3.3.12. att. Šūnu populācijas atlase negatīvās kontroles paraugam primārajās ccRCC šūnās Attēlā iespējams aplūkot vienu atlasītās šūnu populācijas pārstāvi ar Nr. 1336, analīzē neiekļauto šūnu populāciju pārstāvi ar Nr. 9201 un pārstāvi ar Nr. 41929, kā arī šūnu statistiskos rādītājus. Šajā gadījumā datu analīzē iekļautā šūnu populācija saturēja 13,7% no visām negatīvās kontroles parauga šūnām, un atlasītās populācijas vienas šūnas vidējais laukums bija 612,17 μm^2 (K. Krims-Dāvis nepubl. dati).

Atbilstoši iegūtajiem datiem, katram primāro ccRCC šūnu paraugam tika izveidotas histogrammas šūnu fluorescences intensitātes un biežuma noteikšanai (3.3.13. attēls). Gan CA IX, gan izotipu kontroles, gan negatīvās kontroles paraugiem emisijas maksimumi tika sasniegti intensitātes robežās no 10^4 līdz 10^5 . CA IX paraugā emisijas moda bija 1257,52, mediāna – 24149, izotipu kontroles parauga moda bija 21587,64 un mediāna – 24090,74, kamēr negatīvās kontroles paraugam moda bija 17269,08, mediānai – 23678,73.



3.3.13. att. ccRCC primāro šūnu paraugu fluorescences intensitāte (A) – CA IX paraugs; (B) – izotipu kontroles paraugs; (C) – negatīvās kontroles paraugs.

Rezultātu uzskatāmākai analīzei paraugu histogrammas tika savstarpēji pārklātas, skatīt 3.3.14. attēlu. Kā var novērot, tad līdzīgo statistisko rādītāju dēļ ccRCC primāro šūnu paraugu emisijas līknes savstarpēji pārklājas, emisijas maksimumam esot robežās no 10^4 līdz 10^5 .



Intensity_MC_Ch05

Population	Count	%Gated	Mean	Median	Std. Dev.	CV	Mode
CA9-single cells	1908	100	29222.17	24149	25267.04	86.47	1257.52
IgG2-single cells	3108	100	28060.19	24090.74	20626.33	73.51	21587.64
NK-single cells	2940	100	27643.89	23678.73	20103.81	72.72	17269.08

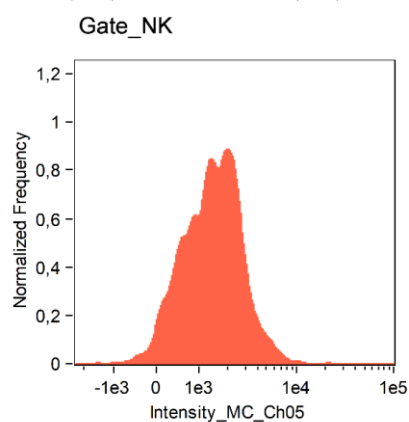
3.3.14. att. No pacienta izdalīto primāro ccRCC šūnu fluorescences intensitātes histogrammu pārklājums **sarkans** – CA IX paraugs, **oranžs** – izotipu kontroles paraugs, **zils** – negatīvās kontroles paraugs. Attēlā iespējams aplūkot histogrammu statistiskos rādītājus un katra parauga histogrammas mediānas apvidū fiksēto šūnu attēlus, kas iegūti, tās ierosinot ar 642 nm lāzeri (K. Krims-Dāvis nepubl. dati).

Šie dati norāda uz atšķirībām starp ccRCC komerciāli pieejamajām šūnu līnijām un primārajām ccRCC pacientu šūnām. Konkrētajā gadījumā nav novērota CA IX parauga emisijas intensitātes līknes nobīde, kas norāda uz CA IX iztrūkumu audzēja audos. Rezultātā var secināt, ka CA IX ir raksturīgs gaišo šūnu nieru karcinomas marķieris laboratorijā izmantojamām šūnu kultūrām, taču klīniskos gadījumos CA IX nevajadzētu izmantot kā individuālu marķieri, un aplūkot to kombinācijā ar citiem ccRCC raksturīgajiem parametriem. Karcinomu šūnu līnijas nespēj pilnībā atspoguļot visus cilvēka audzēja šūnu molekulāros mehānismus, pēdējo gadu pētījumi liecina, ka komerciāli pieejamā šūnu līniju klīniskās un genoma iezīmes vairāk atbilst un reprezentē agresīvākās karcinomu formas un pēdējo stadiju audzējus (72).

Primāro šūnu gaišo šūnu nieru karcinomas paraugā nenovērotā CA IX ekspresija liecina par atšķirībām starp ilgstoši audzētām šūnu līnijām, kas kultivēšanas laikā zaudējušas

heterogenitāti, un no pacienta iegūtiem primārajiem paraugiem, kas precīzāk reprezentē audzējos novērojamo heterogenitāti. Šīs atšķirības rodas no gēnu dažādā transkripcijas līmeņa audzējā un šūnu līnijā. Ir pierādīts, ka komerciāli pieejamajās šūnu līnijās gēni, kas atbildīgi par šūnu cikla progresiju, proteīnu apstrādi un metabolisma procesiem, tiek pastiprināti transkribēti, turpretī samazināta transkripcija novērojama gēnos, kas atbildīgi par šūnu adhēzijas spēju un membrānas signālproteīnu darbību. Šo molekulāro mehānismu izmaiņas nodrošina šūnu līniju relatīvo nemainību un stabilitāti kultivēšanas procesā (73). Nozīmīga loma šūnu līniju īpašību izmaiņām ir to pārsēšanas reižu skaitam (pasāzām). Pētījumos ir atklāts, ka atkārtota šūnu pārsēšana veicina ģenētisko mutāciju rašanos, izmainot šūnu proliferācijas spēju, šūnu caurlaidību, transportproteīnu darbību, transepitēlija rezistenci un vielmaiņas procesus, šiem riskiem pieaugot līdz ar lielāku pasāžas numuru (74).

Lai noteiktu optimālo antivielas koncentrāciju, pie kuras šūnās būs izveidojies antivielas-proteīna komplekss, kas uzrādīs vislielāko fluorescenci, tika veikta titrēšana. Titrēšanā izmantoja RC-124 un RCC-MF šūnu līnijas un antivielu anti-CA9-APC kopējos atšķaidījumos 1:60, 1:120, 1:240, 1:480, 1:960 un paraugus bez papildus pievienotas antivielas. Iepriekš veicot vienas šūnas populācijas atlasī, sākumā RC-124 negatīvās kontroles paraugam tika izveidota šūnu fluorescences intensitātes un biežuma histogramma, lai noteiktu nieru proksimālo kanāliņu šūnu autofluorescenci (3.3.15. att.). Tālāk tika izveidots histogrammu pārklājums paraugiem ar atšķirīgajām antivielas koncentrācijām (3.3.16. att.). Negatīvās kontroles paraugam emisija tika novērota intensitātes robežās no 0 līdz 10^4 , emisijas moda bija 1277,26, bet mediāna – 1429,63. Histogrammu pārklājumā var novērot, ka, neatkarīgi no pievienotās antivielas atšķaidījuma, RC-124 šūnu fluorescence nemainās, emisijas līknēm pārklājoties intensitātes robežās no 0 līdz 10^4 . 1:60 antivielas atšķaidījumā emisijas moda bija 1603,02, 1:120 – 1537,69, 1:240 – 1282,76, 1:480 – 1319,98, bet 1:960 – 1074,43.

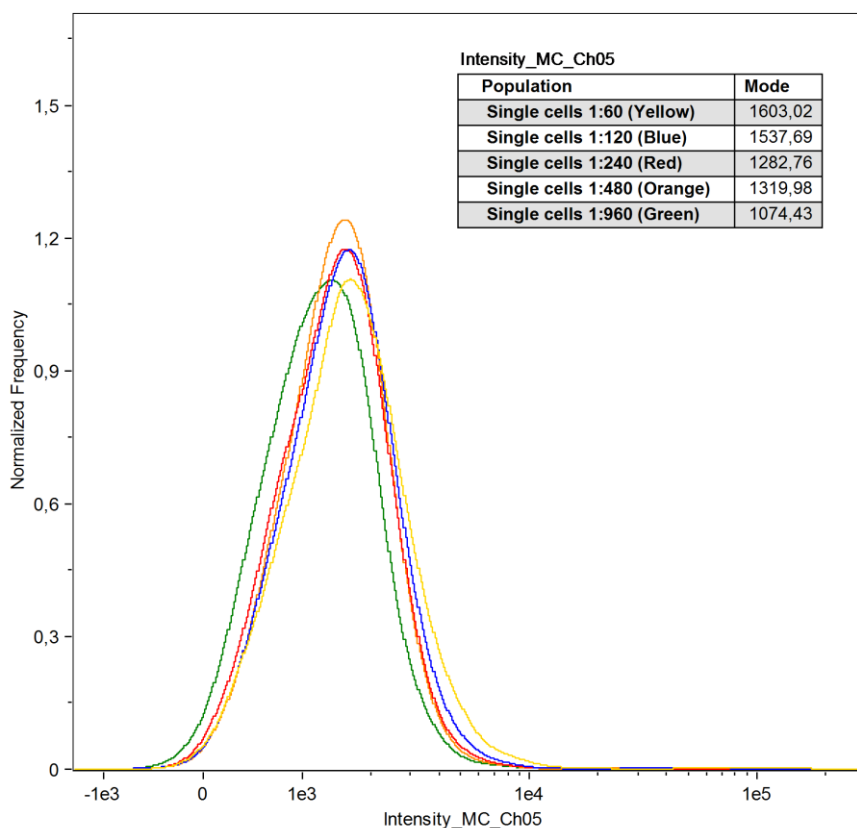


Intensity_MC_Ch05

Population	Count	%Gated	Mean	Median	Std. Dev.	Mode
Gate_NK & Focus	2021	100	1660,84	1429,63	1320,72	1277,26

3.3.15. att. RC-124 negatīvās kontroles parauga fluorescences intensitāte (K. Krims-Dāvis nepubl. dati)

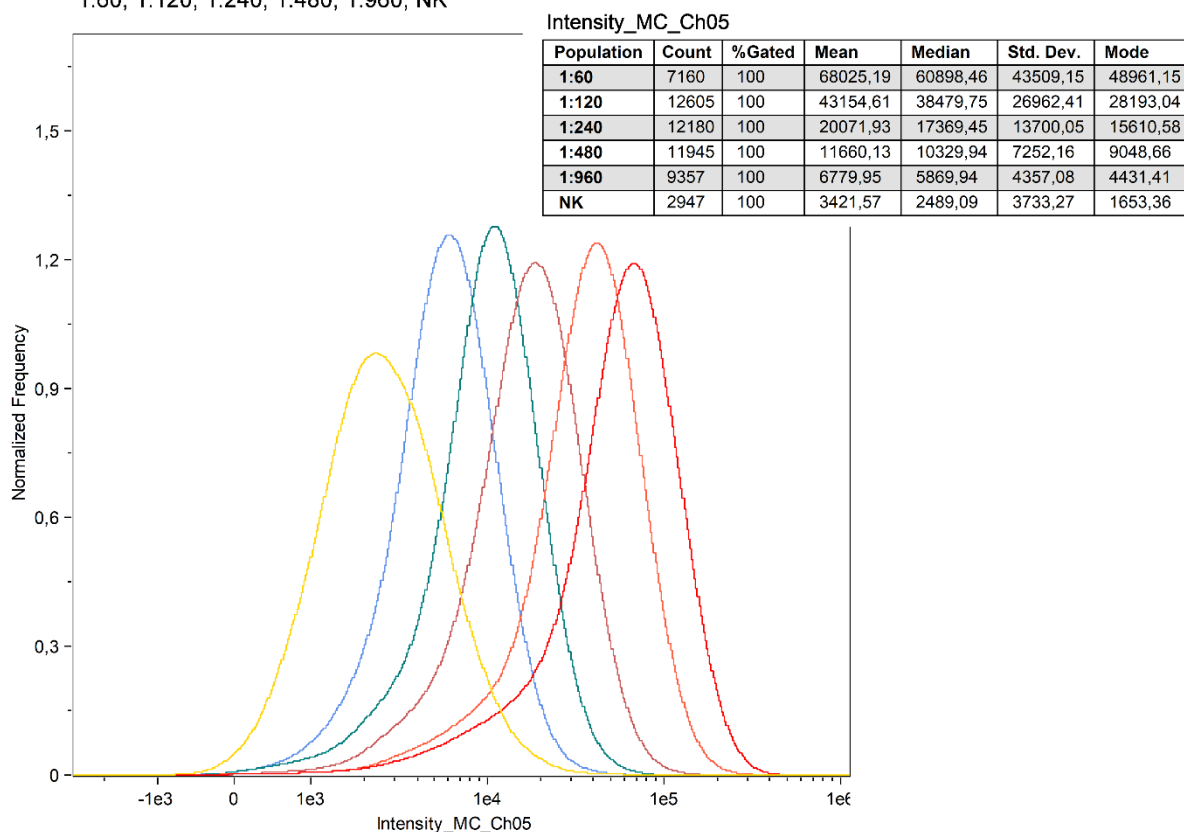
Single cells 1:60 (Yellow), Single cells 1:120 (Blue), Single cells 1:240 (Red), Single cells 1:480 (Orange), Single cells 1:960 (Green)



3.3.16. att. **RC-124 šūnu fluorescences intensitātes histogrammu pārklājums atkarībā no pievienotās antivielas koncentrācijas dzeltens** – atšķaidījums 1:60, **zils** – atšķaidījums 1:120, **sarkans** – atšķaidījums 1:240, **oranžs** – atšķaidījums 1:480, **zaļš** – atšķaidījums 1:960 (K. Krims-Dāvis nepubl. dati)

RCC-MF negatīvās kontroles paraugā un dažādo antivielu atšķaidījumu paraugos atlasot individuālo šūnu populāciju, tika izveidots fluorescences intensitātes histogrammu pārklājums. 3.3.17. attēlā uzskatāmi var novērot emisijas līkņu nobīdi uz kreiso pusi, palielinot antivielas atšķaidījuma pakāpi paraugā. Negatīvās kontroles parauga emisijas maksimums bija robežās no 0 līdz 10^4 , moda – 1653,36, taču paraugā ar vislielāko antivielas koncentrāciju (1:60) emisija bija robežās no 10^4 līdz $\sim 10^5$. Samazinot antivielas koncentrāciju, arī emisijas intensitātes maksimumi samazinājās, norādot uz nepietiekamu antivielas koncentrāciju, neļaujot noteikt kopējo CA IX ekspresijas līmeni.

1:60, 1:120, 1:240, 1:480, 1:960, NK



3.3.17. att. RCC-MF šūnu fluorescences intensitātes histogrammu pārklājums atkarībā no pievienotās antivielas koncentrācijas dzeltens – negatīvās kontroles paraugs, zils – atšķaidījums 1:960, zilganzaļš – atšķaidījums 1:480, violets – atšķaidījums 1:240, oranžs – atšķaidījums 1:120, sarkans – atšķaidījums 1:60 (K. Krims-Dāvis nepubl. dati)

Iegūtie rezultāti norāda, ka, palielinot antivielas koncentrāciju, nenotiek saistīšanās izmaiņas pie CA IX negatīvām šūnām (RC-124), taču pie CA IX pozitīvām šūnām (RCC-MF) lielāka pievienotās antivielas koncentrācija uzrāda lielākas saistīšanās spējas. Tas, savukārt, noved pie secinājuma, ka šo izmaiņu iemesls nav antivielas nespecifiskā saistīšanās, to iemesls ir atšķirīgais antivielas gala atšķaidījums paraugā.

Optimālās antivielas gala koncentrācijas noteikšana ir nepieciešama, lai efektīvāk izmantotu pētījumam pieejamos līdzekļus, lieki nelietojot reaģentus. Izmantojot titrēšanu, var noteikt zemāko antivielas koncentrāciju, pie kuras pētāmo proteīnu iezīmēšana notiek visefektīvāk, kā arī noteikt, vai antiViela tiek lietota pietiekamā koncentrācijā, lai iegūtu ticamus un reprezentatīvus datus.

SECINĀJUMI

1. Pētījuma laikā tika apgūta aseptiska darba tehnika – veiksmīgi tika kultivētas RC-124, RCC-MF un primārās no pacienta audzēja izolētās šūnas, kas vēlāk tika izmantotas plūsmas citometrijā CA IX ekspresijas noteikšanai;
2. Veicot plūsmas citometriju, tika noskaidrots, ka gaišo šūnu nieru karcinomas šūnu līnija (RCC-MF) no nieru proksimālo kanāliņu šūnu līnijas (RC-124) atšķiras ar ogļskābes anhidrāzes IX ekspresiju šūnu membrānās, kas kombinācijā ar apstiprinošiem literatūras datiem norādīja uz iespējamo CA IX izmantošanu kā ccRCC reprezentatīvu lielumu;
3. Veicot plūsmas citometriju primārajām ccRCC šūnām, netika novērota izmainīta CA IX ekspresija, kas liecināja, ka CA IX ir raksturīgs gaišo šūnu nieru karcinomas marķieris laboratorijā izmantojamām šūnu kultūrām, taču klīniskos gadījumos CA IX nevajadzētu izmantot kā individuālu marķieri, un aplūkot to kombinācijā ar citiem ccRCC raksturīgajiem parametriem;
4. Analizējot pētījumā iegūtos datus, tika apstiprināta pētījuma sākumā izvirzītā hipotēze, ka CA IX ekspresijas profils ilgstoši kultivētām gaišo šūnu nieru karcinomas šūnu līnijām ir atšķirīgs no primārajām gaišo šūnu nieru karcinomas šūnām, kas izdalītas no pacienta audzēja;
5. Pētījumā veiksmīgi tika kultivētas no pacienta izdalītas primārās ccRCC šūnas, kas norāda uz primāro šūnu iespējamību pētījumos tikt izmantotām komerciāli pieejamo šūnu līniju vietā, kas, savukārt, ļautu izpētīt katra pacienta audzēja individuālo ģenētisko profilu un izstrādāt tam atbilstošu terapiju.

PATEICĪBA

Vēlos pateikties savam bakalaura darba vadītājam Kārlim Pleiko par iepazīstināšanu ar darbu laboratorijā, noderīgu padomu un palīdzības sniegšanu bakalaura darba tapšanas laikā, kā arī par sava brīvā laika atbrīvošanu ieteikumu un labojumu veikšanai.

Liels paldies Kristapam Krimam-Dāvim par palīdzību laboratorijas metožu apgūšanā un par atļauju savu npublicēto datu izmantošanai šī darba ietvaros.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Nabi S, Kessler ER, Bernard B, Flaig TW, Lam ET. Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *Fl000Research*. 2018;7:307.
2. Sánchez-Gastaldo A, Kempf E, González Del Alba A, Duran I. Systemic treatment of renal cell cancer: A comprehensive review. *Cancer Treatment Reviews*. 2017;60:77-89.
3. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, *et al*. Renal cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3:17009.
4. Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer Biomarkers*. 2011;9(1-6):461-473.
5. King TC. Elsevier's Integrated Pathology, 1st Edition. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. 382p.
6. Weidner N, Cote R, Suster S, Weiss L. Modern Surgical Pathology, 2nd Edition, Volume 2. Philadelphia: Saunders, 2009. 2432p.
7. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nature Reviews Urology*. 2010;7(5):245-257.
8. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *European Urology*. 2015;67(3):519-530.
9. Protzel C, Maruschke M, Hakenberg OW. Epidemiology, Aetiology, and Pathogenesis of Renal Cell Carcinoma. *European Urology Supplements*. 2012;11:52-59.
10. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *International Journal of Cancer*. 2005;114(1):101-108.
11. Ridge CA, Pua BB, Madoff DC. Epidemiology and staging of renal cell carcinoma. *Seminars in Interventional Radiology*. 2014;31(1):3-8.
12. Clague J, Shao L, Lin J, *et al*. Sensitivity to NNKOAc is associated with renal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009;30(4):706-710.
13. Zhu Y, Horikawa Y, Yang H, Wood CG, Habuchi T, Wu X. BPDE induced lymphocytic chromosome 3p deletions may predict renal cell carcinoma risk. *The Journal of Urology*. 2008;179(6):2416-2421.
14. Mandel JS, McLaughlin JK, Schlehofer B, *et al*. International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *International Journal of Cancer*. 1995;61(5):601-605.

15. Karami S, Boffetta P, Rothman N, *et al.* Renal cell carcinoma, occupational pesticide exposure and modification by glutathione S-transferase polymorphisms. *Carcinogenesis*. 2008;29(8):1567–1571.
16. Wang G, Hou J, Ma L, *et al.* Risk factor for clear cell renal cell carcinoma in Chinese population: a case-control study. *Cancer Epidemiology*. 2012;36(2):177-182.
17. Kabat GC, Silvera SA, Miller AB, Rohan TE. A cohort study of reproductive and hormonal factors and renal cell cancer risk in women. *British Journal of Cancer*. 2007;96(5):845–849.
18. Lee JE, Hankinson SE, Cho E. Reproductive factors and risk of renal cell cancer: the Nurses' Health Study. *American Journal of Epidemiology*. 2009;169(10):1243–1250.
19. Setiawan VW, Stram DO, Nomura AM, Kolonel LN, Henderson BE. Risk factors for renal cell cancer: the multiethnic cohort. *American Journal of Epidemiology*. 2007;166(8):932-940.
20. Lee JE, Hunter DJ, Spiegelman D, *et al.* Alcohol intake and renal cell cancer in a pooled analysis of 12 prospective studies. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(10):801-810.
21. Mucci LA, Adami HO. The plight of the potato: is dietary acrylamide a risk factor for human cancer? *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(9):618-621.
22. Brugarolas J. Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(18):1968-1976.
23. Mehdi A, Riazalhosseini Y. Epigenome Aberrations: Emerging Driving Factors of the Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(8):1774.
24. Clark PE. The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney International*. 2009;76(9):939-945.
25. Varshney N, Kebede AA, Owusu-Dapaah H, Lather J, Kaushik M, Bhullar JS. A Review of Von Hippel-Lindau Syndrome. *Journal of Kidney Cancer and VHL*. 2017;4(3):20-29.
26. Linehan WM, Rubin JS, Bottaro DP. VHL loss of function and its impact on oncogenic signaling networks in clear cell renal cell carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;41(4):753-756.
27. Rosner I, Bratslavsky G, Pinto PA, Linehan WM. The clinical implications of the genetics of renal cell carcinoma. *Urologic Oncology*. 2009;27(2):131-136.
28. Robinson CM, Lefebvre F, Poon BP, *et al.* Consequences of VHL Loss on Global DNA Methylation. *Scientific Reports*. 2018;8.

29. Haas NB, Nathanson KL. Hereditary kidney cancer syndromes. *Advances in Chronic Kidney Disease*. 2014;21(1):81-90.
30. Razafinjatovo C, Bihr S, Mischo A, *et al*. Characterization of VHL missense mutations in sporadic clear cell renal cell carcinoma: hotspots, affected binding domains, functional impact on pVHL and therapeutic relevance. *BMC Cancer*. 2016;16:638.
31. Yao X, Tan J, Lim KJ, *et al*. VHL Deficiency Drives Enhancer Activation of Oncogenes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Discovery*. 2017;7(11):1284-1305.
32. Brugarolas J. PBRM1 and BAP1 as novel targets for renal cell carcinoma. *Cancer journal*. 2013;19(4):324-332.
33. Nargund AM, Pham CG, Dong Y, *et al*. The SWI/SNF Protein PBRM1 Restrains VHL-Loss-Driven Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports*. 2017;18(12):2893-2906.
34. Ge YZ, Xu LW, Zhou CC, *et al*. A BAP1 Mutation-specific MicroRNA Signature Predicts Clinical Outcomes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients with Wild-type BAP1. *Journal of Cancer*. 2017;8(13):2643-2652.
35. Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, *et al*. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nature Genetics*. 2012;44(7):751-759.
36. Kanu N, Grönroos E, Martinez P, *et al*. SETD2 loss-of-function promotes renal cancer branched evolution through replication stress and impaired DNA repair. *Oncogene*. 2015;34(46):5699-5708.
37. Liu L, Guo R, Zhang X, *et al*. Loss of SETD2, but not H3K36me3, correlates with aggressive clinicopathological features of clear cell renal cell carcinoma patients. *BioScience Trends*. 2017;11(2):214-220.
38. Tannir NM. Renal Cell Carcinoma, 1st Edition. New York: Oxford University Press, 2014. 210p.
39. Battelli C, Cho DC. mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy*. 2011;8(4):359-367.
40. Karassek S, Berghaus C, Schwarten M, *et al*. Ras homolog enriched in brain (Rheb) enhances apoptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(44):33979-33991.
41. Gallardo E, Méndez-Vidal MJ, Pérez-Gracia JL, *et al*. SEOM clinical guideline for treatment of kidney cancer (2017). *Clinical and Translational Oncology*. 2017;20(1):47-56.
42. Mastoraki A, Mastoraki S, Tsikala-Vafea M, *et al*. Prognostic Benefit of Surgical Management of Renal Cell Carcinoma Invading the Inferior Vena Cava. *Indian Journal of Surgical Oncology*. 2016;8(1):14-18.

43. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, *et al.* Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *European Urology*. 2015;67(1):85-97.
44. Guevremont C, Jeldres C, Perrotte P, Karakiewicz PI. Sorafenib in the management of metastatic renal cell carcinoma. *Current Oncology*. 2009;16(1):27-32.
45. Hutson TE, Escudier B, Esteban E, *et al.* Randomized phase III trial of temsirolimus versus sorafenib as second-line therapy after sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;32(8):760–767.
46. Vecchio SJD, Ellis RJ. Cabozantinib for the Management of Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Journal of Kidney Cancer and VHL*. 2018;5(4):1-5.
47. Leonetti A, Leonardi F, Bersanelli M, Buti S. Clinical use of lenvatinib in combination with everolimus for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2017;13:799-806.
48. Buti S, Leonetti A, Dallatomasina A, Bersanelli M. Everolimus in the management of metastatic renal cell carcinoma: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evidence*. 2016;11:23-36.
49. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, *et al.* Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. 2015;373(19):1803–1813.
50. Zarrabi K, Fang C, Wu S. New treatment options for metastatic renal cell carcinoma with prior anti-angiogenesis therapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2017;10(1):38.
51. Escudier B, Bellmunt J, Négrier S, *et al.* Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(13):2144-2150.
52. Cho YH, Kim MS, Chung HS, Hwang EC. Novel immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *Investigative and Clinical Urology*. 2017;58(4):220-227.
53. Atkins MB, Tannir NM. Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*. 2018;70:127-137.
54. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, *et al.* Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. 2018;378(14):1277–1290.
55. Mboge MY, Mahon BP, McKenna R, Frost SC. Carbonic Anhydrases: Role in pH Control and Cancer. *Metabolites*. 2018;8(1):19.

56. Lucarini L, Magnelli L, Schiavone N, *et al.* Plasmatic carbonic anhydrase IX as a diagnostic marker for clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2018;33(1):234-240.
57. Singh S, Lomelino CL, Mboge MY, Frost SC, McKenna R. Cancer Drug Development of Carbonic Anhydrase Inhibitors beyond the Active Site. *Molecules*. 2018;23(5):1045.
58. Tostain J, Li G, Gentil-Perret A, Gigante M. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment. *European Journal of Cancer*. 2010;46(18):3141-3148.
59. Giménez-Bachs JM, Salinas-Sánchez AS, Serrano-Oviedo L, Nam-Cha SH, Rubio-Del Campo A, Sánchez-Prieto R. Carbonic anhydrase IX as a specific biomarker for clear cell renal cell carcinoma: comparative study of Western blot and immunohistochemistry and implications for diagnosis. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. 2012;46(5):358-364.
60. Benej M, Pastorekova S, Pastorek J. Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. *Subcellular Biochemistry*. 2014;75:199-219.
61. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007;26(2):299–310.
62. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, *et al.* Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Research*. 2000;60(24):7075-7083.
63. Andreucci E, Peppicelli S, Carta F, *et al.* Carbonic anhydrase IX inhibition affects viability of cancer cells adapted to extracellular acidosis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2017;95(12):1341-1353.
64. Boyd NH, Walker K, Fried J, *et al.* Addition of carbonic anhydrase 9 inhibitor SLC-0111 to temozolomide treatment delays glioblastoma growth in vivo. *JCI Insight*. 2017;2(24):e92928.
65. Carta F, Vullo D, Osman SM, AlOthman Z, Supuran CT. Synthesis and carbonic anhydrase inhibition of a series of SLC-0111 analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2017;25(9):2569-2576.
66. Zandvliet AS, Gneist M, Huitema AD, King AA, Wanders J. A phase I and pharmacokinetic study of indisulam in combination with carboplatin. *British Journal Of Cancer* 2007;96(4): 559-566.
67. Chamie K, Donin NM, Klöpfer P, *et al.* Adjuvant Weekly Girentuximab Following Nephrectomy for High-Risk Renal Cell Carcinoma: The ARISER Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*. 2016;3(7):913-920.

68. Brouwers AH, van Eerd JE, Frieling C, *et al.* Optimization of radioimmunotherapy of renal cell carcinoma: labeling of monoclonal antibody cG250 with ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, or ¹⁸⁶Re. *Journal of Nuclear Medicine*. 2004;45(2):327-337.
69. Petrucci HM, Schatz CA, Kopitz CC, *et al.* Therapeutic Mechanism and Efficacy of the Antibody–Drug Conjugate BAY 79-4620 Targeting Human Carbonic Anhydrase 9. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012;11(2):340-349.
70. 2018 Chroma Technology Corporation. Spectra Viewer – Allophycocyanin (APC) [Online]: <<https://www.chroma.com/spectra-viewer?fluorochromes=10378>> [cit. 2019.10.05.].
71. Lobo NC, Gedye C, Apostoli AJ, *et al.* Efficient generation of patient-matched malignant and normal primary cell cultures from clear cell renal cell carcinoma patients: clinically relevant models for research and personalized medicine. *BMC Cancer*. 2016;16:485.
72. Sinha R, Winer AG, Chevinsky M, *et al.* Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection. *Nature Communications*. 2017;8:15165.
73. Ertel A, Verghese A, Byers SW, Ochs M, Tozeren A. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Molecular Cancer*. 2006;5(1):55.
74. Pastor DM, Poritz LS, Olson TL, *et al.* Primary cell lines: false representation or model system? a comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2010;3(1):69–83.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs "Ogļskābes anhidrāzes IX ekspresija gaišo šūnu nieru karcinomas šūnās"
izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

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

Autore: Agnese Rudzīte _____
(vārds, uzvārds) (paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai
Vadītājs: Pētnieks Kārlis Pleiko, MSc. Chem. _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Recenzents: _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas „Farmācija” Bakalaura gala
pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2019., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: docente Kristīne Saleniece, dr.pharm. _____.

(paraksts)