

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE  
FARMĀCIJAS MAĢISTRA STUDIJU PROGRAMMA

**AUDZĒJA EKSTRACELULĀRO VEZIKULU LOMA  
MEZENHIMĀLO CILMES ŠŪNU SEKRĒCIJAS  
PROFILA IZMAIŅĀS**

MAĢISTRA DARBS

Autore: **Baiba Paegle**

Studentu apliecības Nr.: bp09040

Darba vadītāja: asoc. prof. Dr. Biol. Una Riekstiņa

RĪGA 2017

## ANOTĀCIJA

Ekstarcelulārās vezikulas ir mazi pūslīši, kas tiek atbrīvoti no šūnām un izlaisti starpšūnu vidē. EV satur saimniekšūnu ģenētisko materiālu vai to daļas un caur tām viena šūna var nodot informācijas signālu otrai šūnai, tādā veidā ietekmējot to darbību.

Arī vēža šūnas var atbrīvot šādas vezikulas un iedarboties uz blakusesošajām gan saimniekorganisma šūnām, gan pašām vēža šūnām. Caur šādu komunikāciju vēža šūnas var pārnest savu izmainīto ģenētisko materiālu uz normālajām šūnām un pārregulēt to darbības mehānismus, kas darbotos audzēja šūnu labā.

Darba mērķis bija noskaidrot vai audzēja EV var izraisīt IL-8 un VEGF sekrēcijas izmaiņas ādas mezenhimālajās cilmes šūnās. Lai to noskaidrotu, IL-8 un VEGF sekrēcijas mērīšanai izmantoja *Sandwich* ELISA metodi. Pētījuma rezultāti rāda, ka IL-8 un VEGF sekrēcija MCš pastiprinājās audzēja EV ietekmes rezultātā.

**Atslēgas vārdi:** VEGF, IL-8, mezenhimālās cilmes šūnas, ekstracelulārās vezikulas, audzējs

## SUMMARY

Extracellular vesicles are small vesicles that are released from cells into intracellular space. EVs contain host genetic material or parts of it. Using EVs cells can communicate with each other and affect their actions.

Tumor cells also can release EVs and influence surrounding host cells or tumor cells. Through this communication tumor cells can transfer their genetic material to normal cells and change their mechanisms of action to favour the tumor.

The aim of the study was to elucidate if tumor EVs can change skin mesenchymal stem cells secretion of IL-8 and VEGF. We used Sandwich ELISA to measure IL-8 and VEGF secretion. The results of the research showed that tumor EVs can stimulate IL-8 and VEGF secretion in MSCs.

**Key words:** VEGF, IL-8, mesenchymal stem cells, extracellular vesicles, tumor

## SATURS

APZĪMEJUMI.....	6
IEVADS .....	9
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	11
1.1. Ekstracelulārās vezikulas .....	11
1.1.1. Raksturojums .....	11
1.1.2. Saturs .....	12
1.1.3. EV pielietojuma iespējas .....	12
1.2. EV loma starpšūnu komunikācijā .....	13
1.3. Audzēja mikrovide.....	15
1.3.1.Šūnu veidi audzēja mikrovidē .....	16
1.4. Hipoksija audzējā.....	25
1.5. Starpšūnu matrikss .....	27
1.6. Mikrovides šūnas kā terapeitiskie mērķi .....	28
1.6.1. Angioģenēze kā pretaudzēju terapijas mērķis .....	28
1.6.2. Pretiekaisuma terapija.....	31
1.6.3. CAF kā terapijas mērķis .....	33
2. MATERIĀLI UN METODEDES .....	34
2.1. Izmantotie materiāli un iekārtas.....	34
2.2. IL-8 un VEGF ELISA tests .....	34
2.2.1. Šķīdumu pagatavošana .....	34
2.2.2. Reaģentu pagatavošana.....	35
2.2.3. Darba gaita.....	35
2.3. Datu apstrāde .....	37
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	38
SECINĀJUMI .....	51
PATEICĪBAS .....	52
IZMANTOTĀ LITERATŪRA .....	53



## APZĪMEJUMI

AMP – adenozīna monofosfāts  
APAF1 – apoptotiskais proteāzes aktivēšanas faktors 1  
bFGF – pamata fibroblastu augšanas faktors  
BSA – liellopu seruma albumīns  
BSP – kaulu sialoproteīns  
CAA – vēža asociētie adipocīti  
CAF – vēža asociētie fibroblasti  
CD8 – *cluster of differentiation 8*  
CD73 – *cluster of differentiation 73*  
CML – pastāvīga mielogēna leukēmija  
COL4A3 – kalogēna IV alfa 3 ķēde  
COX-2 – ciklooksigenāze - 2  
CSC-EV – audzēja cilmes šūnu ekstracelulārās vezikulas  
CTL – citotokiskie T limfocīti  
CXCL2 – hemokīnu ligands 2  
CXCL8 – hemokīnu ligands 8  
CXCL12 – hemokīnu ligands 12  
CXCR4 – hemokīnu receptoru tips 4  
CXCR7 – hemokīnu receptoru tips 7  
DNA – dezoksiribonukleīnskābe  
EGF – epidermālais augšanas faktors  
EMC – starpšūnu matrikss  
EV – ekstracelulārās vezikulas  
FAP – fibroblastu aktivējošais proteīns  
FDA – Pārtikas un zāļu administrācija (*Food and drug administration*)  
FGF – fibroblastu augšanas faktors  
GAG – glikozaminoglikāns  
GI – gastrointestināls/ kuņģa – zarnu trakts  
HGF – hepatocītu augšanas faktors  
HIF – hipoksiju inducējošais faktors  
HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss  
HSP70 – karstumšoka proteīns 70  
ICAM-7 – intracelulāro šūnu adhēzijas molekula 7

IGF-1 – insulīnam līdzīgais augšanas faktors 1  
IKK $\beta$  – nukleārā faktora kappā – B kināzes inhibitors  
IL-1 – interleikīns 1  
IL-2 – interleikīns 2  
IL-6 – interleikīns 6  
IL-8 – interleikīns 8  
IL-12 – interleikīns 12  
MCP-1 – monocītu kemoatraktantu proteīns 1  
MCš – mezenhimālās cilmes šūnas  
lncRNS – *large non – coding* RNS  
mRNS – *messenger* RNS  
miRNS – mikroRNS  
MMP - metaloproteāze  
MSDC – mieloīdās izcelsmes supresoršūnas  
ncRNS – *non – coding* RNS  
NEP – neitrālā endopeptidāze  
NF- $\kappa$ B – nukleārais faktors kappā B  
NGF – nervu augšanas faktors  
NK – naturālie killeri  
NPL – nesteroidie pretiekaisuma līdzekļi  
OC - osteokalcīns  
OPN – osteopontīns  
PBS – fosfātu sāļu buferšķīdums  
PDGF – trombocītu augšanas faktors  
piRNS – *piwi – interacting* RNS  
PIGF – placentas augšanas faktors  
pO<sub>2</sub> – skābekļa parciālais spiediens  
RANKL – nukleārā faktora kappā B liganda receptoru aktivators  
RNS – ribonukleīnskābe  
rRNS – ribosomālā RNS  
SDF-1 – stromālo šūnu faktors 1  
snoRNS – *small nucleolar* RNS  
STAT3 – *signal transducer and activator of transcription 3*  
TAA – audzēja asociētie antigēni  
TAM – audzēja asociētie makrofāgi

TEC – audzēja endoteliālās šūnas  
tEV – audzēja ekstracelulārās vezikulas  
TGF- $\alpha$  – transformējošais augšanas faktors alfa  
TGF- $\beta$  – transformējošais augšanas faktors beta  
TKI – tirozīnkināzes inhibitors  
TNF- $\alpha$  – audzēja nekrozes faktors alfa  
TLR2 – *toll – like* receptors  
tRNS – transporta RNS  
VEGF – vaskulārais endoteliālais augšanas faktors  
VEGFR – vaskulārā endoteliālā augšanas faktora receptors  
Y RNS – *small non – coding* RNS

## IEVADS

Ekstracelulārās vezikulas ir ar membrānu aptverti pūslīši, kas izdalās no jebkura šūnu veida neatkarīgi no to fizioloģiskā un patoloģiskā stāvokļa (Nedawik *et al.*, 2016). Tās piedalās starpšūnu komunikācijā un palīdz šūnām izdzīvot un augt (Wendler *et al.*, 2017). Audzēja sekretētās EV ir svarīgi mediatori komunikācijā starp audzēja šūnām un stromas šūnām gan lokālajā, gan attālākajā mikrovidē. Tātad, tās spēlē lielu lomu gan primāro, gan metastātisko audzēju attīstībā (Becker *et al.*, 2016). Piemēram, eksosomas, mikrovezikulas un lielās onkosomas ir iesaistītas procesā, lai pārnestu recīprokalos signālus starp audzēja šūnām un stromas šūnām, piemēram, fibroblastiem, endoteliālajām šūnām un imūnsistēmas šūnām (Wendler *et al.*, 2017). Šo procesu veic EV pārnestie patogēnie komponenti, piemēram, proteīni, dažādi RNS, DNS, lipīdi un transkripcijas faktori, kas medītē parakrīno signalizēšanu audzēja mikrovidē (Fujita *et al.*, 2016). Rezultātā šīs šūnas adaptējas vai tiek rekrutētas uz nepārtraukti attīstošos vēža mikrovidi (Wendler *et al.*, 2017).

Caur EV tiek vadīti dažādas patofizioloģisko procesu sistēmas – koagulācija, asinsvadu caurlaidība, recipienta šūnu pārprogrammēšana u.c., lai palīdzētu veidoties pre-metastātiskajai videi un metastāzēm (Becker *et al.*, 2016). Kā arī tās veido rezistenci pret pretvēža zāļu vielām (Wendler *et al.*, 2017).

EV medītētā starpšūnu komunikācija ir iesaistīta audzēja attīstībā un progresēšanā. Tiek veicināta imunitātes apspiešana, angioģenēze un veidota vide metastāzēm. Tāpēc EV mehānismi tiek apsvērti kā iespējamie mērķi pretvēža terapijā un diagnostikā (Vader *et al.*, 2014; Wendler *et al.*, 2017).

**Darba mērķis** bija noskaidrot, vai kolorektālā audzēja šūnu līniju normoksijas un hipoksijas apstākļos sekretētās ekstracelulārās vezikulas izraisa izmaiņas citokīnu sekrēcijā mezenhimālajās cilmes šūnās.

### **Darba uzdevumi:**

1. Iepazīties ar mezenhimālo cilmes šūnu (MCš) kultivēšanas metodi.
2. Noteikt vaskulāro endoteliālo augšanas faktora (VEGF) un interleikīna-8 (IL-8) sekrēcijas līmeni MCš.
3. Noteikt VEGF sekrēcijas izmaiņas pēc MCš inkubācijas ar kolorektālā audzēja šūnu SW480 un SW620 normoksijas un hipoksijas apstākļos izdalītajām ekstracelulārajām vezikulām.

4. Noteikt IL-8 sekrēcijas izmaiņas pēc MCš inkubācijas ar kolorektālā audzēja šūnu SW480 un SW620 normoksijas un hipoksijas apstākļos izdalītajām audzēja ekstracelulārajām vezikulām.

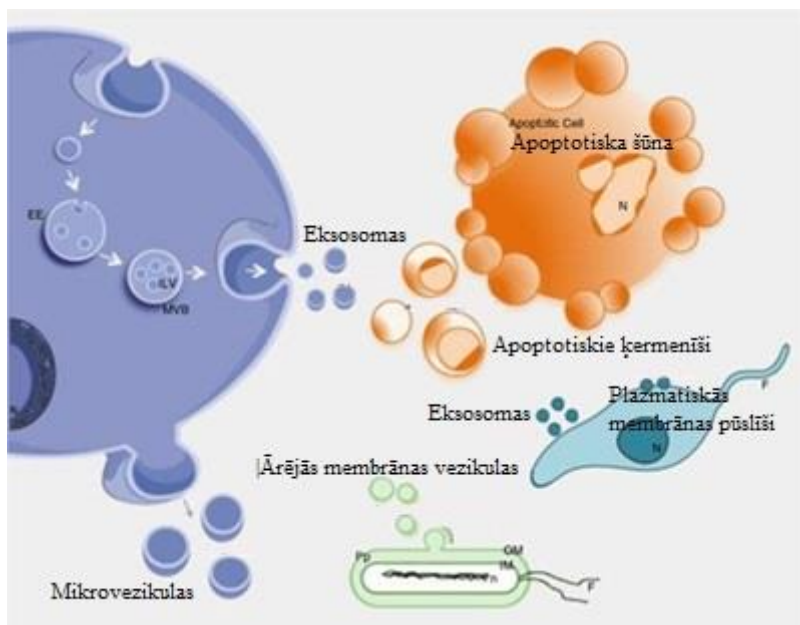
# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Ekstracelulārās vezikulas

### 1.1.1. Raksturojums

Ekstracelulārās vezikulas ir lipīdu dubultslānī ietvertas vezikulas, kuras atbrīvojas no jebkura šūnu veida šūnas ekstracelulārajā vidē. Tās var atšķirties gan pēc molekulārā satura, membrānas uzbūves, biogēnēzes, gan arī pēc to specifiskajām funkcijām vai šūnu avota no kura tās nākušas (Yanez – Mo *et al.*, 2015, Sadovska *et al.*, 2015, Mercedes *et al.*, 2016).

Ekstracelulārās vezikulas iedalās trīs galvenajos tipos. Tās ir mikrovezikulas, eksosomas un apoptotiskie ķermeņi (Gyorgy *et al.*, 2011, El Andaloussi *et al.*, 2013, Yanez – Mo *et al.*, 2015, Sadovska *et al.*, 2015). Mikrovezikulas jeb eksosomas ir plazmatiskās membrānas apgabals, kas izvirzījies un atdalījies no šūnas (Gyorgy *et al.*, 2011, El Andaloussi *et al.*, 2013). Eksosomas pēc izmēra ir mazākas. Tās veidojas endosomālā ceļā, kad multivezikulāro ķermeņi membrāna ieliecas uz iekšu. Ārpusē eksosomas izkļūst, kad multivezikulārie ķermeņi saplūst ar plazmatisko membrānu (Yanez – Mo *et al.*, 2015). Apoptotiskie ķermeņi izdalās šūnas apoptozes laikā, kad šūna izjūk membrānā apņemtās vezikulās (Atkin – Smith *et al.*, 2015).



1.1.att. Ekstracelulāro vezikulu veidošanās (attēls ar izmaiņām no Yanez – Mo *et al.*, 2015)

Nesen ir atrasts arī iespējams ceturtais EV veids. Tās ir atipiski lielas EV, sauktas par “lielajām onkosomām”. Tās veidojas no ne-apoptotiskiem plazmas membrānas pūslīšiem no

ātri migrējošām (prostatas) vēža šūnām. Tās ieguvušas amēbveida fenotipu, kas saistīts ar agresīvu vai metastātisku audzēju. Šobrīd gan nav tieši skaidrs vai tās varētu būt jauns EV paveids vai arī kāds MV (mikrovezikulu) apakštips (Minciacchi *et al.*, 2015, Morello *et al.*, 2013).

EV izdalās cilvēka organismā dabiskā ceļā. Tās ir atrodamas asinīs, urīnā, augļūdenī, krūts pienā, spermā, siekalās, arī ļaundabīgo audzēju pleiras telpā izdalītajos šķidrums (Ambrose *et al.*, 2017).

### 1.1.2. Saturs

EV satur dažādus proteīnus, lipīdus un nukleīnskābes (Abels *et al.*, 2016). Piemēram, EV, kas izdalījušās no vēža šūnām, satur ar vēzi saistītas molekulas – mutētus, pārlietu ekspresētus onkoproteīnus, glikoproteīnus, tāpat arī dažādus specifiskus nekodējošus RNS (ncRNS – miRNS, tRNS, snoRNS, ar mitohondrijiem saistīto RNS, piRNS, vault RNS, Y – RNS, mRNS, IncRNS, rRNS), kas atšķiras no normālajās šūnās esošajiem, un DNS fragmentus (Sadovska *et al.*, 2015, Lopatina *et al.*, 2016, Valadi *et al.*, 2007). Diemžēl EV RNS saturs pietiekoši neatspoguļo RNS saturu šūnā, jo EV var selektīvi eksportēt kādu specifisku RNS, kamēr citi tiek izslēgti no transportēšanas (Nolte-t Hoen *et al.*, 2012).

Tā kā EV var pārnest gan RNS, gan DNS fragmentus, tad tādā veidā tas var modificēt gēnu ekspresiju recipienta šūnās (Lopatina *et al.*, 2016).

### 1.1.3. EV pielietojuma iespējas

Tiek veikti intensīvi pētījumi, lai izskaidrotu EV lomu starpšūnu komunikācijā un to patoloģiskos procesus, bet daudz mazāk ir apskatīti EV ierosinātie procesi homeostāzes uzturēšanā un fizioloģisko funkciju regulēšanā (Yanez – Mo *et al.*, 2015).

Ir ļoti svarīgi diagnosticēt vēzi pēc iespējas agrākā attīstības stadijā, lai samazinātu mirstību un uzlabotu dzīvildzi (Fujita *et al.*, 2016).

Audzēja EV cilvēka ķermeņa šķidrums varētu kalpot kā biopsijas materiāls audzēja diagnostikā. EV satur dažādus DNS un RNS fragmentus, kas var kalpot gan diagnostiskiem, gan terapeitiskiem nolūkiem (Sadovska *et al.*, 2015). Pielietojums tām var būt diezgan plašs – izmantot tās kā zāļu vielu piegādes ceļu un kā biomarķierus diagnosticēšanai (Borges *et al.*, 2013), kā arī EV var kalpot procesos, lai aizvāktu nevēlamu molekulāru materiālu no šūnām (Yanez – Mo *et al.*, 2015).

Vēža izcelsmes EV var darboties gan kā biomarķieri, gan terapeitiskie mērķi, jo, atšķirībā no pašām audzēja šūnām, tās var atrasties dažādos bioloģiskajos šķidrums, kā arī

tās prot aizsargāt savu molekulāro “kravu” no degradācijas (Sadovska *et al.*, 2015, Yanez – Mo *et al.*, 2015).

Arī “lielās onkosomas” uzrāda, ka tās nes sevī vēzi ierosinošas bioaktīvās molekulas, kas arī atrodamas to pacientu plazmā, kam ir metastātisks (prostatas) vēzis, ja salīdzina ar pacientiem ar lokālu vēzi. Šī iemesla dēļ, tās varētu būt sevišķi svarīgas kā prognostiskie biomarķieri (Morello *et al.*, 2013, Di Vizio *et al.*, 2012, Minciacchi *et al.*, 2015).

Piemēram, šķidrums biopsijās, izmantojot cirkulācijās esošās EV, var atklāt audzēja īpašības neizmantojot invazīvo biopsiju. Melo *et al.* pētījumā diagnosticēšanai izmantojuši cirkulējošo EV proteīnu glikānu – 1 (*glypican – 1*) (Melo *et al.*, 2015). Izmantojot masspektrometra analīzes, tika novērots, ka krūts vēža izcelsmes EV ir bagātas ar glikāna – 1 proteīnu.

Glikāna–1 pozitīvas EV uzrāda arī aizkuņģa dziedzera vēža gadījumā. Šie dati rāda, ka EV proteīni var kalpot kā potenciāla neinvazīvas diagnosticēšanas metode vēža noteikšanai (Fujita *et al.*, 2016).

## 1.2. EV loma starpšūnu komunikācijā

Evolūcijas gaitā gan prokariotu, gan eikariotu šūnas ir attīstījušas starpšūnu komunikācijas mehānismus. Eikariotu šūnas komunicē viena ar otru caur tiešo mijiedarbību vai sekretējot šķīstošus faktorus, piemēram, hormonus, augšanas faktorus un citokīnus. Šie faktori var iedarboties uz šūnu, kas tos sekretējusi (autokrīnā signalizēšana) vai iedarboties uz blakus esošajām šūnām (parakrīnā signalizēšana) un attālāk esošajām šūnām (endokrīnā signalizēšana). Viens no šūnu komunikāciju veidiem, lai sazinātos ar blakus esošajām šūnām, kā arī attālāk esošajām šūnām, ir ekstracelulāro vezikulu sekrēcija (Mercedes *et al.*, 2016, Yanez – Mo *et al.*, 2015).

Šis komunikācijas veids ir izpelnījies lielu interesi, jo EV ir iesaistītas neskaitāmos šūnu procesos. Tās piegādā bioaktīvās makromolekulas, tādā veidā veicot starpšūnu komunikāciju daudzšūnu organismā (Ambrose *et al.*, 2017.).

Visas EV pārnēsā virsmas molekulas, kas ļauj tām saistīties ar recipienta šūnām. Līdz ko tā ir piesaistījies mērķa šūnai, EV var uzsākt signālceļa aktivāciju caur receptora – liganda mijiedarbību vai arī tā var tikt internalizēta ar endocitozes un/ vai fagocitozes palīdzību, vai pat saplūst ar mērķa šūnas membrānu, lai piegādātu tās saturu šūnas citosolā, tādā veidā modificējot fizioloģisko stāvokli recipienta šūnā (Mercedes *et al.*, 2016).

Liela uzmanība tiek veltīta vēža šūnu izdalītajām EV un tam, kā tās iedarbojas uz citām šūnām. Komunikācija starp vēža šūnām un normālajām šūnām palīdz audzēja iniciējošajām šūnām izdzīvot, proliferēt, pārņemt normālās šūnas un veidot tālāk metastāzes. Šo

komunikāciju starp šūnām var nodrošināt ne tikai citokīni, hormoni un proteīni, bet arī transkripcijas faktori, ncRNS un DNS, ko nes EV (Lopatina *et al.*, 2016).

EV starpšūnu komunikācijā kalpo kā transportlīdzeklis. Vēža šūnu EV var sevī pārnest patogēnos komponentus, kur dažus uzskatīja, ka tos nevar pārnest uz citām šūnām, piemēram, proteīnus, mRNS (messengerRNA), miRNS (microRNA), DNS, lipīdus un transkripcijas faktorus, kas var mediēt parakrīno signalizācijas veidu audzēja mikrovidē. Šie komponenti ir ļoti mainīgi, funkcionāli, atkarīgi no šūnu izcelsmes un tie iedarbojas ar spēcīgu efektu uz recipienta šūnām, modulējot to darbību, kā piemēram endoteliālās šūnas, fibroblasti un imunitātes šūnas (skat. 1.2.1.att.) (Fujita *et al.*, 2016, Worzfeld *et al.*, 2017).

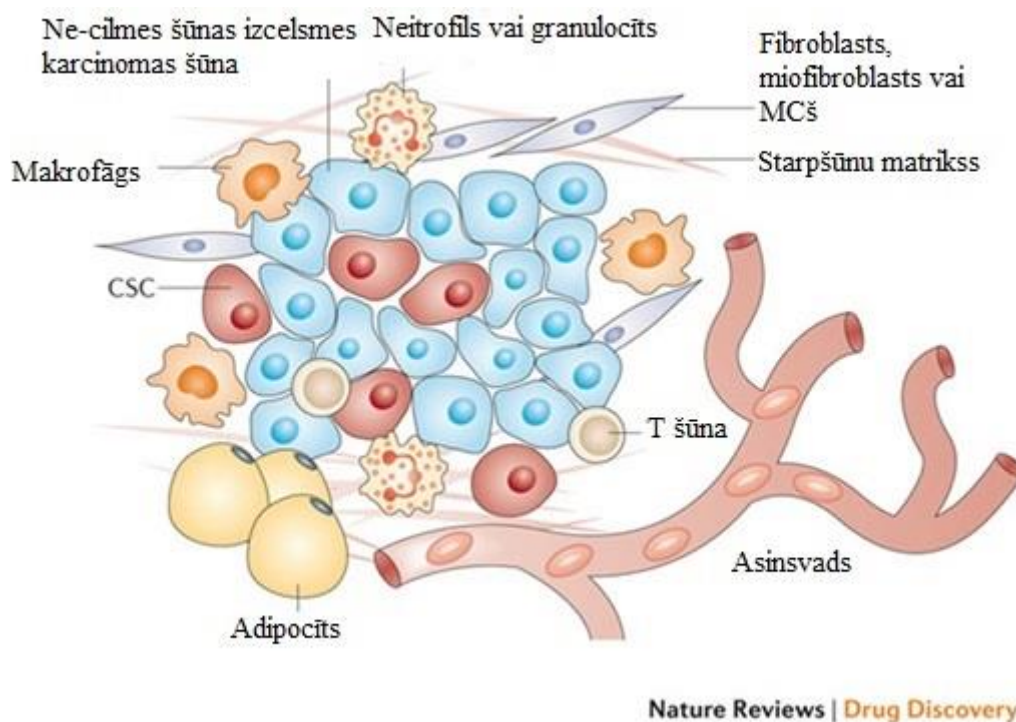


1.2.att. EV komponentu iedarbība uz imunitātes šūnām (attēls ar izmaiņām no Worzfeld *et al.*, 2017)

2007.gadā Valadi *et al.* noskaidroja, ka EV starp šūnām var transportēt dažādus RNS, mRNS un miRNS, bet 2010.gadā Fujita *et al.* ziņoja, ka EV miRNS tiek pārnestas uz recipienta šūnām un pārveidotas par funkcionālie proteīniem (Valadi *et al.*, 2007, Fujita *et al.*, 2016). Viens no miRNS izsauktajiem efektiem ir zāļu vielu rezistences veidošana. Vezikulu mediētā miR21 pārņemšana no audzēja asociētajiem adipocītiem (CAA) un audzēja asociētajiem fibroblastiem (CAF) uz vēža šūnām, tika identificēts kā signālceļš, kas izraisīja rezidenci pret taksāna ķīmijterapiju. Recipienta vēža šūnās miR21 iedarbojās tieši uz APAF1 mRNS, kas ir atbildīgs par apoptozes ierosināšanu taksāna iedarbības rezultātā (Worzfeld *et al.*, 2017).

### 1.3. Audzēja mikrovide

Audzēja mikrovide ir sarežģīts ekstracelulārā matricsa un dažādu šūnu veidu savienojums (Xiaolei *et al.*, 2013). Tā ir mehāniski un bioloģiski aktīva un dinamiska, jo tā nepārtraukti tiek pārveidota (Cox *et al.* 2011)



1.3.att. Audzēja mikrovides šūnas (attēls ar izmaiņām no Pattabiraman *et al.*, 2016)

Audzējs satur heterogēnu šūnu populāciju, kas veido stromu, kas ir atbalsta struktūra un ietver sevī saistaudus un asinsvadus, audzēja šūnu struktūru jeb parenhīmu, kā arī citas dažāda veida šūnas – imūnkompetantās šūnas, ar vēzi saistītie fibroblasti un angiogēnās vaskulārās šūnas (Dvorak *et al.*, 1991, Hanahan *et al.* 2012, Lopatina *et al.*, 2016).

Audzēju veidojošās šūnas var iedalīt trīs pamatgrupās:

1. Hematopoētiskās izcelsmes šūnas – šūnas, kas cēlušās no kaulu smadzenēm. Tās ir limfoīdās izcelsmes šūnas, kas sastāv no T un B šūnām un naturālajiem killeriem (NK), un mieloīdās izcelsmes šūnas, kas iekļauj makrofāgus, neitrofilus un mieloīdās izcelsmes supresoršūnas (Pattabiraman *et al.*, 2016).
2. Mezenhimālās izcelsmes šūnas – šūnas, kas cēlušās no mezenhīmas – fibroblasti, miofibroblasti, mezenhimālās cilmes šūnas (MCš), adipocīti un endoteliālās šūnas (Pattabiraman *et al.*, 2016.).
3. Ne-šūnu komponenti – galvenais šis komponents ir starpšūnu matricss (EMC), kas sastāv no daudziem atsevišķiem komponentiem – proteīniem,

glikoproteīniem, proteoglikāna – kas gan strukturāli, gan funkcionāli veicina EMC funkcijas (Pattabiraman *et al.*, 2016).

Audzēja mikrovidē iekļaujas augšanas faktori, citokīni, hemokīni un proteāzes, kas nodrošina audzēja šūnu neierobežotu dalīšanos, veicina angioģenēzi, šūnu invāziju un metastāžu veidošanos. Dažādie šūnu tipi spēj izdalīt gan augšanas, gan pret-augšanas signālus, kā arī spēj atbildēt uz citu šūnu sekretētajiem signāliem (Xiaolei *et al.*, 2013, Sounni *et al.*, 2013).

Visi šie komponenti veido audzēja mikrovidi (Pattabiraman *et al.*, 2016). Ir nepieciešama abpusēja mijiedarbība starp vēža šūnām un saimniekorganisma šūnām, lai audzējs varētu augt un attīstīties (Worzfeld *et al.*, 2017).

Tā ir kompleksu vide, kas iekļauj neskaitāmas mijiedarbības starp šūnu tipi un EMC un nodrošina labvēlīgu vidi audzēja attīstībai (Pattabiraman *et al.*, 2016).

### 1.3.1. Šūnu veidi audzēja mikrovidē

#### Imūnsistēmas šūnas

Daudzi audzēji uzrāda imūnsistēmas šūnu infiltrāciju, kas neatbilst klasiskajai definīcijai par iekaisuma imūno atbildi, un, kas ir funkcionāli noderīgas audzēja fenotipam (Douglas *et al.*, 2012).

**T šūnas** – tās ir pirmās imūnsistēmas šūnas, kas ir atbildīgas audzēja šūnu atpazīšanā un nogalināšanā. Tās veic imunoloģisku uzraudzību. Pēc atpazīšanas tās proliferējas un iznīcina jauni transformējušos audzēja šūnu. T šūnu atbildi ierosina citas imūnās sistēmas šūnas. Supresējošās T šūnas inhibē imūno atbildi pret audzēja šūnām (Gabrilovich D., 2016, Pattabiraman *et al.*, 2016).

**Citotoksiskie T limfocīti (CTL)** – šīs šūnas atpazīst antigēnus uz mērķa šūnas un lizē tās. Iespējamie antigēni ir vai nu virsmas proteīni, vai intracelulārie proteīni, kas ekspresēti uz šūnas virsmas. Audzēja – specifiskie CTL ir atrasti kopā ar neiroblastomā, ļaundabīgām melanomām, sarkomām, resnās zarnas, krūšu, dzemdes kakla, endometrija, olnīcu, deguna – rīkles un nieru karcinomām (Gabrilovich D., 2016).

**Naturālie killeri (NK)** – šūnas ar pretaudzēja iedarbību, bet, atšķirībā no CTL, tām nav receptoru, ar kuriem atpazīt antigēnus. Toties, tās spēj atpazīt normālas šūnas un šūnas, kas ir inficētas ar vīrusu vai audzēja šūnas. NK tumoricīdā aktivitāte ir dabiska, jo to neierosina specifiski antigēni.

**Makrofāgi** – tie spēj nogalināt specifiskas audzēja šūnas. Makrofāgi tiek aktivēti pateicoties faktoru kombinācijām, tai skaitā limfokīniem un interferoniem. Tie nav tik efektīvi

kā T šūnu meditatīvais citotoksiskais mehānisms, bet, pie dažādiem apstākļiem, makrofāgi spēj stimulēt audzēj-specifisko imūno atbildi.

Ir divu veido audzēju asociētie makrofāgi (TAM):

- TAM – 1 (M1) šūnas, kas veicina T šūnu darbību
- TAM – 2 (M2) šūnas, kas veicina audzēja toleranci (Gabrilovich D., 2016, Pattabiraman *et al.*, 2016)

**Dendrītiskās šūnas** – antigēnu prezentējošās šūnas, kas atrodas barjeraudos (ādā, limfmezglos). Tās spēlē centrālo lomu audzēja – specifiskās imunitātes atbildes ierosināšanā. Šīs šūnas uzņem audzēja asociētos proteīnus, pārstrādā tos un piegādā TAAs T šūnām, lai tās sāktu stimulēt CTL atbildi pret audzēju.

Arī dendrītiskās šūnas iedalās klasēs, kas veicina un apspiež audzēja veidošanos (Gabrilovich D., 2016).

**Limfokīni** – tos producē imūnsistēmas šūnas, lai stimulētu augšanu vai ierosinātu citu imūnsistēmas šūnu aktivitāti. Tie ir, piemēram, IL-2, kas zināms arī kā T šūnu augšanas faktors, un interferoni. IL-12 izdalās no dendrītiskajām šūnām un specifiski ierosina CTL, kas veicina pretaudzēja imūno atbildi (Gabrilovich D., 2016).

**Regulatorās T šūnas** – parasti atrodamas ķermenī un palīdz novērst autoimūnās reakcijas. Tās veidojas imūnās atbildes aktīvajā fāzē pret patogēniem un ierobežo spēcīgu imūno atbildi, kas varētu nodarīt kaitējumu saimnieka ķermenim. Šo šūnu akumulācija vēža šūnās inhibē pretaudzēja imūno atbildi (Gabrilovich D., 2016).

**Mieloīdās izcelsmes supresoršūnas** – sastāv no nenobriedušām mieloīdām šūnām un to prekursoriem. Šīs šūnas lielos daudzumos akumulējas vēža šūnās un apspiež imūno atbildi (Gabrilovich D., 2016).

Tādas imūnsistēmas šūnas, kā limfocīti, dendrītiskās šūnas, naturālie killeri (NK), ir noteicošās, lai novērstu audzēja veidošanos organismā. Tomēr, šo imūno atbildi negatīvi neregulē mieloīdās izcelsmes supresoršūnas (MSDCs), kas neitralizē T šūnu, NK un makrofāgu aktivēšanos.

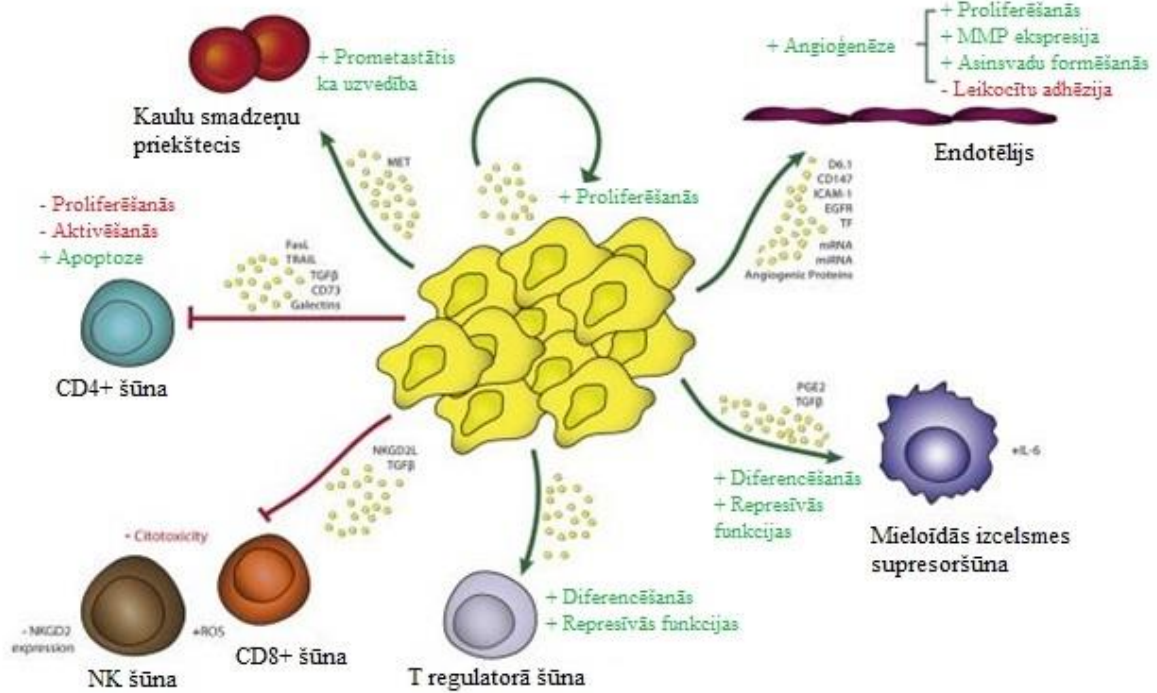
Ir novērots, ka nespecifiskās imunitātes šūnu (neitrofili, makrofāgi, tuklās šūnas) klātbūtne veicina vēža attīstību. Tie sāk sekretēt citokīnus, hemokīnus, augšanas faktorus un proteāzes, kas tālāk izsauc jaunu asinsvadu veidošanos un veido audzējam labvēlīgu mikrovidi, kas atvieglo izdzīvošanas iespējas neoplastiskajām šūnām. (Sounni *et al.*, 2013, Douglas *et al.*, 2012).

Leikocītiem, kas infiltrējušies audzējā, ir novērota divējāda daba. Atkarībā no polarizācijas, imūnsistēmas šūnas var darboties vai nu ar pretaudzēja vai pro-audzēja funkcijām. Aktivētas un polarizētas imūnsistēmas šūnas, piemēram, M2 makrofāgi vai N2

neitrofili, uzrāda vai pārnēs neskaitāmu daudzumu hemokīnu, citokīnu, augšanas faktoru un proteāzes, kas var novest līdz audu remodelācijai, angiogēnēzei, šūnu proliferācijai, genomiskai nestabilitātei un neoplastisko šūnu izplatībai ektoiskajos audos (Sounni *et al.*).

Lai gan lielākā daļa audzēju tiek likvidēti tieši ar imūnsistēmas palīdzību (tādā veidā tie netiek nemaz atklāti), tomēr citi audzēji turpina augt, neatkarīgi no TAA klātesamības. Ir daži mehānismi, kas var izskaidrot ķermeņa nepietiekamo atbildi uz TAA. Piemēram, specifiska imunoloģiska tolerance pret TAA, kas iekļauj T šūnu apspiešanu; imūnās atbildes apspiešana, ko ierosina ķīmiskie, fizikālie vai virālie aģenti (piem., HIV); imūnās atbildes apspiešana, ko ierosina citotoksiskas zāļu vielas vai radiācija; imūnās atbildes apspiešana, ko izsauc pats audzējs caur dažādiem kompleksiem un vēl nenoskaidrotiem mehānismiem, kā dēļ samazinās T, B un antigēnu prezentējošo šūnu funkcijas, samazinās IL-2 producēšanās u.c.; TAM – 2 (M2) šūnu klātbūtne, kas veicina audzēja toleranci (Gabrilovich D., 2016).

Ir noskaidrots, ka dažu šūnu sekretētajām EV piemīt imunomodulējošas īpašības. Piemēram, EV, ko izdala dendrītiskās šūnas un B šūnas, uzrāda pretaudzēja un imunitāti stimulējošu efektu, kā arī nodrošina ar proteīniem, kas spēj aktivēt T šūnas, kad tās satiekas ar audzēja antigēniem. Bet eksosomas, kas tiek sekretētas no audzēja, spēj apspiest imūno atbildi. Šīs EV pavājina perifēro limfocītu citotoksisko aktivitāti un izsauc apoptozi limfocītiem un dendrītiskajām šūnām. Tās spēj arī inhibēt T šūnu aktivēšanos, bloķējot T šūnu signālu kaskādi (Worzfeld *et al.*, 2017). Tātad audzēja EV apspiež pretaudzēja imūno atbildi inhibējot T šūnu aktivēšanos un proliferēšanos un stimulē to apoptozi. Tāpat arī audzēja EV iedarbojas uz NK un CD8+ inhibējot to citotoksicitāti un inducē mieloīdās izcelsmes supresoršūnas (Gutierrez – Vazquez *et al.*, 2013). Audzēja EV spēj arī regulēt MDSC aktivitāti caur vezīkulu asociēto HSP70, bet, iespējams, kas pateicoties tieši šim mehānismam, tas varētu nodrošināt veiksmīgu mērķi priekš imūnterapijas. Iedarbojoties uz HSP70 pozitīvajām EV un bloķējot HSP70/ TLR2 mijiedarbību, izmantojot specifisku peptīdu aptamēru, samazinājās MDSC daudzums un aktivitāte, kas tālāk inhibēja audzēja progresēšanu (Worzfeld *et al.*, 2017). Imūnsistēmas šūnas ir vienas no visvairāk ietekmētajām šūnām, ko ietekmē audzēja EV. Tās pastiprina imūno supresoršūnu diferencēšanos un aktivēšanos, kā arī modulē antigēna prezentēšanu un ierosina T šūnu apoptozi (Czernek *et al.*, 2017).



1.4.att. Audzēja EV iedarbība uz imunitātes šūnām, endotēliju un audzēja šūnām (attēls ar izmaiņām no Gutierrez – Vazquez *et al.*, 2013)

### MCš šūnas un CAF

**Mezenhimālās cilmes šūnas (MCš)** ir pieaugušu cilvēku cilmes šūnas. Galvenokārt tās atrodamas kaulu smadzenēs, bet tās var izdalīt arī no citiem audiem un orgāniem – asinīm, taukaudiem, ādas, embrionāliem aknu un plaušu audiem u.c. (Dominici *et al.*, 2006, Sousana *et al.*, 2014).

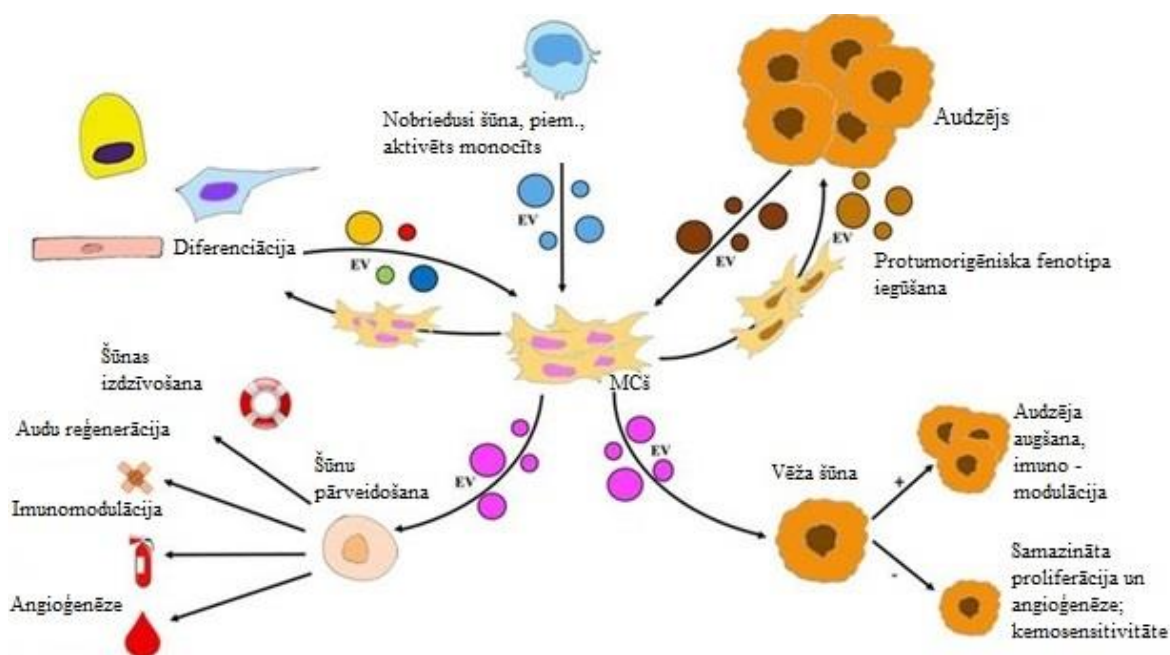
MCš ir viena no noteicošajām lomām mikrovidē, kas kontrolē hematopoētisko cilmes šūnu lokalizāciju, pašatjaunošanos un diferenciēšanos, kā arī modulē imūno šūnu, piemēram, B un T limfocītu, NK, monocītu un dendrītisko šūnu funkcijas. Arī liels daudzums citokīnu un augšanas faktoru tiek sekretēts tieši no MCš (Park *et al.*, 2009).

MCš diferenciējas 3 mezenhimālajās šūnu līnijās – osteocītos, adipocītos un hondrocītos. Tā kā tās ir multipotentas šūnas, tās spēj pārveidoties ne tikai par mezenhimālās cilmes audiem, bet noteiktos apstākļos arī par miocītiem, neironiem, glijas šūnām, arī par ādas šūnām (Sousana *et al.*, 2014, Dominici *et al.*, 2006, Pittenger *et al.*, 1999).

MCš fizioloģiskās funkcijas ietver migrēšanu uz audu iekaisumu vai bojājumu vietām, tai skaitā arī uz audzēja lokalizācijas vietu (Chamberlain *et al.*, 2007, Marquez – Curtis *et al.*, 2013). Tieši šo īpašību dēļ, tās tiek plašāk apskatītas reģeneratīvajā medicīnā (Parekkadan *et al.*, 2010, Dostert *et al.*, 2017, Baksh *et al.*, 2004).

MCš piemīt audzēja stromas šūnām līdzīgas īpašības. Pēc migrācijas uz audzēja lokalizācijas vietu, tās var diferencēties par CAF. Iespējams, ka audzēja šūnas, izmantojot sekretoro faktoru starpniecību, sazinās ar MCš. Šo sekretorā faktora funkciju pilda audzēja sekretētās EV (Mishar *et al.*, 2008, Pattabiraman *et al.*, 2016).

EV, kas nāk no MCš (MCš – EV), uzrāda interesantas īpašības, ko varētu uzskatīt pat par terapeitiskām, lai gan tām var piemist arī pretējs efekts, kas veicina vēža izplatīšanos. Tas nozīmē, ka MCš uzvedība un īpašības var tikt iespaidotas ar citu šūnu sekretētajām EV (Dostert *et al.*, 2017).



1.5.att. MCš iedarbība uz citām šūnām (attēls ar izmaiņām no Dostert *et al.*, 2017)

Ir izskanējuši pieņēmumi MCš – EV izmantot pretvēža terapijas, bet domas par to ir bijušas dalītas, jo tas viss ir atkarīgs no kurienes tieši tiek ņemtas MCš, no kurienes cēlies audzējs un cik ilgi ir vajadzīgs veikt stimulējošo efektu ar EV. Šobrīd ir novērots, ka MCš – EV var gan veicināt audzēja progresēšanu, gan samazināt to, gan arī var nenovērot pilnīgi nekādu efektu. Zināms ir tikai tas, ka visos gadījumos galvenais faktors ir citokīnu un miRNS saturs tajās (Dostert *et al.*, 2017, Xiaoyang *et al.*, 2017). Starp audzēja šūnām un MCš notiek apmaiņa ar EV, kas satur nukleīnskābes. Notiek onkogēnu un pretaudzēju RNS apmaiņa. Šīs vezīkulas ir spējīgas pārnest CD73 uz audzēja šūnām, dodot iespēju metabolizēt AMP par adenoziņu, kas tālāk samazina NK un T šūnu aktivāciju. MCš – EV var pat ierosināt zāļu rezistenci kuņģa šūnās, stimulējot noteiktu proteīnu ekspresiju (Dostert *et al.*, 2017).

EV, kas nāk no vēža šūnām, spēj veikt ģenētiskas modifikācijas MCš. Lindoso *et al.* savā pētījumā demonstrēja, ka EV, kas izdalītas no renālā vēža cilmes šūnām, var ierosināt

epiģenētiskas izmaiņas recipienta šūnās. MCš tiek piesaistītas audzēja rajonam un audzēja EV iedarbībā maina savu fenotipu, kļūstot pro-tumorigēnas. Par to liecina dažādu gēnu pārāk lielā ekspresija, kas iesaistīti šūnu migrācijā (hemokīnu receptoru tipi CXCR4 un CXCR7), ECM remodelācijā (kalogēna IV alfa 3 ķēde (COL4A3)) un angiogēnēzē, un audzēja augšanā ( IL-8, OPN un mieloperoksidāze) (Lindoso *et al.*, 2015). Cits piemērs, kas parāda MCš fenotipa modifikāciju ir Li *et al.* pētījumā par plaušu audzēja EV. *In vitro* EV no plaušu vēža līnijas stimulēja iekaisuma citokīnu sekrēciju un producēšanos MCš. Trīs veidu citokīni – IL-6, IL-8 un monocītu kemoatraktantu proteīns (MCP) – 1 – tika izdalīti no MCš, kad uz tām iedarbojās ar plaušu vēža šūnu izdalītajām EV (Li *et al.*, 2015). Arī citos pētījumos tika novērota līdzīga darbība. Pastāvīgas mielogēnās leikēmijas (CML) EV iedarbība uz MCš izsauca IL-8 producēšanos no MCš, kas ļāva CML šūnām proliferēt.

MCš un vēža šūnu komunikācija ir īpaša. Vispirms vēža šūnas iedarbojas uz MCš ar savu EV palīdzību un pārmodelē tās. Kā atbilde notikušajam procesam seko tas, ka MCš sāk piedalīties vēža progresijas veicināšanās ar sevis sekretētajām EV (Dostert *et al.*, 2017).

**Audzēju asociētajiem fibroblastiem (CAF)** ir galvenā loma audzēja mikrovidē, jo tie ne tikai veicina audzēja šūnu iniciāciju, augšanu, invāziju, metastāžu veidošanos un terapeitisko rezistenci, bet arī iesaistās mikrovides veidošanā – angiogēnēzē/ limfogēnēzē, starpsūnu matricas (ECM) pārmodelēšanā, kā arī ar audzēju saistītā iekaisuma un metabolisma programmēšanā. Būtībā CAF iesaistās visā, kas saistīts ar pre-malignitāti (Sounni *et al.*, 2013, Luo *et al.*, 2015).

CAF spēj radīt virkni faktoru, tais skaitā arī VEGF un IL-8, kas ierosina proangiogēnēzi. Tie, tāpat kā normālie savienojšie audu fibroblasti, ir galvenais ECM proteīnu biosintēzes avots. CAF producē arī dažādus ECM degradējošus enzīmus (bFGF, VEGF, TGF –  $\beta$ ), padarot tos biopieejamus to receptoriem endotēlija šūnās. CAF spēj radīt arī kemoatraktantus proangiogēniskajiem makrofāģiem, neitrofilēm un citām mieloīdajām šūnām. Tāpat arī stimulē endoteliālo šūnu prekursoru rekrutēšanu, sekretējot CXCL12 (Douglas *et al.*, 2012).

#### Audzēja šūnas

Audzēja šūnas ir atšķirīgas no parastajām organisma šūnām. Morfoloģiski tās var raksturot kā neregulāra izmēra un formas šūnas, kurās ir redzams liels, abnormāls kodols, kodoliņi ir labi redzami un citoplazma nepietiekoši aizpilda šūnu (Baba *et al.*, 2007.).

Šūnas ļaundabīgumu nosaka gan kodols, gan arī dalīšanās cikls mitoze. Pārmaiņas kodolā skar tā virsmu, formu, blīvumu, struktūru, homogenitāti, kā arī kodola/ citoplazmas

attiecību. Audzēja šūnām mitožu skaits pieaug, tās ir atipiskas un veido defektus, kas rezultējas ar nesimetriskām un atipiskas formas hromosomām (Baba *et al.*, 2007).

Arī citoplazmā veidojas jaunas un izzūd vecās struktūras. Ribosomālo un mesendžeru RNS uzkrāšanās padara citoplazmu bazofilu. Audzēja šūnām ir raksturīgs mazs citoplazmas tilpums ar vakuolām (Baba *et al.*, 2007, Ruddon *et al.*, 2003, <http://www.cancerresearchuk.org>).

Audzēja šūnās notiek funkcionālas izmaiņas, kas sekmē dažādu augšanas faktoru, hormonu, molekulu, kas līdzīgas hormoniem, lītisko enzīmu (kolagēna, katepsīna, plasmogēna aktivatora) formēšanos un izdalīšanos. Tie savukārt veicina neoplastisko šūnu mobilitāti un izsēšanos (Baba *et al.*, 2007, Ruddon *et al.*, 2003).

Proliferācija ir raksturīgākā iezīme audzēja šūnām. Tās nepārstāj augt un dalīties, kā arī tās nepakļaujas lokālai un ģenerālai organisma kontrolei (Baba *et al.*, 2007, Ruddon *et al.*, 2003). Ja labdabīgie veidojumi pakļaujas zināmiem limitiem, tad ļaundabīgie veidojumi ir ļoti invazīvi, ar augšanas klusajām fāzēm, kam pēc tam seko intensīva un nekontrolējama augšanas fāze. Proliferēšana un migrēšana ir neparedzama (Baba *et al.*, 2007). Tieši šī iemesla dēļ audzēja šūnām ir palielināts risks iegūt kļūdainus gēnus.

Normālas šūnas parasti ir spējīgas izlabot kļūdainos gēnus, jo tā darbojas DNS labošanas fermenti. Ja bojājums ir pārāk liels, tad šūna pašiznīcinās jeb veic apoptozi. Turpretim audzēja šūnu molekulas, kas atbild par to, lai šūna saņemtu attiecīgus signālus par labošanu, ir kļūdainas, kā rezultātā audzēja šūna nespēj pati sevi izlabot. Tieši pretēji – jaunas gēnu kļūdas var likt audzēja šūnai saņemt nepareizus signālu, tā var sākt augt ātrāk, izplatīties tālāk ķermenī vai kļūt rezistentā pret terapiju (Kelley *et al.*, 2014, Lodish *et al.*, 2000, <http://www.cancerresearchuk.org>).

Tā kā audzēja šūnas ļoti ātri reproducējas, tās nespēj nobriest līdz galam. Tām nav sava specifiska funkcija organismā, kā tas ir ar normālajām šūnām. Tām nav arī virsmas molekulu, kas ļautu nostiprināties starp citām šūnām. Šīs īpašības neesamība atvieglo audzēja šūnu izplatību tālāk pa organismu (<http://www.cancerresearchuk.org>).

Audzēja šūnām raksturīga ir niecīgs skābekļa patēriņš un palielināta glikozes izmantošana. Tāpēc audzēja šūnas ir kā parazīts, kas tērē organisma enerģiju (Baba *et al.*, 2007.). Ir pat ierosināts, ka audzēju vajadzētu uztvert kā atsevišķu funkcionālu orgānu (Cox *et al.*, 2011).

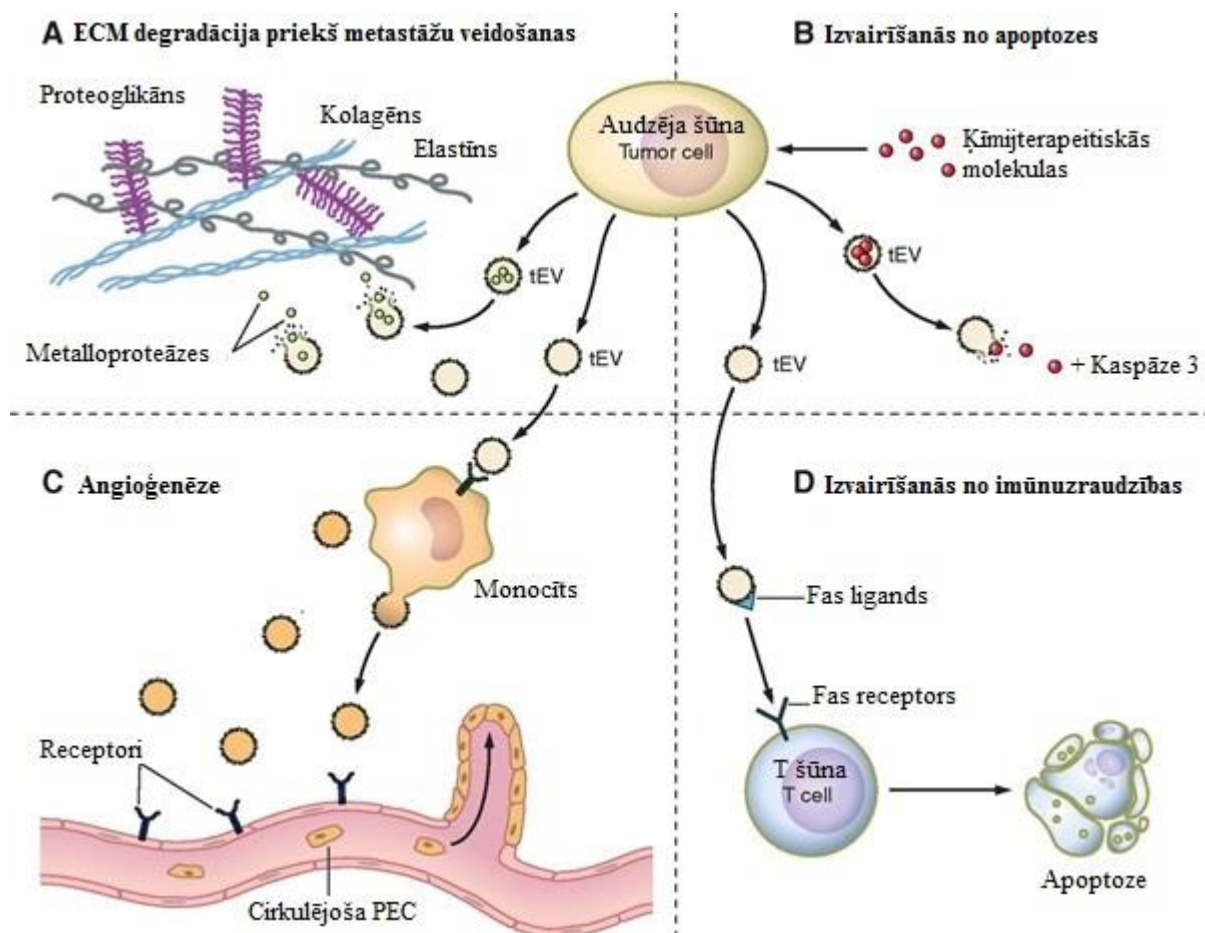
Audzēja šūnas pašas var manipulēt ar mikrovidi, lai uzlabotu to spēju izdzīvot un tādā veidā radot pozitīvu tumorigēnisko atgriezenisko saiti. Interesanti, ka šūnas ar tumorigēnisku genotipu var kļūt fenotipiski normālas, ja tiek pareizi manipulēts ar mikrovides saturu. No šobrīd savāktajiem pierādījumiem, domājams, ka varētu būt iespējams atjaunot krūts vēža

šūnulīnijas tuvu normālajam šūnu fenotipam, manipulējot ar šūnu mikrovidi un vienlaicīgi inhibējot dažādus signālceļus (Cox *et al.*, 2011).

Kopumā audzēja šūnas ir kā disfunkcionāla orgāna karikatūra – to signālceļi ir bojāti, audzēja šūnas atņem barības vielas tuvumā esošajām šūnām, notiek toksisko atkritumproduktu uzkrāšanās, piemēram, laktātu, kas veicina vides paskābināšanos, kā arī ir reģioni, kur nenotiek perfūzija un veidojas lokāla hipoksija (Dudley A.C., 2012).

Audzēja šūnas producē arī EV bez jebkādas stimulējošas iedarbības, tomēr pastiprinātu to izdalīšanos izraisa šūnas stress, piemēram, kā atbilde uz karstuma šoku vai pretvēža zāļu iedarbību. Audzēja izdalītās EV (tEV) apspiež imūno atbildi, kas vērsta pret audzēja šūnām un veicina tā progresēšanu un izdzīvošanu (Gutierrez – Vazquez *et al.*, 2013).

Audzēja izdalītās EV caur citām mikrovides šūnām ietkmē vēža progresiju. Tā, piemēram, tEV satur metalloproteāzes, kas atbild par ECM degradāciju. Tas veicina vēža šūnu invāziju. tEV var veicināt vēža šūnu rezistenci pret ķīmijterapiju un tās izsaukto šūnu apoptozi. tEV stimulē proangiogēno faktoru sekrēciju un veicina epiteliālo šūnu proliferāciju, kuru rezultātā notiek angiogēnēze un audzēja augšana. Kā arī tEV, kas nāk no vēža šūnām, pakļauj iedarbībai Fas ligandus, kas inducē T šūnu apoptozi un inhibē citu imunitātes šūnu funkcijas, kas ļauj vēža šūnām izvairīties no organisma imūnuzraudzības (Turturici *et al.*, 2014). (skat. att.1.6.)



1.6.att. Audzēja šūnu izdalīto EV ietekme uz citām mikrovides šūnām (attēls ar izmaiņām no Turturici *et al.*, 2014)

Kā arī, protams, audzēja izdalītās EV iedarbojas arī uz paša audzēja šūnām. Notiek to proliferācija un tiek inducēta metastātiska uzvedība (skat. 1.4.2.att.) (Gutierrez – Vazquez *et al.*, 2013).

Audzēja EV piedalās atbildes reakcijās pret pretvēža terapijām un tās var iereosināt zāļu vielu rezistenci (Wendler *et al.*, 2017).

Atkarībā no tEV satura, tās ir iesaistītas vēža iniciēšanā, progresēšanā un premetastātiskās nišas nodrošināšanā. Ir kļuvis arī skaidrs, ka tEV var ne tikai pārnest funkcionālus ncRNS, bet arī DNS un modificēt gēnu ekspresiju recipienta šūnās (Lopatina *et al.*, 2016, Seigneuric *et al.*, 2016).

### Endotēlija šūnas

Endotēlija šūnām ir svarīga loma asinsvadu un limfvadu attīstībā un funkcionēšanā (Nikitenko *et al.*, 2006). To nepārtraukts slānis izklāj sirdi, arteriolas, kapilārus, vēnas un limfātiskos vadus. Tas ir specifisks un mainīgs atkarībā no audiem un orgāniem (Dudley, 2013).

Neatkarīgi no audu veida, tas veic dažādas funkcijas – regulē barības vielu, skābekļa un citu vielu iekļūšanu audos, uztur un regulē asins plūsmu, lai nodrošinātu netrombogēnisku virsmu un regulē leukocītu pārvietošanos iekšā un ārā no audiem (Dudley, 2013).

Normāls endotēlija šūnu izkārtojums ir akurāts un hierarhisks (artērijas saistās ar arteriolām, kas tālāk pārveidojas par kapilāriem ar plānām sienām). Bet audzējiem novēro abnormālu endotēlija morfoloģiju - asinsvadi ir ar neregulāru diametru, trausli, ar sūcēm un asins plūsma ir slikti regulēta (Dudley, 2013, Maishi *et al.*, 2016). Endotēlija šūnu pārmērīgā proliferēšanās un transformēšanās noved līdz patoloģiskai angioģenēzei/ limfoģenēzei un vaskulārai disfunkcijai. Tā ir raksturīgākā iezīme ļaundabīgiem audzējiem (Nikitenko *et al.*, 2006).

Samazināto kontroles mehānisma reakciju un saasināto pro-angioģenēzes signālu dēļ, audzēja endotēlijs saņem nepārtrauktus signālus augt un attīstīties (Nikitenko *et al.*, 2006, Gutierrez – Vazquez *et al.*, 2013).

Tādi faktori kā hipoksija un augšanas faktoru stimulēšana rezultējas ar endoteliālo disfunkciju (Dudley A.C., 2013).

Daudzus audzējus raksturo augsta vaskulārā endoteliālās augšanas faktora – A (VEGF-A) koncentrācija. VEGF ir spēcīgs vazodilatators, kas veicina šķidrumu noplūdes, augstu intersticiālo spiedienu, abnormālu asinsvadu zarošanos, kura iespējams asinsvados veidojas mazas spraugas un plaisas. Hroniska VEGF stimulācija audos noved pie neregularitātes TEC monoslānī un barjerfunkcijas zaudēšanas. Neregularitātes TEC pārklājuma apgrūtināšana asins plūsmu kā rezultātā veidojas hipoksija un hiperfūzija. Uz endoteliālajām šūnām spiedienu rada arī paša audzēja šūnas, kas pārklājas savā starpā un kopā tās rada biomehānisku spiedienu, sasprindzinājumu un izmaiņas asins plūsmā. Šī haotiskā asins plūsma arī ietekmē endotēlija formu, izmēru un diferencēšanos (Dudley A.C., 2013).

#### **1.4. Hipoksija audzējā**

Audzēja attīstīšanās procesu raksturo ar strauju šūnu augšanu un dalīšanos, kam pievienojas šūnu mikrovides izmaiņas. Lielākā daļa šo mikrovides izmaiņu notiek pateicoties nepietiekamai skābekļa piegādei, kas veidojas no hipoksijas vai pat anoksijas (Vaupel P., 2004).

Hipoksija ir izplatīta iezīme attīstītajiem lokālajiem audzējiem, kas tiek saistīti ar pavājinātu terapeitisko atbildi un ļaundabīgu progresiju, jo iespējams ir iestājies recidīvs vai notikusi lokāla vai reģionāla izplatīšanās tālāk organismā (Vaupel P., 2004).

Hipoksija veidojas no strukturālās abnormalitātes audzēja asinsvados, kuras dēļ ir samazināta skābekļa izplatīšanās audzēja šūnās un nekrotiskajā vidē (Silva *et al.*, 2017).

Hipoksijas efektu uz audzēja progresiju mediē virkne hipoksijas ierosinātas proteomiskas un genomiskas izmaiņas, kas aktivē angiogēnēzi, anaerobo metabolismu un citus procesus, kas nodrošina audzēja šūnu izdzīvošanu un izklūšanu no vides, kur skābekļa daudzums ir nepietiekams (Vaupel P., 2004). Kā arī hipoksikajos apgabalos ir novērota augsta imūno šūnu infiltrācija, kas arī palīdz ierosināt reakciju ķēdi, kas stimulē protumoriālo gēnu ekspresiju, pastiprina ļaundabīgumu un var novest līdz pat zāļu rezistencei (Silva *et al.*, 2017).

Tātad hipoksijai ir aktīva loma onkoģenēzē un tā veicina audzēja vispārējo izdzīvošanu. Normālos audos skābekļa līmenis ir heterogēns un fizioloģiskais pO<sub>2</sub> var svārstīties no 20 mmHg aknās un smadzenēs līdz pat 70 mmHg nierēs (tas ir 3,1 – 8,7% O<sub>2</sub>). Audzējos novērojams pO<sub>2</sub> līmeņa kritums 10 – 30 mmHg. 82% no visiem skābekļa rādījumiem, kas ņemti no audzējiem, uzrāda 0,33% O<sub>2</sub> rādījumus, kas atbilst 2,5 mmHg (Silva *et al.*, 2017).

Hipoksikiem audiem ir tieksme uz proliferēšanos un izdzīvošanu. Tieši agresīvie fenotipi ar paaugstinātu rezistenci pret terapiju ir saistīti ar ļoti hipoksiskiem audzējiem, kas iezīmē hipoksijas klīnisko nozīmi (Silva *et al.*, 2017).

Hipoksiju inducējošie faktori (HIFs) ir saistīti ar hipoksisko audzēju mikrovidi (Silva *et al.*, 2017). HIF-1 ir galvenais regulators audzēja šūnu adaptācijā pie hipoksiskā stresa (Vaupel P., 2004). Tas visbiežāk ir izplatīts solīdajos un metastātiskajos audzējos, piemēram, krūts, prostatas, resnās zarnas, plaušu, aizkuņģa dziedzera, galvas un kakla audzējos. HIF-1 molekula funkcionē kā heterodinamisks transkripcijas faktors, kas sastāv no HIF-1 $\alpha$  un HIF-1 $\beta$ . Kad skābekļa līmenis samazinās, HIF-1 $\alpha$  akumulējas un pārveidojas kodolā, kur tas izveido aktīvo transkripcijas faktoru HIF-1, saistoties ar HIF-1 $\beta$ . Šī molekula tālāk regulē daudzus gēnus, kas saistīti ar vēža bioloģiju un metabolismu un kontrolē tā proliferēšanās spēju, metastāžu veidošanos un šūnu agresivitāti, kā arī tā potencē šūnu rezistenci pret radioterapiju un ķīmijterapiju (Silva *et al.*, 2017).

Dažu terapiju rezultātā arī var veidoties hipoksija audzējā, piemēram, antiangiogēnēzes (VEGF inhibitori) terapijas rezultātā, kā arī androgēnu deprivācijas terapijas laikā. Vairums šo zāļu vielu darbības mehānisms ir balstīts uz skābekļa un barības vielu piegādes samazināšanu audzējā. Zāļu vielu izraisītā hipoksija tiek uzskatīta par vienu no galvenajiem faktoriem, kas samazina efektivitāti plaša spektra pretvēža terapijām. Bet pētījumi rāda, ja uzmanīgi izvēlas kombinētās terapijas un to secību, tad tas var pārvērst hipoksiju par potenciālo terapijas mērķi. Piemēram, kombinējot topotekānu, kas ir HIF inhibitors, ar bavacizumabu, kas ir antivielu, kas mērķēta pret VEGF, uzrādīja sinerģisku pretaudzēja aktivitāti glioblastomas gadījumā (Silva *et al.*, 2017).

## 1.5. Starpšūnu matrikss

Lokālā mikrovide jeb niša vēža šūnās spēlē lielu lomu vēža attīstībā. Svarīgs tās komponents ir starpšūnu matrikss. Tas ir komplekss makromolekulu tīkls ar īpatnējām fizikālajām, bioķīmiskajām un biomehāniskajām īpašībām (Lu *et al.*, 2012). ECM tiek definēts kā dažādu proteīnu un cukuru kopums, kas ieskauj apkārt esošās šūnas. Tas sastāv no IV tipa kolagēna, dažādiem kolagēnu apakštīpiem un laminīna, kā arī no nekolagēna molekulām, piemēram, glikozaminoglikāna (GAG) - hialuronāna un proteoglikāna -, fibronektīna, vitronektīna un trombospondīna. ECM ir kā nodalījums, kas nodrošina strukturālo atbalstu un veido raksturīgas formas un dimensijas audiem un orgāniem (Cox *et al.*, 2011, Stewart *et al.*, 2004).

Lai gan ECM tiek stingri kontrolēts embrionālajā attīstībā un orgānu homeostāzē, parasti tā normālā darbība tiek izjaukta slimības laikā (Lu *et al.*, 2012). Kad ECM remodelācija kļūst pārmērīga un nekontrolējama, veidojas dzīvībai bīstams patoloģisks stāvoklis. Tieši ECM remodelācija ir kritisks faktors audzēja ļaundabīguma un metastāžu veidošanās progresijā (Cox *et al.*, 2011).

Kad vēzis progresē, ECM komponentu ekspresija var pastiprināties, pavājināties vai tie var pazust. Piemēram, kad prostatas šūnas sāk pārveidoties par onkogēniem, kolagēns IV sāk spēcīgāk ekspresēties prostata vēža šūnu līnijās; tikmēr novērota arī pastiprināta laminīna ekspresija, bet kalcija neatkarīgo intracelulāro šūnu adhēzijas molekulas – 7 (ICAM-7) ekspresija ir samazināta. Kaulu vēža gadījumā ECM tiek novērota pastiprināta kaulu sialoproteīna (BSP), osteopontīna (OPN) un osteokalcīna (OC) ekspresija (Stewart *et al.*, 2004). Šādas ECM anomālijas var pārregulēt stromas šūnas, sekmēt ar audzēju saistīto angiogēnēzi un iekaisumu un veido audzējam labvēlīgu mikrovidi (Lu *et al.*, 2012).

ECM darbojas arī kā barjera pret progresējošajām vēža šūnām. Lai tiktu cauri ECM barjerai, vēža šūnas sāk ražot specifiskas proteāzes, kas degradē ECM komponentus. Matriksa metalloproteāze (MMP) ir ar plašu substrāta specifiku pret ECM komponentiem, piemēram, kolagēna I, II, III, un IV tipu, laminīnu un fibronektīnu. Audzēja šūnām augot un daloties tās sekretē MMP un sagrauj stromu un pamata membrānu. Arī neitrālā endopeptidāze (NEP) ir šūnas virsmu metalloproteāze, kas iesaistīta vēža progresijas veicināšanā. Tāpat arī katepsīns ir spējīgs degradēt dažus no ECM komponentiem, tai skaitā, kolagēnu IV, fibronektīnu un laminīnu (Stewart *et al.*, 2004).

## 1.6. Mikrovides šūnas kā terapeitiskie mērķi

### 1.6.1. Angioģenēze kā pretaudzēju terapijas mērķis

Audzēja augšana un izplatīšanās ir atkarīga no skābekļa un barības vielām, ko tam piegādā jaunizveidotie asinsvadi (Sounni *et al.*, 2013). Tāpēc, lai veicinātu asinsvadu veidošanos, tiek izdalīti dažādi proangiogēnie augšanas faktori. Svarīgākais no tiem - vaskulārais endotēlija augšanas faktors (VEGF). Lielākajai daļai solīdo audzēju VEGF ekspresija ir ļoti augsta, tāpēc radās cerība, ka inhibējot VEGF signālceļus, varētu panākt efektīvu antiangiogēzes terapiju gandrīz visiem audzēju tiem (Vasudev *et al.*, 2014).

Pirms 40 gadiem angiogēze parādījās kā jauns, unikāls terapeitiskais mērķis vēža ārstēšanā. Lietojot antiangiogēzes aģentus, tika novērots, ka palielinājās vispārējā izdzīvošana vai progresijas brīvie periodi pacientiem ar metastātisku kolorektālo vēzi, plaušu vēzi un krūts vēzi, dodot to kombinācijā ar parasto ķīmijterapijas režīmu. Bet kopumā antiangiogēzes zāļu vielu sniegtais labums bija samērā mazs un lielākajai daļa vēža pacientu pārstāja veidoties atbilde vai atbildes nebija nemaz uz šo terapiju (Sounni *et al.*, 2013). Šobrīd tādas uz VEGF signālceļiem mērķētas zāļu vielas, kā bevacizumabs, sunitinibs un aflibercepts, ir uzrādījušas pārliecinošu aktivitāti darbības vidē, bet tomēr VEGF inhibīcijas nav pietiekoši efektīva pret visiem vēžu tiem.

Bevacizumabs (Avastin®) un aflibercepts (Eylea®) ir **monoklonālās antivielas**, kas saistās tikai ar VEGF-A (aflibercepts saistās arī ar placentas augšanas faktoru (PlGF)) (Vasudev *et al.*, 2014). Lai gan monoklonālās antivielas ir monospecifiskas, kad tiek runāts par saistīšanos ar specifiskiem aģentiem, to mērķu neitralizēšanas var bloķēt citu angiogēzes faktoru funkcijas. Piemēram, ramucirumabs (Cyramza®) saistās ar VEGFR2 un bloķē mijiedarbību ar VEGF-A, VEGF-C un VEGF-D. Līdzīgi arī aflibercepts var neitralizēt ligandus, jo pie vienas receptora saitās vairāki ligandi (VEGF-A un PlGF) (Cao Y., 2016).

Šīs zāļu vielas ir vienīgās no antiangiogēzes līdzekļiem, kas uzrāda nozīmīgu aktivitāti kombinācijās ar citotoksisko ķīmijterapiju. Skaidrojums tam visam ir "vaskulārā normalizācija". Ir zināms, ka audzēja asinsvadi ir cauri, ar sūcēm un disfunkcionāli. Preklīniskie pētījumi rāda, ka traucējot VEGF signālceļus, tas noved pie audzēja asinsvadu funkcijas uzlabošanās (vaskulārā normalizācija) un tas savukārt veicina ķīmijterapijas zāļu vielu piekļūšanu audzējam. Principā bevacizumabs un aflibercepts uzlabo ko-administrētās ķīmijterapijas zāļu vielu piegādi (Vasudev *et al.*, 2014, Cao Y., 2016).

Uz ķīmiskajiem savienojumiem bāzētās zāles nav tik specifiskas kā monoklonālās antivielas. Visbiežāk tiek izmantoti **tirozīnkināzes inhibitori (TKI)**, kas veidoti, lai inhibētu

VEGF signālceļus plašākā spektrā (Vasudev *et al.*, 2014, Cao Y., 2016). Lielākā daļa no VEGF – TKI ir mērķēti uz VEGFR1, VEGFR2 un VEGFR3 signālceļiem. Šo receptoru inhibitori bloķē arī daudzu citu receptoru kināzes, kas nav no VEGF saimes, bet, kas arī ir saitīti ar angiogēneses signālceļiem – trombocītu augšanas faktoru (PDGF) receptori un fibroblastu augšanas faktoru (FGF) receptori (Cao Y., 2016).

FDA šobrīd ir apstiprinājuši 4 TKI inhibitorus – sorafenibu (Nexavar®), sunitinibu (Sutent®), pazopanibu (Votrient®) un aksitinibu (Inlyta®) (Vasudev *et al.*, 2014).

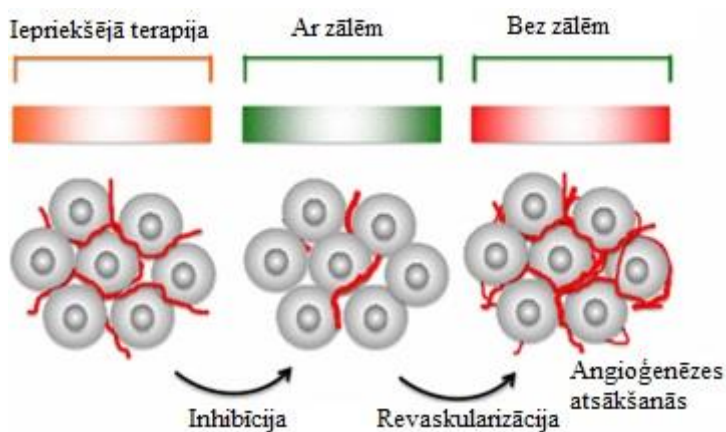
Teorētiski antiangiogēneses zāles ar plaša spektra iedarbību būtu vēlamākas un, iespējams, efektīvākas vēža ārstēšanā, jo ļaundabīgie audi ir heterogēni, ar dažādām audzēja šūnu populācijām, kas producē daudz un dažādus angiogēnos faktorus. Šajā gadījumā TKI būtu vairāk piemēroti nekā monoklonālās antivielas, kas mērķētas tikai uz atsevišķiem VEGF signālceļiem. Bet klīniskie pētījumi liecina, ka TKI ne vienmēr ir efektīvāki par monoklonālajām antivielām. Tie uzrādā arī dažādus profilus toksicitātē, kā arī monoklonālajām antivielām ir ilgāks pusizvadīšanās periods nekā ķīmiskajām molekulām (Cao Y., 2016).

No sākuma tika uzskatīts, ka uz VEGF signālceļiem mērķētās terapijas nebūs toksiskas. Tomēr klīnisko pētījumu rezultātā tika atklātas daudz blakusparādības – hipertensija, proteīnūrija, pavājināta brūču dzīšana, GI perforācija, hemorāģijas, trombozes, leikoencefalopātijas, kardiotoksicitāte un endokrīnā disfunkcija. Ar lielāko daļu no šīm blakusparādībām var tikt galā rutīnas veidā, bet pārmērīga toksicitāte var radīt nepieciešamību taisīt pārtraukumus ārstēšanas kursā, veikt devu samazināšanu vai pat pilnībā pārtraukt kursu (Vasudev *et al.*, 2014).

Preklīniskajos pētījumos ir novērots, ka sistēmiskas ārstēšanas rezultātā tiek ierosinātas vaskulāras pārmaiņas ne tikai audzējos, bet arī citos audos un orgānos. Piemēram, pelēm sistēmiska antiangiogēneses terapija izraisīja ievērojamu regresiju ~ 70% mikroasinsvadiem vairogdziedzerī, bet mazākā apjomā citos endokrīnajos orgānos (virsnieru dziedzeros, aizkuņģa dziedzeru salīnās, aknāsm nierēs un GI sienā) (Cao Y., 2016).

Ir novērots, ka antiangiogēneses līdzekļi var izraisīt vazoinvāziju audzēja šūnās, kas noved pie metastāžu veidošanās un saīsinātu dzīvildzi pelēm. Iespējams, ka šajā procesā ir iesaistīts audzēja mikrovides aizsargmehānisms, kas var novest līdz vēl agresīvākam un invazīvākam audzēja fenotipam (Sounni *et al.*, 2013).

Preklīniskie un klīniskie dati uzrāda, ka, ja VEGF mērķētā terapija tiek pārtraukta, audzēja asinsvadi var atjaunoties un veicināt audzēja ataugšanu (Vasudev *et al.*, 2014).



1.7.att. Efekts ar terapiju un pēc terapijas pārtraukšanas audzēja vaskularizācijas procesā (attēls ar izmaiņām no Cao Y., 2016)

Tas rosina domāt, ka VEGF terapija būtu jāveic ilgtermiņā, lai sasniegtu maksimālo terapeitisko labumu (Vasudev *et al.*, 2014). Šobrīd gan nav saskaņotu uzskatu par to cik ilgi būtu jāveic angiogenēzes terapija, jo antiangiogenēzes aģents tiek pielietots pēc ķīmijterapijas vai tās laikā. Tāpat arī šīs terapijas laikā visticamāk, ka sāksies adversie efekti, kuru dēļ terapija būs jāatliek. Arī rezistences rašanos nedrīkst izslēgt no riska faktoriem, kuru dēļ jāpārtrauc terapija (Cao Y., 2016).

Pēdējo gadu laikā diskusijas ir augušas saistībā ar antiangiogenēzes terapiju, jo lielākai daļai pacientu netiek novērota atbildes reakcija (Sounni *et al.*, 2013., Cao Y., 2016). Pacientiem ar aizkuņģa dziedzera vēzi un krūts vēzi antiangiogenēzes terapija nav devus īpašus uzlabojumus vispārējā dzīvildzē (Sounni *et al.*, 2013).

Kā arī ir novērota novirze starp preklīniskajiem un klīniskajiem datiem (Sounni *et al.*, 2013). Ir ļoti daudz jautājumu tieši par darbības mehānismiem, piemēram, ja visu solīdo vēžu augšana ir atkarīga no angiogenēzes, tad kāpēc antiangiogenēzes terapijas nav veiksmīgas? (Cao Y., 2016)

Šobrīd notiek tālāka antiangiogenēzes zāļu vielu attīstīšana un optimizācija. Domājams, tos varētu izmantot kā palīglīdzekļus adjuvantu vai neoadjuvantu terapijā, kas kombinēta ar tradicionālo citotoksisko ķīmijterapiju (Sounni *et al.*, 2013). Adjuvantu terapijā tos varētu izmantot pēc ķirurģiskās iejaukšanās, kad audzējs ir izņemts, lai novērstu recidīvu vai mikrometastātisko audzēju izveidošanos (Vasudev *et al.*, 2014). Bet neoadjuvantu terapijā tos varētu izmantot, lai samazinātu audzēja izmērus un pārveidotu neresekcējamu bojājumu uz resekcējamu. Otrkārt, tas varētu samazināt iespēju lokālam recidīvam un metastāzēm (Vasudev *et al.*, 2014).

Antiangiogenēzes līdzekļi, kas tiek pielietoti klīnikā, centrējas uz VEGF signālceļa blokādi, bet tādus VEGF – neatkarīgos angiogenēzes faktoros, kā fibroblastu augšanas

faktorus, angiopoetīnu, placentas augšanas faktoru, matriksa metalloproteāzes (MMPs) un starpšūnu matriksa molekulas, ir vērts pētīt tālāk (Sounni *et al.*, 2013).

### 1.6.2. Pretiekaisuma terapija

Iekaisums ir kļuvis par vienu no mērķiem pretvēža terapijas (Rayburn *et al.*, 2009) un preklīniskie pētījumi rāda par labu pretiekaisuma zāļu lietošanai vēža attīstības aizkavēšanai un terapijai.

Audzēju veicinošie ikaisuma inhibitori ir veidoti, lai:

a) inhibētu signālu devējus un transkripcijas faktoros, kas mediē izdzīvošanu un augšanu, piemēram, kodola faktoru NF- $\kappa$ B vai signālu devējus un aktivētājus no transkripcijas 3 (STAT3);

b) inhibētu audzēju veicinošos hemokīnus un citokīnus, kas veicina audzēja infiltrāciju ar iekaisuma šūnām, kā IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  vai receptoru anatagonistus mērķējot C-C hemokīnu receptoru tipiem 2 un 4 un CXC hemokīnu receptoru tipam 4.

c) iznīcinātu protumorigēnās imūnsistēmas un iekaisumu regulējošās šūnas, kā piemēram, mieloīdās supresoršūnas un makrofāģus.

Daži pretiekaisuma līdzekļi uzrāda samazinātu audzēja sastopamības biežumu, ja tos lieto kā profilakses līdzekļus. Novērots arī, ka samazinās audzēja progresēšana un mirstība, ja pretiekaisuma līdzekļus lieto terapijas nolūkiem. Daudzi pretiekaisuma aģenti var pārveidot pašu audzēju vai tā mikrovidi, samazinot šūnu migrāciju, veicinot apoptozi un jutīgumu pret citām terapijām (Rayburn *et al.*, 2009). Epidemioloģiskie dati uzrāda, ka krūts, kolorektālā un plaušu vēža gadījumi apgriezti proporcionāli saistīti ar aspirīna un **nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu (NPL)** lietošanu (Sounni *et al.*, 2013, Rayburn *et al.*, 2009). Turklāt, pacientem ar kolorektālo vēzi, kuri ilgstoši lietoja NPL, tik novērota daudz zemāka mirstība nekā tiem, kuri nelietoja NPL. Līdzīgi rezultāti tika novēroti arī plaušu vēža slimniekiem. Tomēr arī NPL nav efektīvi visiem vēžu gadījumiem. Tā, piemēram, olnīcu vēža gadījumu netika novērota vēža regresija pacientiem, kas lietoja NPL 10 gadus un ilgāk. Lai arī ir novērota nozīmīga korelācija starp NPL lietošanu un samazināto incidenci primāriem un atkārtotiem vēža gadījumiem un samazinātas mirstību gadījumiem, tomēr to efektivitāti ietekmē deva, to lietošanas ilgums, vēža tips (Rayburn *et al.*, 2009).

**Ciklooksigenāzes – 2 (COX – 2) inhibitori** (Sounni *et al.*, 2013) ir selektīvāki NPL un tiem ir mazāks risks izraisīt kairinājumu GI traktā. COX-2 tiek pārlietu ekspresēts daudzos premalignantos, malignantos un metastātiskos vēžos un to ekspresivitātes stiprums korelē ar invazivitāti. Farmakoloģiskajos pētījumos ir noskaidrots, ka COX-2 inhibitori atkarībā no to devas inhibē audzēja augšanu un metastazēšanos. Un tie pat varētu darboties sinerģiski ar

šobrīd izmantotajiem citotoksiskajiem aģentiem (Koki *et al.*, 2002). Klīniskajos pētījumos ir secināts, ka, piemēram, celekoksibs izraisa adenomas samazināšanos un tas mudināja FDA apstiprināt celekoksibu adjuvantu terapijai. Pētījumos novērots, ka celekoksibam varētu būt aktivitāte pret citiem vēžu veidiem, piemēram, olnīcu vēzi (Rayburn *et al.*, 2009).

**Kortikosteroīdi** visbiežāk tiek lietoti, lai samazinātu ķīmijterapijas izraisītos blakusefektus un radiācijas sekas. Bet arī tie uzrāda pretvēža aktivitāti gan lietojot atsevišķi, gan kopā ar ķīmijterapijas aģentiem. Piemēram, deksametazons samazināja plaušu vēža gadījumus par 60% pelēm, kas tika pakļautas tabakas dūmu iedarbībai. Tāpat arī tika novērots sākotnēja ārstēšana ar deksametazonu var uzlabot efektu konvenciālajām terapijām pret dzīvnieku gliomām, atī krūts, plaušu un resnās zarnas vēžiem. Deksametazons spēj novērst estrogēna atkarīgo krūts vēža augšanu antagonizējot estrogēna sulfotransferāzi. Citi glikokortikoīdi, piemēram, hidrokortizons un prednizons, arī uzrāda spēju samazināt vēža šūnu augšanu *in vitro* un samazina audzēju augšanu ksenografta modelī *in vivo* (Rayburn *et al.*, 2009).

Tomēr, NPL ir nespecifiski un un to lietošana vēža ārstēšanai un profilaksei ir strīdīga (Sounni *et al.*, 2013., Rayburn *et al.*, 2009). Tie neuzrāda nozīmīgu klīnisko priekšrocību lietošanai, kā arī blakusefektī uzrāda GI toksicitāti un kardiotoxicitāti. Tieši kardiotoxicitātes dēļ daudzi no COX-2 inhibitoriem ir atsaukti no lietošanas (Rayburn *et al.*, 2009).

Daži NF-kB vai STAT3 inhibitori palielina terapeitisko efektu ārstējot kaulu metastāzes prostatas vēža gadījumā, bet ilgstoša NF-kB inhibēšana var novest līdz smagiem blakusefektīem, ko izraisa aknu bojājumi un imūnnepietiekamība, izraisot neitrofiliju un palielinot akūto iekaisumu, kas saistīts ar pastiprināto IL-1  $\beta$  sekrēciju.

Tieši šie blakusefektī ir kavējuši NF-kB un IKK $\beta$  (NF-kB kināzes apakšvienība  $\beta$ ) inhibitorus attīstīt klīniskai lietošanai.

Zāles, kas mērķētas uz citokīniem, piemēram, anti-IL-6 un anti – TNF $\alpha$ , dažos vēža gadījumos ir parādījuši nelielu pozitīvu terapeitisko efektu ar daļēju atbildes reakciju.

Preklīniskajos pētījumos ir novērots, ka anti-RANKL antivielas inhibē kaulu metastāzes prostatas un krūts vēža gadījumos un IL-1 inhibīcija bloķēja mielomas progresiju.

Lai gan, mērķētie citokīni, hemokīni un transkripcijas faktori, ir uzrādījuši interesantus rezultātus preklīniskajos pētījumos, tomēr to potenciāls kā vienīgajiem aģentiem, ārstējot vēzi cilvēkiem, ir limitēts. Šo aģentu kombinācijas ar citiem mērķiem ir vajadzīgi klīniskajiem pētījumiem, lai nodrošinātu to efektivitāti un ierobežotu to blakusefektus (Sounni *et al.*, 2013).

### 1.6.3. CAF kā terapijas mērķis

CAF ir ģenētiski stabilāki, ja salīdzina ar audzēja šūnām un imunosupresīvajiem komponentiem audzēja mikrovīdē. Tieši tas padara tos pievilcīgus kā mērķus pretaudzēja terapijā (Qui *et al.*, 2016).

CAF ekspresē ar membrānu saistītas serīna proteāzes, ko sauc par fibroblastu aktivējošo proteīnu  $\alpha$  (FAP $\alpha$ ), ko nevar atrast normālos fibroblastos (Sounni *et al.*, 2013).

FAP ekspresēšana ir saistīta ar sliktākām prognozēm dažiem vēžu tipiem, piemēram, resnās zarnas, olnīcu, aizkuņģa dziedzera un hepatocelulāro karcinomu gadījumos, bet ne krūts vēža gadījumā.

Imunohistoķīmiskie pētījumi rāda, ka FAP galvenokārt lokalizējas stromā blakus audzēja šūnām, bet nav sastopamas stromā pie normāliem audiem. Šī īpašība padara to par pievilcīgu kandidātu audzēju mērķētajām terapijām.

I un II stadijas pētījumi, mērķējot monoklonālās antivielas uz FAP, nav izdevušies, kā arī mēģinājumi bloķēt enzimatisko aktivitāti FAP, rezultējās ar zemāku izdzīvošanas iespēju plaušu vēža pacientiem. Balstoties uz šiem konfliktējošajiem datiem, kas iegūti mērķējot audzēja mikrovidē tieši uz FAP, alternatīva varētu būt, izmantojot FAP enzimatisko aktivitāti, aktivēt citotoksiskas pro-zāles (Sounni *et al.*, 2013).

Vēl ir iespēja izmantot DNS vakaīnas, kas ir mērķētas uz cilvēka FAP $\alpha$ . To darbības mehānisms balstās uz to, ka tās samazina audzēja augšanu producējot FAP $\alpha$  – specifisku citotoksisko T limfocītu atbildi, kas nogalina CAF un tādā veidā samazinās arī FAP $\alpha$  ekspresija, kam tālāk seko pavājināta colagēna I un citu stromālo faktoru ekspresija (Qui *et al.*, 2016).

Henry *et al.* ziņoja, ka stromālais FAP ir labāk novērojams agrīnā stāvoklī kolorektālajam vēzim un mazākiem kolorektāliem audzējiem. Palielināts FAP daudzums ir nelabvēlīgas zīmes indikators pacientiem ar attīstītu metastātisko vēzi. Pētījumi ierosina, ka FAP inhibīcijai vajadzētu notikt audzēja agrīnajā stāvoklī, kad FAP līmenis ir lielāks. Darba galvenais mērķis bija izpētīt audzēja sekretēto EV ietekmi un MCš diferenciaciju CAF šūnās, jo šīs zināšanas pavērtu jaunas iespējas CAF mērķētu terapeitisko līdzekļu izpētei un izstrādei (Henry *et al.*, 2007, Rui *et al.*, 2012).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Izmantotie materiāli un iekārtas

#### Iekārtas:

Analītiskie svāri WTB 200, RADWAG

ELISA mikroplašu lasītājs TECAN Infinite ® 200 PRO, Tecan Group Ltd

#### Materiāli:

96 lauciņu platīte, Nunc

8 kanālu mikropipete, Finpipette

1 kanāla mikropipete

Vienreiz lietojami pipešu uzgaļi, Sarstedt

Vienreiz lietojamie Ependorfa stobriņi (1,5 mL), Sarstedt

#### Reāģenti:

Fosfāta sāļu buferšķīdums (10x nesterils) (PBS) kat. Nr. P7059;

Liellopa seruma albumīns (BSA), Fraction V, ≥96% kat. Nr. A9647 – 100G;

Tween ® 20 kat. Nr. P2287;

DuoSet ® ELISA *Human VEGF* kat. Nr. DY293B-05, R&D systems;

DuoSet ® ELISA *Human CXCL8/ IL-8* kat. Nr. DY208-05, R&D systems;

Substrāta reāģenta komplekts, *Glo Substrate Reagent Pack (Reagent A & B)*, R&D systems

Mezenhimālās cilmes šūnu līniju D76 un D60 kultivēšanas šķīdumi tika saņemti no LU MF zin. asistentes Mg. farm. Inetas Popēnas.

No kolorektālā audzēja šūnu līnijām SW480, SW620 hipoksijā un normoksijā iegūtās EV tika saņemtas no prof. Aijas Linē grupas Biomedicīnisko Pētījumu un studiju centrā un nosauktas EV 480N, EV 480H, EV 620N, EV620H.

### 2.2. IL-8 un VEGF ELISA tests

#### 2.2.1. Šķīdumu pagatavošana

##### PBS 1x šķīdums

Ņem 50 mL 10x PBS un pievieno 950 mL destilētu ūdeni, lai iegūtu 1x PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 – 7,4 ).

##### Skalošanas buferšķīdums

0,05% Tween ® 20 PBS šķīdumā. Uz 50 mL PBS šķīduma ņem 0,025 mL Tween ® 20, pH 7,2 – 7,4.

### **Bloķēšanas buferšķīdums**

1% BSA PBS šķīdumā. Ņem 0,5 g BSA un izšķīdina 50 mL PBS šķīduma

### **Reaģenta šķīdinātājs**

0,1% BSA, 0,05% Tween ® 20 *Tris – buffered Saline* (20 mM Trizma base, 150 mM NaCl).

0.05g BSA šķīdinājām 50 mL PBS.

### **Substrāta šķīdums**

Sajauc krāsu reaģentu A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ar krāsu reaģentu B (Tetrametibenzidīns) attiecība 1:1.

### **Stop šķīdums**

Tiek izmantota 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## 2.2.2. Reaģentu pagatavošana

### **Primārā antiviena (*Capture antibody*)**

720µg/ mL peļu antivielu pret cilvēka IL-8 atšķaida līdz darba koncentrācijai PBS šķīduma - 4µg/ mL. Tiek ņemts 60µL reaģenta un šķīdināts uz 12 mL PBS

### **Sekundārā antiviena (*Detection antibody*)**

Biotinilēta kazas antiviena pret cilvēka IL-8 atšķaida līdz darba koncentrācijai reaģenta šķīdinātājā, ņemot 20 µL reaģenta un šķīdinot 980 µL reaģenta šķīdinātāja.

### **Standarta šķīdums**







Pie cilvēka rekombinantā IL-8 (100 ng/ mL) pievieno 0,5 mL destilēta ūdens un veic divkārtu atšķaidījumu ar sākuma koncentrāciju 2000 pg/ mL.

### **Streptavidīns – HRP**

Pudelīti ar streptavidīna konjugātu ar mārrotku peroksidāzi atšķaida līdz darba koncentrācijai.

## 2.2.3. Darba gaita

### Atšķaidījuma shēma standarta paraugiem

	500µL	500µL	500µL	500µL	500µL	500µL
						
2000 pg/ mL	1000 pg/ mL	500 pg/ mL	250 pg/ mL	125 pg/ ml	62,5 pg/ mL	31,3 pg/ mL

Lai izveidotu standartlīkni ar 7 atskaites punktiem, ņem 7 stobriņus. Pirmajā stobriņā pievieno 1000 µL iepriekš sagatavotā rekombinantā IL-8 standarta šķīdumu ar koncentrāciju 2000 pg/ mL, pārējos stobriņos pievieno 500 µL destilēta ūdens. Tālāk tiek veikta standarta šķīduma divkārtā atšķaidīšana – no pirmā stobriņa ņem 500 µL šķīduma un pievieno otrajam

stobriņam, tad no otrā stobriņa atkal tiek ņemti 500  $\mu\text{L}$  šķīduma un pievienoti trešajam stobriņam. Divkārho atšķaidīšanu kopā veic 6 reizes, lai visi stobriņi saturētu rekombinantā IL-8standarta šķīduma daļu.

#### ELISA eksperimenta plates dizains 96-lauciņu platē

	1	2	3	4	5	6
A	2000 pg/ mL	2000 pg/ mL	D76 Neg	D76 Neg	D6 620N	D6 620N
B	1000	1000	D76 480N	D76 480N	D6 620H	D6 620H
C	500	500	D76 480H	D76 480H		
D	250	250	D76 620N	D76 620N		
E	125	125	D76 620H	D76 620H		
F	62,5	62,5	D6 Neg	D6 Neg		
G	31,3	31,3	D6 480N	D6 480N		
H	kontrolē	kontrolē	D6 480H	D6 480H		

#### Plates sagatavošana

Līdz darba koncentrācijai atšķaida primārās antivielas šķīdumu PBS šķīdumā, bez nesējproteīna. Nekavējoties pārklāj 96 lauciņu plates katru lauciņu ar 100  $\mu\text{L}$  atšķaidītā primārās antivielas šķīdumu. Noslēdz plati un inkubē istabas temperatūrā uz nakti.

Nākamajā dienā plates tiek 3 reizes pēc kārtas rūpīgi izskalotas ar skalošanas buferšķīdumu. Ar 8 kanālu pipeti, katru lauciņu piepilda 300  $\mu\text{L}$  skalošanas buferšķīduma. Pēc katras skalošanas reizes plati kārtīgi nosusina ar papīra dvieli, lai pilnībā atbrīvotos no skalošanas buferšķīduma.

Plati bloķē, izmantojot bloķēšanas buferšķīdumu. Izmantojot multikanālu pipeti, katrā lauciņā iepilda 300  $\mu\text{L}$  bloķēšanas buferšķīduma. Inkubē istabas temperatūrā vismaz uz 1 stundu.

Šķīdumu izlej no plates un atkārti mazgāšanas procesu 3 reizes.

#### Noteikšanas procedūra

Katrā lauciņā reaģenta šķīdumam pievieno 100 $\mu\text{L}$  parauga. Pārklāj ar adhezīvo plēvēti un inkubē istabas temperatūrā uz 2 stundām. Pēc 2 stundām šķīdumu nolej un veic mazgāšanas procedūru, kā tas norādīts pie plates sagatavošanas. Pēc tam katram lauciņam pievieno 100  $\mu\text{L}$  sekundāro antivieli, kas izšķīdināta reaģenta šķīdumā. Plati pārklāj ar

adhezīvo plēvīti un inkubē istabas temperatūrā uz 2 stundām. Kad inkubācijas laiks pagājis, lieko šķidrumu izlej un atkārti mazgāšanās procedūru tā, kā tas norādīts pie plates sagatavošanas. Tad katrā lauciņā iepilda 100  $\mu$ L Streptavidīna – HRP šķīduma. Nosedz plati ar adhezīvo plēvīti un inkubē uz 20 min istabas temperatūrā, tumšā vietā. Pēc 20 min šķidrumu izlej un atkārti mazgāšanās procedūru tā, kā tas norādīts pie plates sagatavošanas. Pēc tam katrā lauciņā iepilda 100 $\mu$ L substrāta šķīduma. Plati nosedz ar plēvīti un inkubē uz 20 min istabas temperatūrā, tumšā vietā. Pēc tam katram lauciņam pievieno 50 $\mu$ L *Stop* šķīduma. Lai nodrošinātu šķīdumu sajaukšanos, plātīti viegli pakrata. Novērojama krāsu maiņa uz dzeltenu. Tad katram lauciņam nosaka optisko blīvumu, izmantojot mikroplašu lasītāju TECAN Infinite® 200 PRO, pie viļņu garuma 450 nm.

### 2.3. Datu apstrāde

Vispirms tika aprēķināta vidējā absorbcija un standartnovirze katram dublikātam. Pēc iegūtajiem datiem tika konstruētas divas standartlīknes, kur uz x ass atrodas IL-8 koncentrācija (pg/mL) un VEGF koncentrācijas (pg/mL), bet uz y ass atrodas optiskā blīvuma (OB) vērtības. Caur iegūtajiem punktiem tika novilkta tendences līkne un noteikts taisnes vienādojums. Iegūtos datus tālāk analizēja izmantojot programmas *Microsoft Excel 2010* un *GraphPadPrism 7.0*. Lai noteiktu statistisko ticamību iegūtajiem rezultātiem, tika izmantoti One-way ANOVA tests un t – tests. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski ticamiem, ja  $p < 0,05$ .

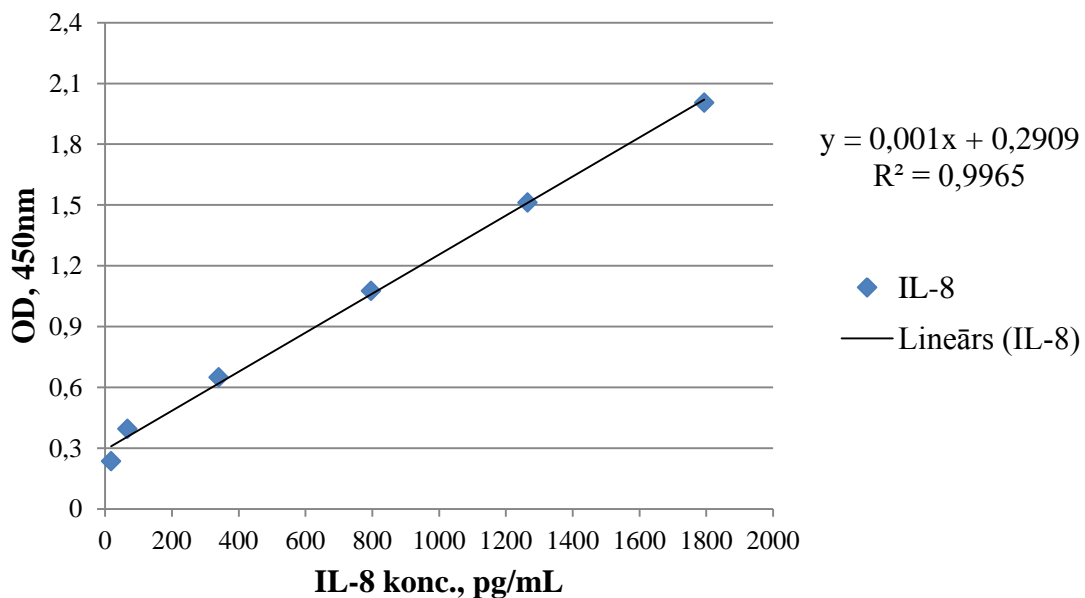
### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 1.1. IL-8 un VEGF standartlīknes uzņemšana

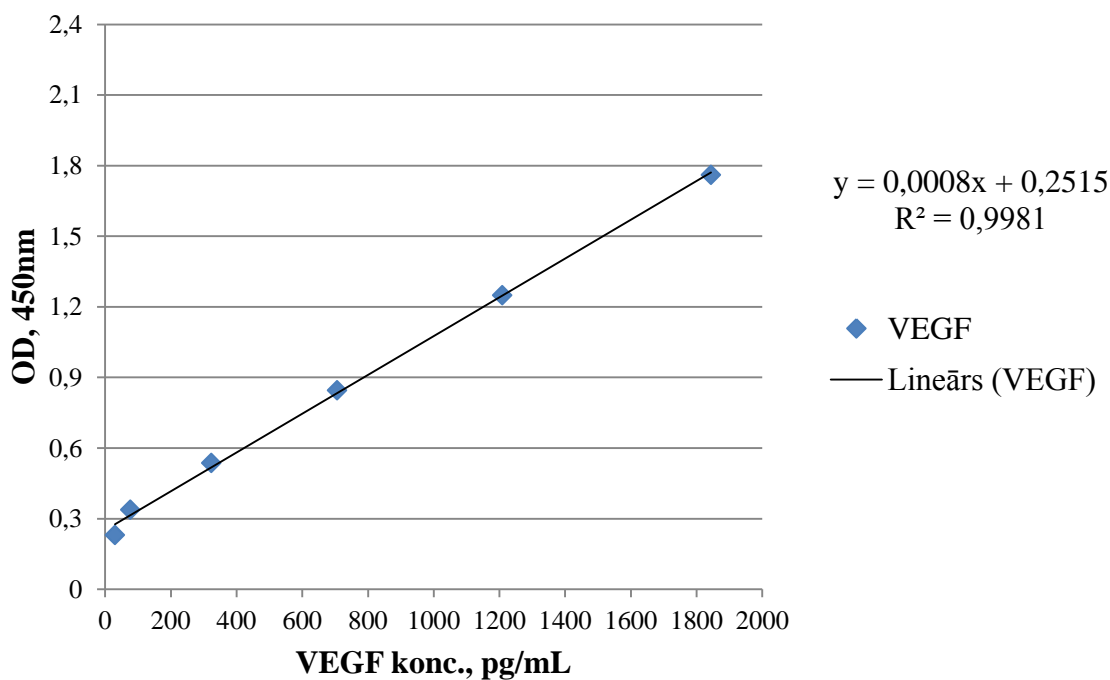
Izmantojot VEGF un IL-8 reaģentu komplektus, lai noskaidrotu esktarcelulāro vezīkulu izraisītās izmaiņas citokīnu sekrēcijā no ādas iegūtajās MCš. Optisko blīvumu pie viļņu garuma 450 nm uzņēma ar iekārtu TECAN Infinite® 200 PRO. Optiskā blīvuma vērtības tika apkopotas un nolasītas ar Magellan programmu.

Izmantojot Microsoft Excel 2010 tika konstruēta IL-8 un VEGF standartlīknes un noteikti taisnes vienādojumi (skat. 3.1. att., 3.2. att.). Standartlīknes vērtība bija robežās no 31,3 pg/mL līdz 2000 pg/mL. Taisnes vienādojumu rezultāti  $R^2$  apliecina, ka metode ir izpildīta pareizi. Jo  $R^2$  vērtība tuvāka 1, jo precīzāks ir gala rezultāts.

Redzams, ka iegūtās vērtības nedaudz atšķiras no standartlīknes pagatavošanas laikā veiktajiem aprēķiniem. Tas var būt saistīts ar precizitātes kļūdām, piemēram, neprecīzi atšķaidījumi, nepilnīgi izskalota plate skalošanas laikā.



3.1.att. IL-8 standartlīkne



### 3.2.att. VEGF standartlīkne

#### IL-8 ekspresija MCš

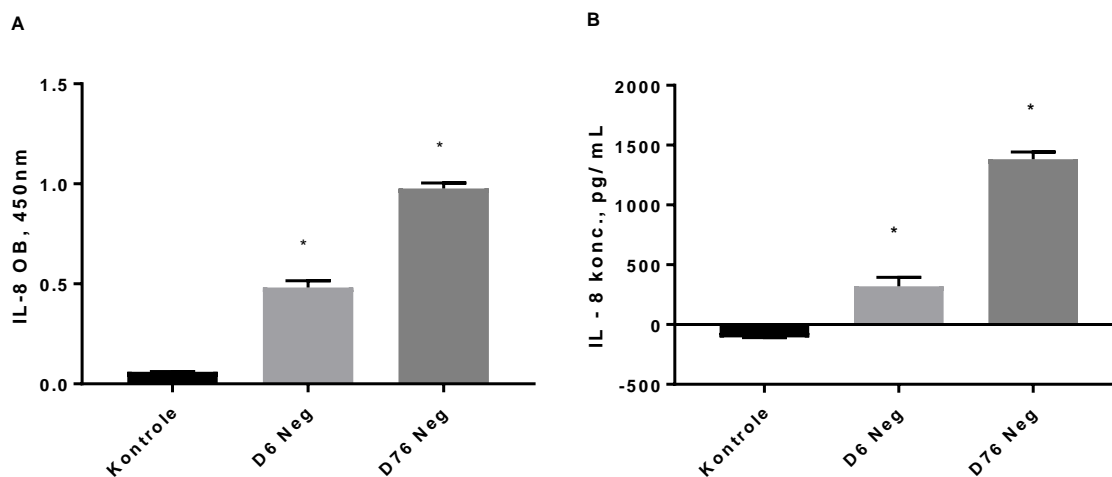
MCš ir šūnas, kas var sekretēt simtiem dažādu faktoru, lai nodrošinātu šūnu augšanu un attīstību. Bet tikai pavisam nesen ir atklāts, ka tās var tik ietekmētas caur audzēja sekretētajām EV. Audzēja EV spēj tās pārveidot tā, ka MCš maina savu darbības virzienu un sāk sekretēt dažādus faktorus, lai veidot audzēja attīstībai nepieciešamo vidi un nodrošinātu audzēja progresiju. Viens no aktīvāk sekretētajiem faktoriem, audzēja šūnu iedarbības rezultātā, ir IL-8 (Wang *et al.*, 2015).

IL-8, kas zināms arī kā CXCL8, ir hemokīns, kas var iedarboties ne tikai uz leukocītu hemotaksi vai iekaisuma atbildi un infekciju slimībām, bet arī var iedarboties uz endoteliālajām šūnām un caur to receptoriem veicināt šūnu migrāciju, invāziju un proliferāciju, kā arī angiogēnēzi audzēja šūnās *in vivo* (Vaugh *et al.*, 2008, Ning *et al.*, 2011).

IL-8 piemīt proangiogēneses spējas un tas ir apstiprinājies jau vairākos pētījumos, piemēram, olnīcu, plaušu, krūts, kuņģa un kolorektālā vēža gadījumos (Verbeke *et al.*, 2011, Pecot *et al.*, 2013, Ning *et al.*, 2011).

Mūsu eksperimentā tika apskatīta kolorektālā audzēja SW480 un SW620 šūnu līniju sekretēto EV iedarbība uz citokīnu sekrēcijas izmaiņām D6 un D76 ādas MCš. Iegūtie rezultāti tiek attēloti ar citokīnu sekrēcijas optisko blīvumu (OB) pie viļņu garuma 450 nm un citokīnu sekrēcijas vidējo koncentrāciju (pg/ mL) un analizēti programmā *GraphPad Prism 7.0*.

Vispirms tika novērota IL-8 ekspresija MCš paraugos D6 Neg un D76 Neg, kas netika stimulētas ar EV no audzēja šūnu līnijām. Novērojams, ka abas MCš līnijas sekretē IL-8 nestimulētā stāvoklī. Starp iegūtajiem rezultātiem ir novērojama statistiski ticama atšķirība salīdzinājumā ar kontroli (šūnu kultūru barotne) ( $p < 0,001$ ; one – way ANOVA) (skat 3.3. att.).



### 3.3.att. IL-8 sekrēcija D6 Neg un D76 Neg pret kontroli; $p < 0,001$ ; One – way ANOVA

\*  $p < 0,001$  Nestimulēto MCš D6 Neg un D76 Neg paraugi pret kontroli; One – way ANOVA

### VEGF ekspresija MCš

Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors (VEGF) tiek producēts daudzās šūnās, piemēram, audzēja šūnās, makrofāgos, trombocītos, keratinocītos u.c. VEGF aktivitāte nav limitēta tikai ar vaskulāro sistēmu. Tas var arī piedalīties normālās fizioloģiskajās funkcijās, piemēram, kaulu formēšanā, hematopoēzē, brūču dziļšanā un attīstībā (Duffy *et al.*, 2013). Arī audzējā VEGF galvenā loma ir angiogēnēze un vaskulārā caurlaidība, bet tas nav viss. VEGF medītētie signāli ietekmē pašu tumoriģenēzi un atbild par audzēja cilmes šūnu funkcijām un audzēja iniciāciju (Goel *et al.*, 2013).

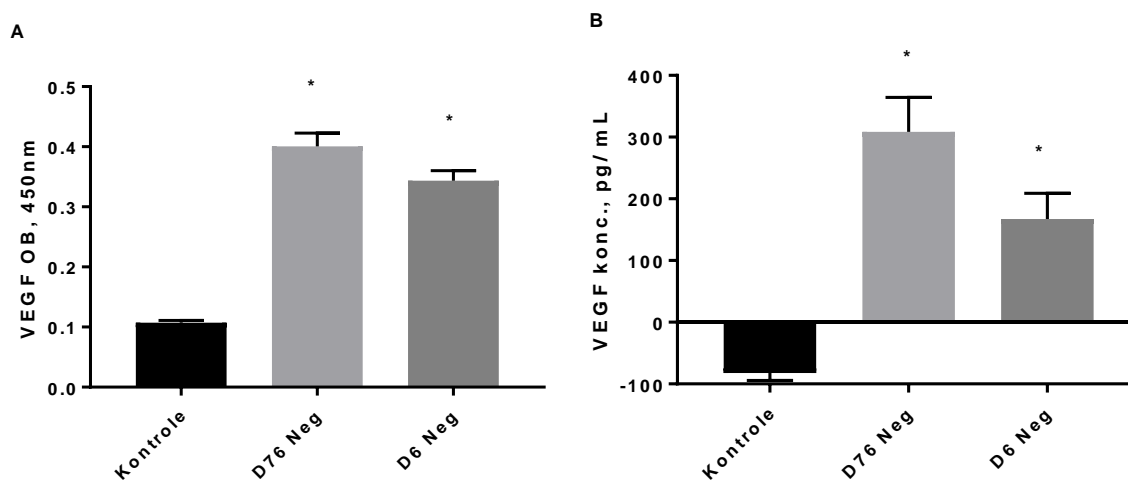
VEGF spēlē galveno lomu angiogēnēzes procesā. Kagiwada *et al.* savā pētījumā demonstrēja, ka MCš spēj lielos daudzumos sekretēt VEGF (Kagiwada *et al.*, 2008).

Ir bijuši vairāki ziņojumi par to, ka MCš sekretē trofiskus faktorus, kas veicina šūnu izdzīvošanu (SDF -1, HGF, IGF – 1), šūnu proliferāciju (EGF, HGF, NGF, TGF –  $\alpha$ ) un audu angiogēnēzi (VEGF) (Rhee *et al.*, 2015).

Asinsvadi nodrošina audzējam barības vielu un skābekļa piegādi, kas rezultējas ar audzēja augšanu un metastāžu veidošanos. Vairāki pētījumi rosina domāt, MCš veicina

audzēja angiogēni caur to potenciālu diferencēties par endotēlijam līdzīgām šūnām jeb pericītiem, tāpat arī MCš spēja sekretēt trofiskos faktorus un proangiogēnos faktorus, augšanas faktorus, citokīnus un plazminogēna aktivatoru. VEGF un FGF – 2 ir divi galvenie vaskulogēnie faktori, ko sekretē MCš, kas ierosina audzēja neovaskularizāciju (Rhee *et al.*, 2015, Spaeth *et al.*, 2009).

Arī mēs, līdzīgi kā aprakstīts literatūrā, novērojām VEGF sekrēciju nestimulētu MCš paraugos D6 Neg un D76 Neg. Abiem paraugiem ir novērojama statistiski ticama atšķirība salīdzinājumā ar kontroli (šūnu kultūru barotne) ( $p < 0,001$ ; one – way ANOVA) (skat. 3.4.att.).



3.4.att. VEGF sekrēcija D76 Neg un D6 Neg pret kontroli ( $p < 0,001$  One – way ANOVA)

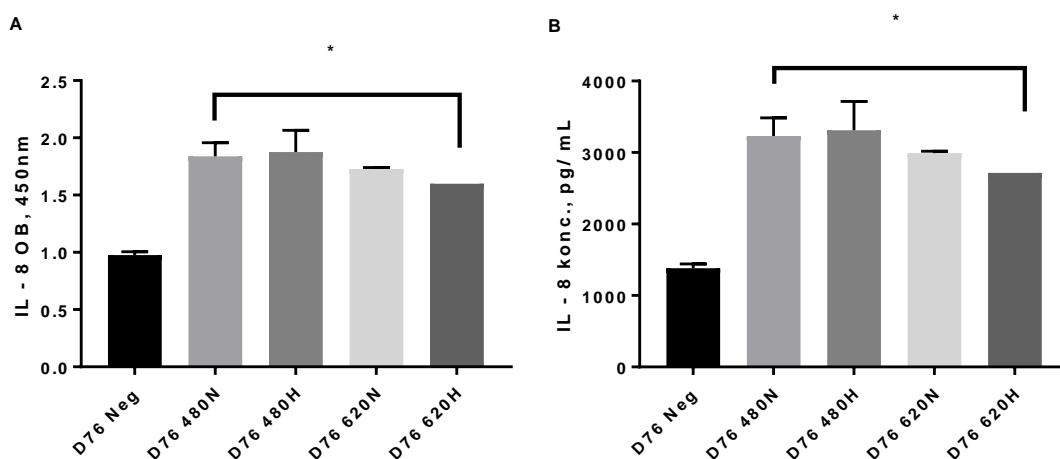
\*  $p < 0,001$  Nestimulēto MCš D76 un D6 paraugi pret kontroli; One - way ANOVA

### IL-8 ekspresija MCš, kad tās stimulē ar EV no audzēja šūnu līnijām SW480 un SW620

Pēc MCš stimulēšanas ar audzēja EV, tās parasti maina savu sekretēšanas profilu un sāk darboties audzēja labā. Tā, piemēram, Lindoso *et al.* savā pētījumā noskaidroja, ka pēc CSC – EV iedarbības uz MCš, tās mainīja savu sekretēšanas profilu, palielinot IL-8, osteopontīna un mieloperoksidāzes producēšanos (Lindoso *et al.*, 2015). Tas lika saprast, MCš, kas stimulētas ar CSC – EV, ir spējīgas veicināt audzēja augšanu, pastiprinot tā šūnu proliferēšanos un nodrošinot vaskularizācijas procesu. Lindoso *et al.* savā pētījumā arī pārliecinājās, ka ar EV nestimulētas MCš nebija spējīgas ierosināt audzēja augšanu, tādā veidā pierādot, ka uz MCš vispirms ir jāiedarbojas pašam audzējam vai tā mikrovidei, lai tās varētu sāk strādāt audzēja labā (Lindoso *et al.*, 2015). Tāpat arī Wysoczynski un Ratajezak savā pētījumā plaušu vēzi un tā sekretētajām EV noskaidroja, ka EV, kas tiek sekretētas no

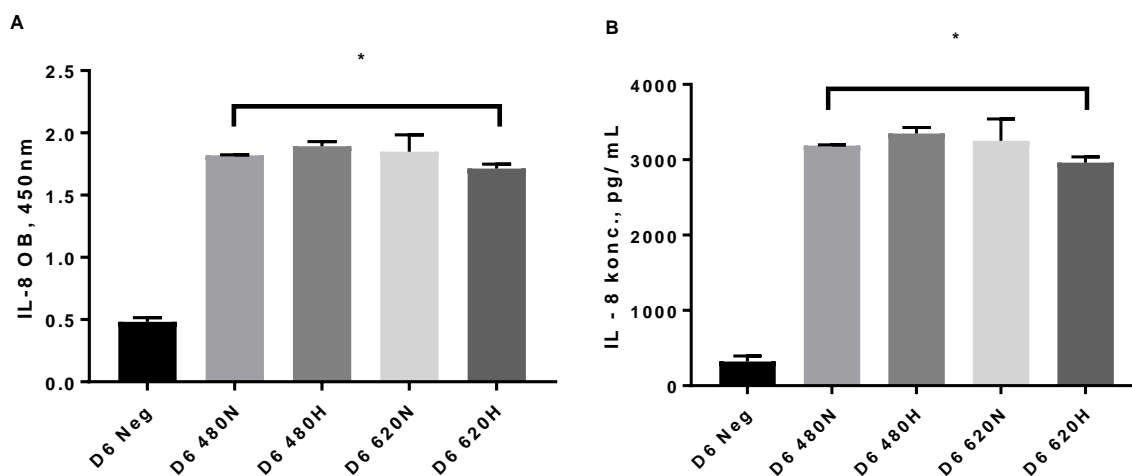
plaušu vēža, veicina angiogēnēzi, izraisot pārmaiņas stromas šūnās un palielinot proangiogēno faktoru ekspresiju, proti, IL-8, VEGF, OSM, MMP9 (Wysoczynski *et al.*, 2009).

Arī mēs savā eksperimentā noskaidrojām, ka audzēja sekretētās EV var pastiprināt citokīna IL-8 sekrēciju no MCš. 3.5. attēlā redzams, ka D76 MCš visos paraugos IL-8 sekrēcija ir palielinājusies, salīdzinot ar EV nestimulētajām D76 Neg MCš. Kā arī visos gadījumos ir novērojama statistiski ticama atšķirība salīdzinājumā ar kontroli ( $p < 0,05$ ; one – way ANOVA).



3.5.att. IL-8 sekrēcija D76 MCš paraugos salīdzinājumā ar kontroli ( $p < 0,05$ ; One – way ANOVA)

\*  $p < 0,05$  Ar EV stimulētie MCš D76 paraugi pret nestimulētajām D76 Neg šūnām; One – way ANOVA.



3.6.att. IL-8 sekrēcija D6 MCš paraugos salīdzinājumā ar kontroli ( $p < 0,001$ ; One – way ANOVA)

\*  $p < 0,001$  Ar EV stimulētās D6 MCš pret nestimulētajām D6 šūnām; One – way ANOVA

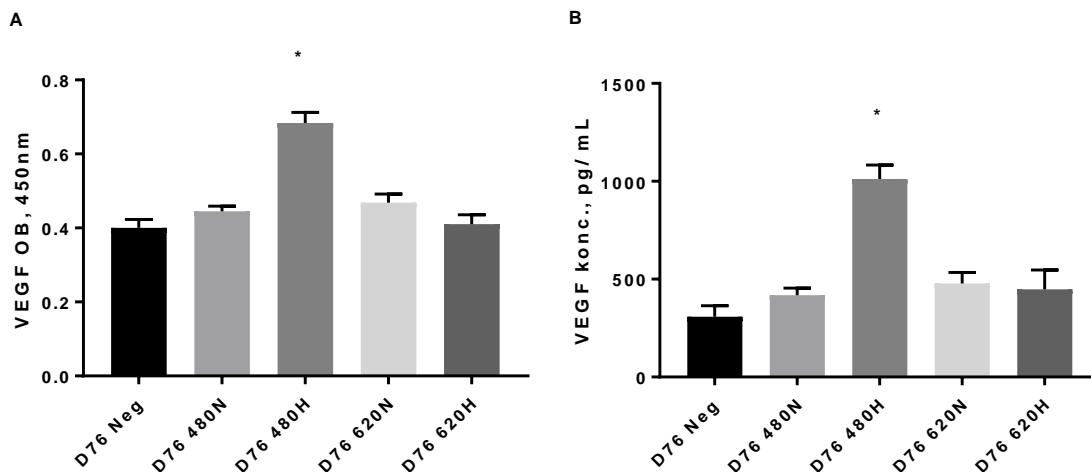
Tāds pats rezultāts ir novērojams arī D6 MCš paraugos. Citokīna IL-8 sekrēcija ir palielinājusies visos gadījumos, kad MCš tiek pievienotas abu audzēju šūnu līniju sekretētās EV (skat. 3.6.att.). Ir novērojama statistiski ticama atšķirība visos gadījumos ( $p < 0,001$ ; one – way ANOVA).

### **VEGF ekspresija MCš, kad tās stimulē ar EV no audzēja šūnu līnijām SW480 un SW620**

MCš piemīt spēja izsaukt angiogēnēzi audos, tādā veidā stimulējot audzēja augšanu. Vēža šūnām iedarbojoties uz MCš, tās tiek pārprogrammētas darboties audzēja labā. Spaeth *et al.* savā pētījumā demonstrēja, ka kultivējot kopā MCš un audzēja šūnas, notika pastiprināta VEGF sekrēcija no MCš gan *in vitro*, gan *in vivo* (Spaeth *et al.*, 2009). Tāpat arī Li *et al.*, izolējot MCš no kuņģa audzēja šūnām, novēroja, ka tās pastiprināti izdala proangiogēneses faktorus – VEGF, CXCL8 un CXCL2 (Li *et al.*, 2015). Beckermann *et al.* novēroja, ka MCš pastiprināti izdala VEGF hipoksijas apstākļos, kas ir bieži sastopama vide audzējos. Tieši hipoksiskie apstākļi audzējos noved līdz pastiprinātai VEGF ekspresijai un sekrēcijai (Beckermann *et al.*, 2008).

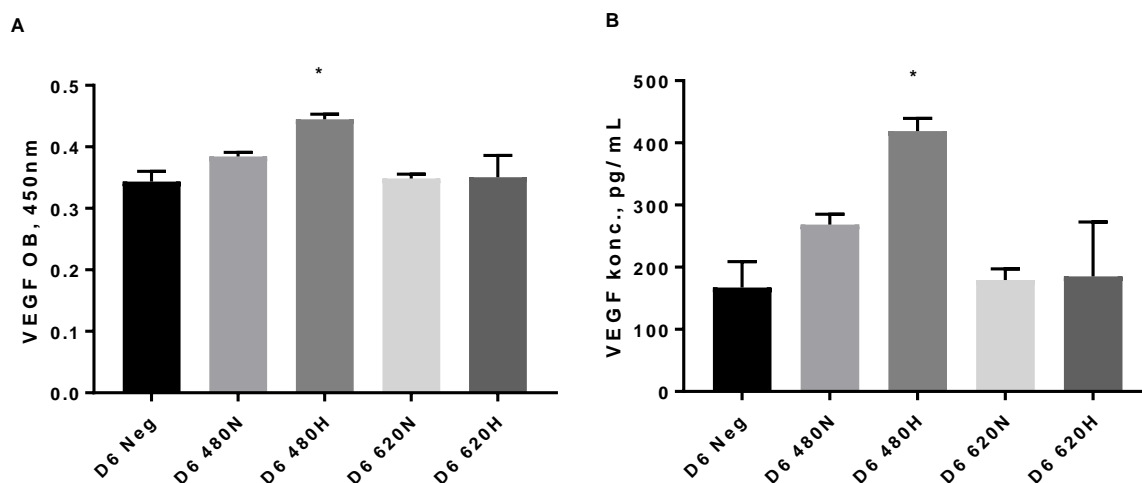
Šajā eksperimentā mēs novērojām kāda būs VEGF ekspresija MCš D76 un D6 paraugos, ja uz tiem iedarbosies ar EV, kas nākušas no primāra audzēja šūnām, kas augušas normoksijas apstākļos un hipoksijas apstākļos (480N un 480H), un metastātiska audzēja šūnām, kas arī audzētas gan normoksijas, gan hipoksijas apstākļos (620N un 620H).

Abos gadījumos, gan MCš D76, gan D6 paraugos ainas ir līdzīgas – VEGF sekrēcija ir palielinājusies ( $p < 0,001$ ; One – way ANOVA (skat. 3.7.att.);  $p < 0,05$ ; One – way ANOVA (skat. 3.8. att.)), bet abos gadījumos statistiski nozīmīgu ticamību uzrāda tikai 480H ekstracelulāro vezikulu pievienošana. Proti, D76 šūnu paraugos tas ir D76 480H ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests) un D6 šūnu paraugos tas ir D6 480H ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests).



3.7.att. VEGF sekrēcija D76 MCš paraugos ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests)

\*  $p < 0,05$  D76 480H pret D76 Neg; nesapārotais t tests



3.8.att. VEGF sekrēcija D6 MCš paraugos ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests)

\*  $p < 0,05$  D6 480H pret D6 Neg; nesapārotais t tests

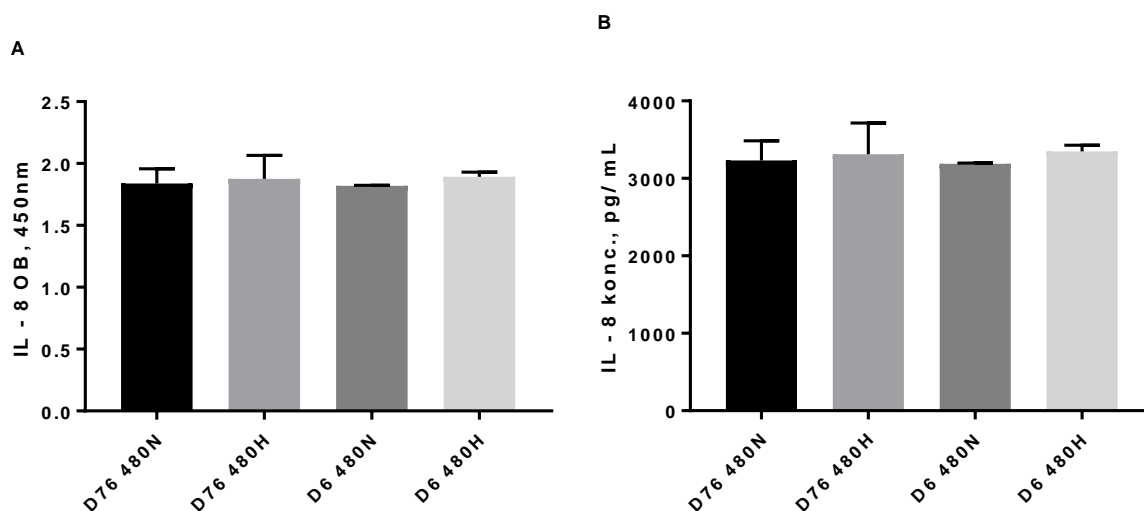
VEGF sekrēcija ir nozīmīgi palielinājusies tikai paraugos, kas tika stimulēti ar EV, kas nākušas no audzēja šūnu līnijas SW480, kura audzēta hipoksijas apstākļos.

### EV spēja izraisīt IL - 8 sekrēciju MCš atkarībā no audzēja vides

EV, kas nāk no hipoksiskām vēža šūnām, piemīt spēcīgāk izteikti proangiogēnes efekti, nekā EV, kas nākušas no normoksiskām vēža šūnām (Yamada, 2017). Huang *et al.* pētījumā noskaidroja, Wnt4 bagātākas ar EV, kas nākušas no hipoksiska CRC šūnām, nekā salīdzinot ar EV, kas nākušas no normoksiskām šūnām. Bet diemžēl šis fakts paliek neskaidrs

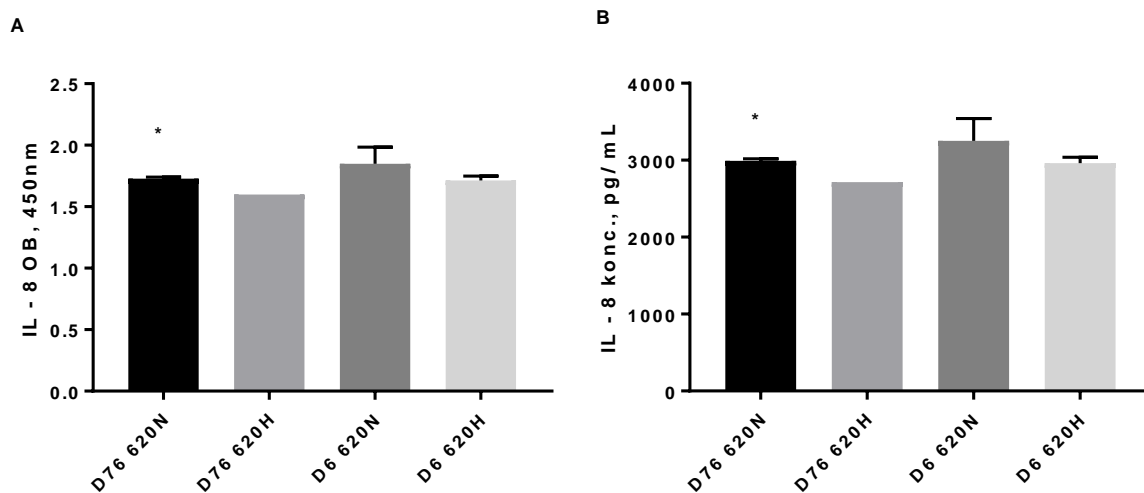
vai ir iespējams, ka šīs EV bija pilnas ar specifisku “kravu” (šajā gadījumā Wnt4) (Huang *et al.*, 2016).

Darbā apskatījām arī to vai ir atšķirība starp EV, kas nākušas no hipoksiskas un normoksiskas vides, iedarbībā uz MCš spēju sekretēt citokīnus. Pirmās apskatījām EV, kas nākušas no primārā audzēja šūnu līnijas 480N (normoksija) un 480H (hipoksija), un to iedarbību uz D76 un D6 MCš paraugiem. Kā redzams, abos gadījumos nav novērojama statistiski ticama atšķirības, ja salīdzina 480N EV ar 480H EV ietekmi uz IL-8 sekrēciju D76 šūnās ( $p > 0,05$ ; nesapārotais t tests) un D6 480N ar D6 480H ( $p > 0,05$ ; nesapārotais t tests) (skat. 3.9.att.).



### 3.9.att. EV stimulētā IL-8 sekrēcija paraugos D76 un D6 atkarībā no audzēja vides apstākļiem

Otrajā gadījumā apskatījām EV, kas nākušas no metastātiska audzēja šūnām 620N (normoksija) un 620H (hipoksija), un to iedarbību uz D76 un D6 MCš paraugiem. Kā redzams, tikai 620N un 620H ir novērojama statistiski ticama atšķirība ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests) IL-8 sekrēcijā (skat. 3.10.att.).



3.10.att. EV stimulētā IL-8 sekrēcija paraugos D76 un D6 atkarībā no audzēja vides apstākļiem ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests)

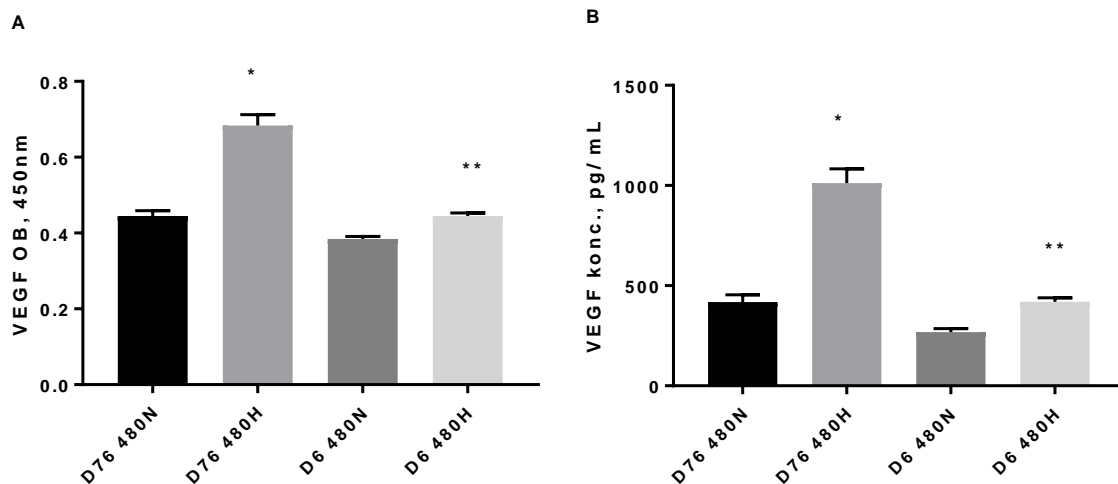
\*  $p < 0,05$  D76 620N pret D6 620H; nesapārotais t tests

### EV spēja izraisīt VEGF sekrēciju MCš atkarībā no audzēja vides

VEGF sekrēciju caur MCš var pastiprināt hipoksija, kas parasti ir izplatīta parādība audzējos (Potier *et al*, 2007).

Pēc eksperimenta rezultātiem redzams, ka tajās MCš, uz kurām iedarbojās ar EV, kas nākušas no hipoksiska audzēja šūnām 480H, VEGF sekrēcija ir spēcīgāka, nekā MCš uz kurām iedarbojās ar EV, kas nākušas no normoksiska audzēja šūnām 480N.

Salīdzinot VEGF sekrēciju starp MCš paraugiem, kur EV ņemtas no primārā audzēja 480N (normoksijas) un 480H (hipoksijas), rezultāti rāda, ka iegūtie dati ir ar statistiski ticami. D76 MCš gadījumā EV, kas nākušas no hipoksiskas audzēja šūnu vides, ierosina spēcīgāku VEGF sekrēciju, nekā EV, kas nākušas no normoksijā turētā audzēja šūnām ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests). Tāpat arī D6 MCš gadījumā lielāku VEGF sekrēciju veicina EV no hipoksiskas vides ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests).

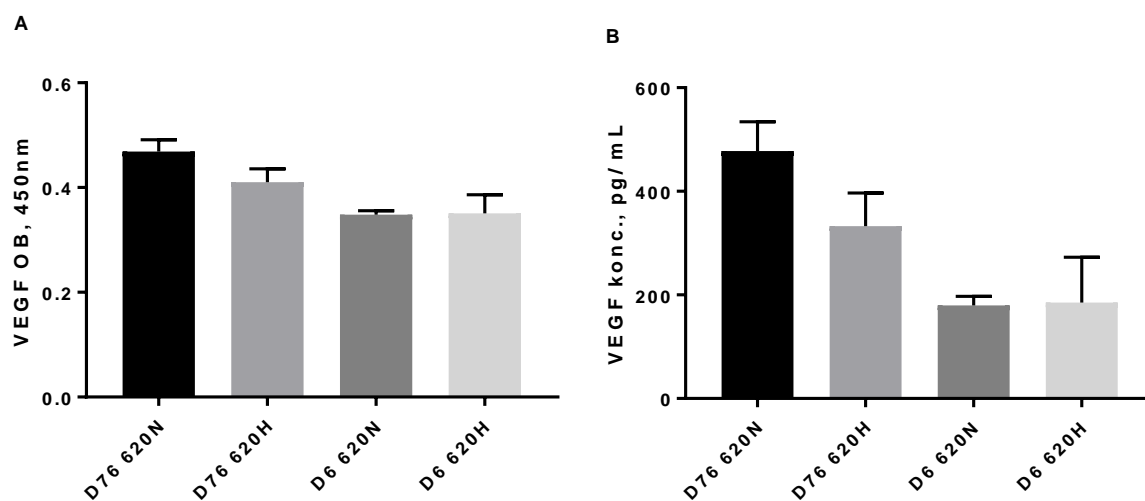


3.11.att. EV stimulētā VEGF sekrēcija paraugos D76 un D6 atkarībā no audzēja vides apstākļiem ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests)

\*  $p < 0,05$  D76 480N pret D76 480H; nesapārotais t tests

\*\*  $p < 0,05$  D6 480N pret D6 480H; nesapārotais t tests

Metastātiska audzēja gadījumā sekretētās EV uz ādas MCš iedarbojas dažādi. D76 MCš gadījumā EV ierosinātā VEGF sekrēcija MCš lielāka tiek uzrādīta no EV, kas nākušas no audzēja normoksijas apstākļos, bet šajā gadījumā nav novērojama statistiski ticama atšķirībā. D6 MCš gadījumā novērojams, ka spēcīgāku VEGF sekrēciju ierosina EV, kas ņemtas no hipoksiskas vides, bet arī šajā gadījumā nav novērojama statistiskā ticamība (skat. 3.12.att.).

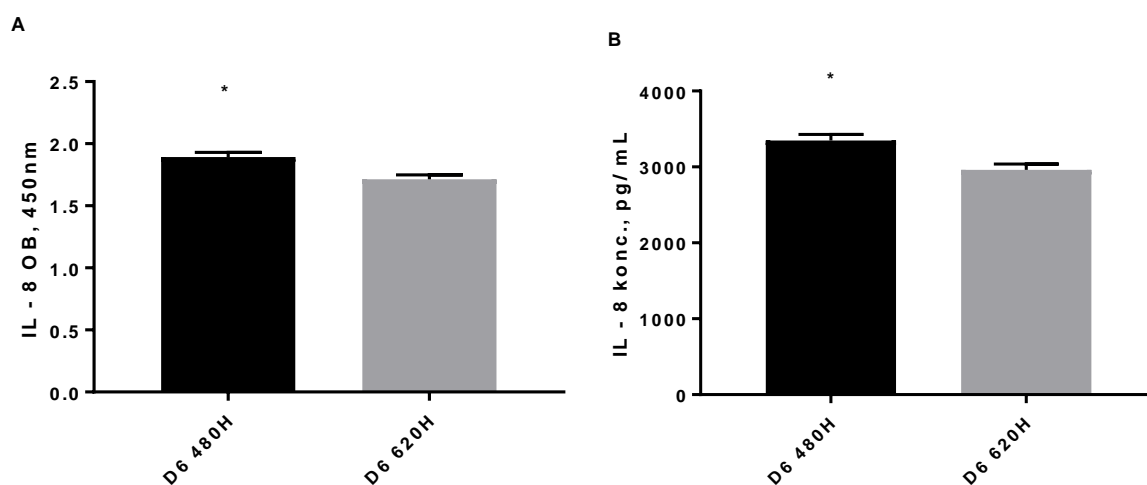


3.12.att. EV stimulētā VEGF sekrēcija paraugos D76 un D6 atkarībā no audzēja vides apstākļiem

### Primārā un metastātiskā audzēja EV izsuktā IL-8 sekrēcija MCš

Tika apskatīts arī tas, vai EV, kas iegūtas no primāra audzēja SW480H šūnu līnijām, atšķiras citokīnu sekrēcijas izmaiņu ziņā no EV, kas iegūtas no metastātiska audzēja SW620H šūnu līnijām. Eksperimentā tika iegūti dažādi rezultāti.

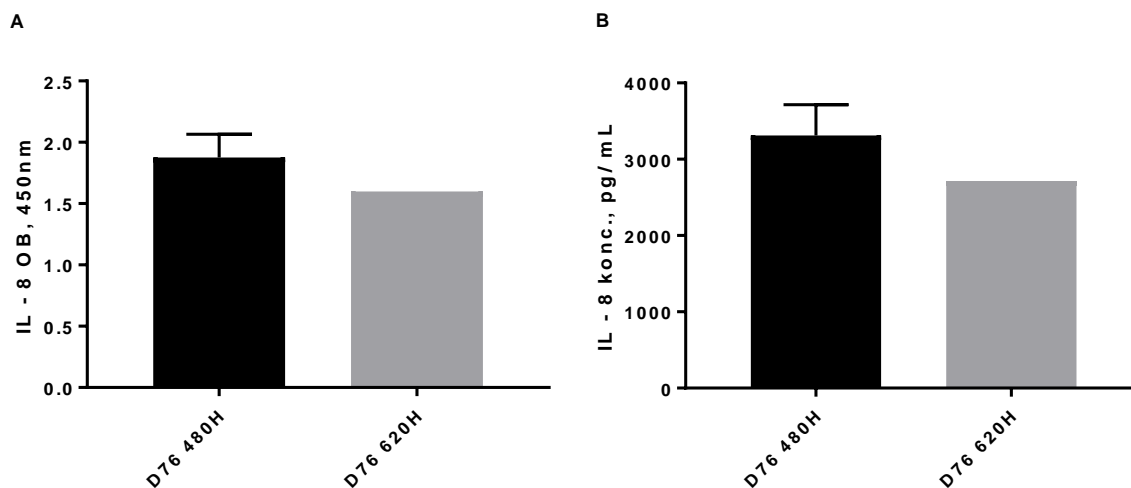
3.13. attēlā ir salīdzināta IL-8 ekspresija D6 MCš paraugā, ko ierosina EV, kas iegūtas no primārā audzēja šūnu līnijas 480H un metastātiskā audzēja šūnu līnijas 620H. Ir redzams, ka D6 480H IL-8 sekrēcija ir bijusi spēcīgāka, nekā D6 620H gadījumā. Arī starp iegūtajiem rezultātiem ir novērojama statistiski nozīmīga atšķirība ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests).



3.13.att. D6 MCš izraisītā IL-8 sekrēcija caur EV, kas nāk no primāra un metastātiska audzēja ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests)

\*  $p < 0,05$  D6 480H pret D6 620H; nesapārotais t tests

3.14. attēlā ir salīdzināta IL-8 ekspresija D76 MCš paraugā, ko ierosina EV, kas iegūtas no primārā audzēja šūnu līnijas 480H un metastātiska audzēja šūnu līnijas 620H. Arī šajā gadījumā ir novērojams, ka primārā audzēja šūnu sekretētās EV liek pastiprinātāk izdalīties IL-8, nekā metastātiskā audzēja EV, bet starp iegūtajiem rezultātiem nav novērojama statistiski ticama atšķirība.

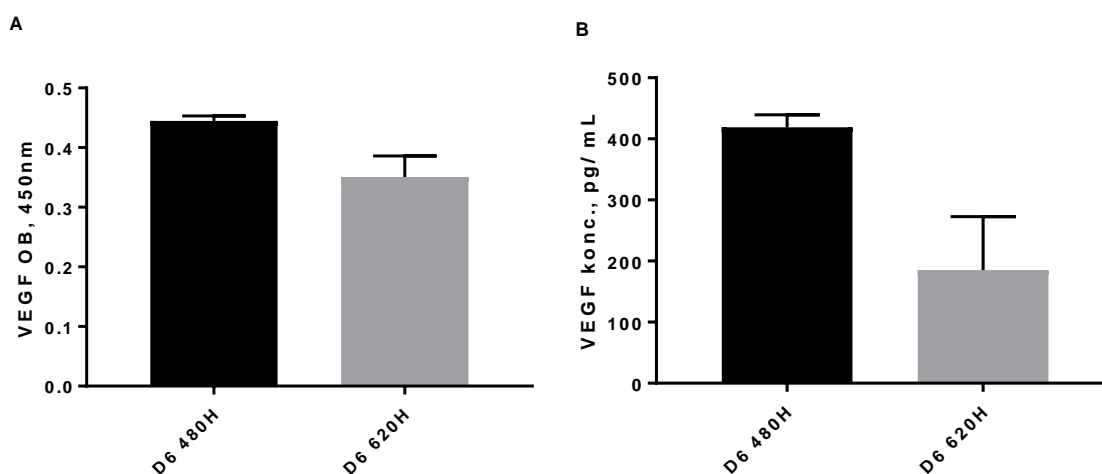


3.14.att. D76 MCš izraisītā IL-8 sekrēcija caur EV, kas nāk no primāra un metastātiska audzēja

### Primārā un metastātiskā audzēja EV izsuktā VEGF sekrēcija MCš

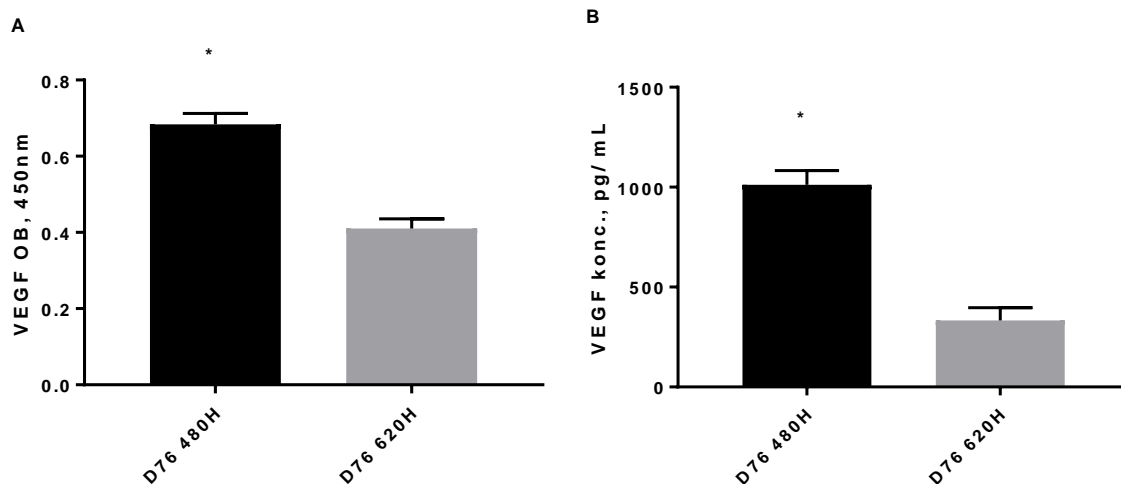
Vēža šūnām piemīt unikāla spēja izdzīvot un augt hipoksijas apstākļos (Dhani *et al.*, 2015). EV sekrēcija spēlē lomu audzēja spējā radīt metastāzes ierobežota skābekļa apstākļos. Hipoksiska audzēja izdalītās EV var izraisīt metastāzes un audzēja šūnu invāziju (Wang *et al.*, 2014; Green *et al.*, 2015).

Šajā gadījumā apskatīts vai ir novērojama nozīmīga atšķirība starp primārā un metastātiskā audzēja sekretētajām EV un to spējai izsukt VEGF sekrēciju MCš. 3.15. att. redzams, ka EV no primārā audzēja ir stimulējušas VEGF sekrēciju spēcīgāk, nekā metastātiskā audzēja gadījumā, bet starp datiem nav novērojama statistiski ticama atšķirība ( $p > 0,05$ ; nesapārotais t tests).



3.15.att. D6 MCš izraisītā VEGF sekrēcija caur EV, kas nāk no primāra un metastātiska audzēja

D76 MCš paraugos arī redzama tāda pati aina, ka EV, kas nākušas no primāra audzēja šūnu līnijas hipoksijas apstākļos, ierosina spēcīgāku VEGF sekrēciju MCš, nekā EV, kas nākušas no metastātiska audzēja šūnu kultūras hipoksijas apstākļos. Šajā gadījumā iegūtie dati liecina par statistiski ticamu atšķirību ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests).



**3.16.att. D76 MCš izraisītā VEGF sekrēcija caur EV, kas nāk no primāra un metastātiska audzēja ( $p < 0,05$ ; nesapārotais t tests)**

\*  $p < 0,05$  D76 480H pret D76 620H; nesapārotais t tests

## SECINĀJUMI

1. No ādas saistaudiem iegūtās mezenhimālo cilmes šūnu (MCš) *in vitro* kultūras sekretē IL-8 un VEGF nestimulētā stāvoklī.
2. IL-8 sekrēcija ādas MCš pastiprinās, kad tās tiek stimulētas ar kolorektālā audzēja šūnu līniju SW480 un SW620 ekstracelulārajām vezikulām (EV).
3. Normoksijā kultivētu metastātisko audzēja šūnu SW620 līnijas EV izraisa spēcīgāku IL-8 sekrēciju no MCš, nekā hipoksijas apstākļos kultivētu SW620 šūnu EV.
4. VEGF sekrēcija ādas MCš pastiprinās, kad tās tiek stimulētas ar audzēja šūnu līniju SW480 un SW620 EV.
5. VEGF sekrēcija ir spēcīgāka, kad MCš tiek stimulētas ar EV, kas nākušas no primāra audzēja šūnu SW480 līnijas hipoksijas apstākļos.
6. Hipoksijas apstākļos kultivētu SW480 šūnu EV izraisa spēcīgāku IL-8 sekrēciju no MCš, salīdzinot ar hipoksijā kultivētu SW620 šūnu EV.
7. Kolorektālā audzēja šūnu līniju sekretēto EV ietekme uz VEGF un IL-8 sekrēciju MCš, iespējams, liecina par audzēja šūnu EV lomu audzējam labvēlīgu apstākļu radīšanā un audzēja progresēšanā.

## **PATEICĪBAS**

Vēlos izteikt pateicību savai darba vadītājai asociētai profesorei Unai Riekstiņai par ieguldīto laiku, palīdzību un padomu sniegšanu maģistra darba tapšanas laikā!

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **Xiaolei L., Zhiqiang W., Xiaobing F., Weidong H.** A microRNA component of the neoplastic microenvironment: Microregulators with far – reaching impact. *BioMed Research International*. 2013, dio: 10.1155/2013/762183
2. **Sounni E. N., Noel A.** Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clinical Chemistry*. 2013, 59 (1): 85 – 93.
3. **Sadovska L., Eglītis J., Linē A.** Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic in breast cancer. *Anti Cancer Research*. 2015, 35 (12): 6379 – 90.
4. **Lopatina T., Gai C., Deregibus M. C., Kholia S., Camussi G.** Cross talk between cancer and mesenchymal stem cells through extracellular vesicles carrying nucleic acids. *Frontiers in Oncology*. 2016, 6: 125.
5. **Fujita Y., Yoshioka Y., Ochiya T.** Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer Science*. 2016, 107 (4): 385 – 390.
6. **Lu P., Weaver V. M., Werb Z.** The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*. 2012, 196 (4): 395.
7. **Luo H., Tu G., Liu Z., Liu M.** Cancer – associated fibroblasts: A multifaced driver of breast cancer progression. *Cancer Letters*. 2015, 361 (2): 155 – 63.
8. **Park C. W., Kim K. S., Bae S., Son H. K., Myung P. K., Hong H. J., Kim H.** Cytokine secretion profiling of human stem cells bu antibody array. *International Journal of Stem Cells*. 2009, 2 (1): 59 – 68.
9. **Dudley A. C.** Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Meicine*. 2012, 2 (3), dio: 10.1101/cshperspect.a006536
10. **Wendler F., Favicchio R., Simon T., Alifrangis C., Stebbing J., Giamas G.** Extracellular vesicles swarm the cancer microenvironment: from tumor – stroma communication to drug intervention. *Oncogene*. 2017, 36: 877 – 884.
11. **Abels E. R., Breakefield X. O.** Introduction to extracellular vesicles: Biogenesis, RNA cargo selection, content, release and uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2016, 36 (3): 301 – 12.
12. **Ambrose Y. J., Chun – Hua W., Jingbo L., Jianping S., Muller F., Wayne A. S., Seeger R. C.** Large – scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells. *Journal of Extrcellular Vesicles* 2017, 6 (1)
13. **Borges F. T., Reis L. A., Schor N.** Extracellular vesicles: structure, function and potential clinic uses in renal diseases. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*. 2013, 46 (10): 824 – 830.

14. **Mercedes T., Clotilde T.** Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. *Cell*. 2016, 164 (6): 1226 – 1232.
15. **Douglas H., Coussens L. M.** Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012, 21 (3): 309 – 322.
16. **Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Nago – Kitamoto H., Alam M. T., Yamamoto K., Kawamoto T., Inoue N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y., Hida K.** Tumor endothelial cells in high metastatic tumors promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. *Scientific Reports*. 2016, dio: 10.1038/srep28039
17. **Baba A. I., Catio C.** Tumor cell morphology. *Comparative Oncology*. 2007.
18. **Yanez – Mo M., Siljander P. R. M., Andreu Z., Zavec A. B., Borrás F. E. et al.** Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015, dio: 10.3402/jev.v4.27066.
19. **Pattabiraman D. R., Weinberg R. A.** What constitutes the tumor microenvironment. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016, 13: 497 – 512.
20. **Silva V. L., Al – Jamal W. T.** Exploiting the cancer niche: Tumor – associated macrophages and hypoxia as promising synergistic targets for nano – based therapy. *Journal of Controlled Release*. 2017, 253: 82 – 96.
21. **Qui X., Fang – Fang Z., Fei G., Chen – Lu L., Ping X., Zhen – Zhen L., Bin Y., Hui W., Jia – Xin W., Hai – Hong Z., Wei K., Ziang – Hui Y.** Anti – tumor effects of DNA vaccine targeting human fibroblast activation protein  $\alpha$  by producing specific immune responses and altering tumor microenvironment in the 4T1 murine breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2016, 65 (5): 613 – 624.
22. **Rui L., Hui L., Liang L. Jinpu Y., Xiubao R.** Fibroblast activation protein. *Cancer Biology & Therapy*. 2012, 13 (3): 123 – 129.
23. **Vaupel P.** The role of hypoxia – induced factors in tumor progression. *The Oncologist*. 2004, 9 (5): 10 – 17.
24. **Worzfeld T., Strandmann E. P., Huber M., Adhikary T., Wagner U., Reinartz S., Muller R.** The unique molecular and cellular microenvironment of ovarian cancer. *Frontiers on Oncology*. 2017, dio: 10.3389/fonc.2017.00024
25. **Gutierrez – Vazquez C., Villarroya – Beltri C., Mittelbrunn M., Sanchez – Madrid F.** Transfer of extracellular vesicles during immune cell – cell interactions. *Immunological Reviews*. 2013, 251 (1): 125 – 142.

26. **Cox T. R., Erler J. T.** Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease Models & Mechanisms*. 2011, 4 (2): 165 - 178.
27. **Nikitenko L., Boshoff C.** Endothelial cells and cancer. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2006., 176 (2): 307 – 34.
28. **Maes H., Olmeda D., Soengas M. S., Agostinis P.** Vesicular trafficking mechanisms in endothelial cells as modulators of the tumor vasculature and targets of antiangiogenic therapies. *The FEBS Journal*. 2016, 283 (1): 25 – 38.
29. **Stewart D. A., Cooper C. R., Sikes R. A.** Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM – associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004, doi: 10.1186/1477-7827-2-2
30. **Vasudev N. S., Reynolds A. R.** Anti – angiogenic therapy for cancer: current progression, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*. 2014, 17 (3): 471 – 494.
31. **Cao Y.** Future options of anti – angiogenic cancer therapy. *Chinese Journal of Cancer*. 2016, doi: 10.1186/s40880-016-0084-4
32. **Rayburn E. R., Ezell S. J., Zhang R.** Anti – inflammatory agents for cancer therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*. 2009, 1 (1): 29 – 43.
33. **Koki A. T., Masferrer J. L.** Celecoxib: a specific COX – 2 inhibitor with anticancer properties. *Cancer Control*. 2002, 9 (2): 28 – 35.
34. **Dostert G., Mesure B., Menu P., Velot E.** How do mesenchymal stem cells influence or are influenced by microenvironment through extracellular vesicles communication? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2017, doi: 10.3389/fcell.2017.00006
35. **Xiaoyang Z., Huaijun T., Yazhi Y., Lijun F., Qiong W., Jian L.** Mesenchymal stem cell – derived extracellular vesicles: roles in tumor growth, progression and drug resistance. *Stem Cells International*. 2017, doi: 10.1155/2017/1758139
36. **Seigneuric R., Garrido C.** Editorila: Tumor – derived extracellular vesicles: protocols, models and clinical evidence. *Frontiers in Oncology*. 2016, 6: 230.
37. **Czernek L., Duchler M.** Functions of cancer – derived extracellular vesicles in immunosuppression. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017, doi: 10.1007/s00005-016-0453-3
38. **Turturici G., Tinnirello R., Sconzo G., Geraci F.** Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell – to – cell communication: advantages and disadvantages. *Cell Physiology*. 2014, 306 (7): 621 – 633.

39. **Melo S. A., Luecke L. B., Kahlert C., et al.** Glypican – 1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015, 523 (7559): 177 – 82.
40. **Sousana B. R., Parreira R. C., Fonseca E.A. et al.** Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry Part A*. 2014, 85 (1): 43 – 77.
41. **Pittenger M. F., Mackey A. M., Beck A. C. et al.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999, 284 (5411): 143 – 147.
42. **Baksh D., Song L., Tuan R. S.** Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2004, 8 (3): 301 – 316.
43. **Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J. J., Lotvall J. O.** Exosome – mediated transfer of mRNAs in a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*. 2007, 9 (6): 654 – 9.
44. **Gyorgy B., Szabo T. G., Pastrozi M., Pal Z., Misjak P., Aradi B., Laszlo V., Pallinger E., Pap E. et al.** Membrane vesicles, current state – of – the – art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011, 68: 2667 – 2688.
45. **El Andaloussi S., Mager I., Breakefield X. O., Wood M. J.** Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Dru Discov*. 2013, 12 (5): 347 – 357.
46. **Dvorak H. F., Nagy J. A., Dvorak A. M.** Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies. *Cancer Cells*. 1991, 3: 77 – 85.
47. **Hanahan D., Coussens L. M.** Accessories to the Crime: Functions of Cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cells*. 2012, 21: 309 – 322.
48. **Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper – Cortenbach I., Marini F. C., Krause D. S., Dean R. J., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E. M.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006, 8: 315 – 317.
49. **Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J.** Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007, 25: 2739 – 2749.
50. **Marquez – Curtis Leah A., Janowska – Wieczorek A.** Enhancing the migraton ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF – 1/ CXCR4 Axis. *Bio. Med. Research International* 561098. *PMC*.

51. **Parekkadan B., Milwid J. M.** Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual review of biochemical engineering*. 2010, 12: 87 – 117.
52. **Mishar P. J., Humenuik R., Medina D. J., Akexe G., Mesirov J. P., Ganesan S., Glod J. W., Banerjee D.** Carcinoma – associated fibroblast – like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res*. 2008, 68: 4331 – 4339.
53. **Minciacchi V. R., Freeman M. R. Di Vizio D.** Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Cell. Dev. Biol*. 2015, 40: 41 – 51.
54. **Morello M., Minciacchi V. R., de Candia P., Yang J., Posadas E., Kim H. et al.** Large oncosomes mediate intracellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle*. 2013, 12: 3526 – 36.
55. **Di Vizio D., Morello M., Dudley A. C., Schow P. W., Adam R. M., Morley S. et al.** Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *Am J Pathol*. 2012, 181: 1573 – 84.
56. **Minciacchi V. R. You S., Spinelli C., Morley S., Zandian M., Aspuria P. J. et al.** Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor – derived extracellular vesicles. *Oncotarget*. 2015, 6: 11327 – 41.
57. **Nolte-t Hoen E. N., Buermans H. P., Waasdorp M., Stoorvogel W., Wauben M. H., Hoen P. A.** Deep sequencing of RNA from immune cell – derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non – coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*. 2012, 40: 9272 – 85.
58. **Atkin – Smith G. K., Tixeira R., Paone S., Mathivanan S., Collins C., Liem M. et al.** A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads – on – a – string membrane structure. *Nat. Commun*. 2015, 6: 7439.
59. **Lindoso R. S., Collino F., Camussi G.** Extracellular vesicles derived from renal cancer stem cells induce a pro – tumorigenic phenotype in mesenchymal stromal cells. *Oncotarget*. 2015, 6: 7959.
60. **Wang X., Gu H., Qin D., Yang L., Huang W., Essandoh K. et al.** Exosomal miR – 223 contributes to mesenchymal stem cell – elicited cardioprotection in polymicrobial sepsis. *Sci. Rep*. 2015, 5: 13721.
61. **Waugh D. J. J., Wilson C.** The interleukin – 8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res*. 2008, 14: 6735 – 6741.
62. **Verbeke H., Struyf S., Laureys G., Van Damme J.** The expression and role of CXC chemokines on colorectal cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011, 22: 345 – 358.

63. Pecot C. V., Raupaimoole R., Yang D., Akbani R., Ivan C., Lu C., Wu S., Shah M. Y., Rodriguez – Aguayo C. *et al.* Tumor angiogenesis regulation by the miR – 200 family. *Nat. Commun.* 2013, 4: 2427.
64. Ning Y., Manegold P.C., Hong Y.K., Zhang W., Pohl A., Lurje G., Winder T., Yang D., LaBonte M.J., Wilson P.M., Ladner R.D., Lenz H. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity *in vitro* and *in vivo* in colon cancer cell line models. *Int J Cancer.* 2011;128:2038–2049.
65. Wang J., Wang Y., Wang S., Cai J., Shi J., Sui X., Cao Y., Weijun H. *et al.* Bone marrow – derived mesenchymal stem cell – secretes IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2015, 6 (40).
66. Kagiwada H., Yashiki T., Ohshima A., Tadokoro M., Nagaya N., Ohgushi H. Human mesenchymal stem cells as stable source of VEGF – producing cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2008, 2 (4): 184 – 189.
67. Rhee K. J., Lee J. I., Eom Y. W. Mesenchymal stem cell – mediated effect of tumor support or suppression. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015, 16 (12).
68. Potier E., Ferreira E., Andriamanalijaona R., Pujol J. P., Oudina K., Logeart – Avramoglou D., Petite H. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone.* 2007, 40 (4): 1078 – 87.
69. Beckermann B. M., Kallifatidis G., Groth A., Frommhold D., Apel A., Mattern J., Salnikov A. V. *et al.* VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *British Journal of Cancer.* 2008, 99: 622 – 631.
70. Wysoczynski M., Ratajczak M. Z. Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *International Journal of Cancer.* 2009, doi: 10.1002/ijc.24479
71. Li W., Zhou Y., Yang J., Zhang X., Zhang H., Zhang T., Zhao S., Zheng P., Huo J., Wu H. Gastric cancer – derived mesenchymal stem cells prompt cancer progression through secretion of interleukin – 8. *Journal of Experimental & Clinical Research.* 2015, doi: 10.1186/s13046-015-0172-3.
72. Yamada N. O. Extracellular vesicles: emerging mediators of intracellular communication and tumor angiogenesis. *Annals of Translational Medicine.* 2017, 5 (3): 59.
73. Spaeth E. L., Dembinski J. L., Sasser A. K., Watson K., Klopp A., Hall B., Adreiff M., Marini F. Mesenchymal stem cells transition to tumor – associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLOS One.* 2009, 4 (4).

74. **Huang Z., Feng Y.** Exosomes derived from hypoxic colorectal cancer cells promotes angiogenesis through Wnt4 induced  $\beta$  – catenin signaling in endothelial cells. *Oncol. Res.* 2016, dio: 10.3727/096504016X14752792816791
75. **Dhani N., Fyles A., Hedley D., Milosevic M.** The clinical significance of hypoxia in human cancers. *Seminars in Nuclear Medicine.* 2015, 45 (2): 110 – 121.
76. **Wang T., Gilkes D. M., Takano N., et al.** Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014, 111(31): E3234 – E3242.
77. **Green T. M., Alpaugh M. L., Barsky S. H., Rappa G., Lorico A.** Breast cancer – derived extracellular vesicles: Characterization and contribution to the metastatic Phenotype. *BioMed Research International.* 2015, dio: 10.1155/2015/634865
78. **Goel H. L., Mercurio A. M.** VEGF targets the tumor cell. *Nature Reviews Cancer.* 2013, 13 (12): 871 – 882.
79. **Henry L. R., Lee H. O., Lee J. S., Klein – Szanto A., Watts P., Ross E. A. et al.** Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 2007, 13: 1736 – 41.
80. **Kelley M. R., Logsdon D., Fishel M.** Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Future Oncology.* 2014, 10 (7): 1215 – 1237.

### **Elektroniskie materiāli**

1. **Gabrilovich D.** Host response to tumors. 2016 [tiešsaiste] – [atsauce 12.03.2017]. Pieejams internetā: <http://www.msmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/tumor-immunology/host-response-to-tumors>
2. Cancer cell. Cancer Research UK [tiešsaiste] – [atsauce 15.03.2017] Pieejams internetā: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/cancer-cells>
3. **Duffy A. M., Boucher – Hayes D. J., Harmey J. H.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: Autocrine signalling by VEGF. *Madame Curie Bioscience Database.* 2013 [tiešsaiste] – [atsauce 05.05.2017] Pieejams internetā: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6482/>
81. **Ruddon R. W.** What makes a cancer cell a cancer cell? *Holland – Frei Cancer Medicine.* 2003 [tiešsaiste] – [atsauce 05.05.2017] Pieejams internetā: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12516/>

82. **Lodish H., Berk A., Zipursky S. L.** DNA damage and repair and their role in carcinogenesis. *Molecular Cell Biology*. 2000 [tiešsaiste] – [atsauce 07.05.2017]  
Pieejams internetā: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21554/>

## DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs “Audzēja ekstracelulāro vezikulu loma mezenhimālo cilmes šūnu sekrēcijas profila izmaiņās” 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: Baiba Paegle \_\_\_\_\_

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Dr. Biol., asoc. Prof. Una Riekstiņa \_\_\_\_\_ \_\_.05.2017.

Recenzente: Līga Saulīte \_\_\_\_\_ \_\_.05.2017.

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē \_\_.05.2017

Vecākā lietvede: Juta Bārtule \_\_\_\_\_

Darbs aizstāvēts maģistra ga;ā pārbaudījuma komisijas sēdē

\_\_ .06.2017. prot. Nr. \_\_\_\_.

Komisijas sekretārs: \_\_\_\_\_