

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
BIOĶĪMIJAS UN MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

ĀRPUSŠŪNU CIRKULĒJOŠO NUKLEĪNSKĀBJU IZPĒTE  
HIPOFĪZES ADENOMAS PACIENTOS

Bakalaura darbs

Autors: Helvijs Niedra

Stud. apl. Nr. hn16002

Darba vadītājs: Dr. biol. Raitis Pečulis

Zinātniskais konsultants: Dr. biol. Vita Rovīte

RĪGA 2019

## Satura rādītājs

Kopsavilkums .....	3
Abstract.....	4
Ievads.....	5
Darbā lietotie saīsinājumi .....	6
1. Literatūras apskats .....	7
1.1. Hipofīzes dziedzera anatomiskais un fizioloģiskais raksturojums .....	7
1.2. Hipofīzes embrionālā attīstība .....	8
1.3. Hipofīzes hormoni .....	9
1.4. Hipofīzes adenoma .....	11
1.5. Hipofīzes adenomu iedalījums atkarībā no sekretētā hormona veida.....	13
1.6. Hipofīzes adenomu epidemioloģija .....	14
1.7. Hipofīzes adenomu ģenētiskie cēloņi .....	15
1.8. Cirkulējošā šūnu brīvā DNS .....	17
1.9. Audzēja mutācijas cirkulējošajā šūnu brīvajā DNS.....	18
1.10. Adenomas izcelsmes cirkulējošā šūnu brīvā DNS .....	19
1.11. Mikro RNS raksturojums un bioģenēze.....	19
1.12. Mikro RNS funkcijas .....	20
1.13. Mikro RNS hipofīzes adenomās .....	21
2. Materiāli un metodes .....	23
2.1. Materiāli.....	23
2.2. Metodes.....	29
3. Rezultāti.....	44
3.1. Adenomas izcelsmes ccfDNA detektēšana ar mērķētu otrās paaudzes sekvencēšanu .	44
3.1.1. ccfDNA izdalīšana .....	44
3.1.2. PCR ar ccfDNA.....	47
3.1.3. ccfDNA otrās paaudzes sekvencēšana .....	48
3.2. miRNS sastāva izmaiņu noteikšana ar otrās paaudzes sekvencēšanu .....	51
3.2.1. Izdalīto RNS paraugu hemolīzes kontroles rezultāti.....	51
3.2.2. miRNS bibliotēku sagatavošana otrās paaudzes sekvencēšanai .....	53
3.2.3. miRNS sekvencēšanas rezultāti.....	55
4. Diskusija.....	57
4.1. Hipofīzes adenomas izcelsmes ccfDNA detektēšana .....	57
4.2. miRNS sastāva izmaiņu noteikšana plazmā .....	62
Secinājumi .....	66
Pateicības .....	67
Literatūras saraksts .....	68
PIELIKUMS.....	79

## Kopsavilkums

Līdz šim literatūrā nav ziņojumu par ccfDNA un cirkulējošo miRNS izpēti HA pacientu plazmā. Darbā tika novērtēta iespējamība detektēt HA izcelsmes ccfDNA plazmā, veicot mērķētu NGS pozīcijās, kuras saturēja HA somatiskās mutācijas, un veikts pētījums par miRNS sastāva izmaiņu detektēšanu plazmā 24 stundas pēc HA rezekcijas.

HA eksomos atklātās somatiskās mutācijas tikai detektētas septiņās no 16 pārbaudītajām pozīcijām ccfDNA amplikonos. Divās ccfDNA pozīcijās mutantā alēle bija vairāk nekā 2% no kopējā nolasījumu skaita, kas varētu liecināt par šo ccfDNA izcelsmi no HA. Piecās pozīcijās no diviem HA pacientiem mutantās alēles īpatsvars ccfDNA bija ap 50%, kaut gan šīs mutācijas netika konstatētas leukocītu DNS.

miRNS sastāvs plazmā pēc HA rezekcijas, bija statistiski būtiski ( $P < 0,05$ ) izmainīts četrām miRNA robežās no -1,2 – 1,4 reizēm.

Atslēgas vārdi: hipofīzes adenoma, ccfDNA, cirkulējošās miRNS, mērķēta ccfDNA NGS, miRNA diferenciālā ekspresija plazmā, plazmas biomarkieri.

## Abstract

So far, there are no reports in literature on ccfDNA and circulating miRNA in plasma of pituitary adenoma (PA) patients. This work assessed the probability of detecting PA derived ccfDNA in plasma by using targeted NGS in positions which contained somatic mutations found in PA and studied the changes in miRNA profiles in plasma 24 hours post-surgery.

Seven of the 16 somatic mutations previously found in the exome of PA were detected in amplicons of ccfDNA. In two positions of ccfDNA mutated allele was detected in more than 2% of all reads indicating that this ccfDNA is of PA. Five positions in two patients had mutated allele frequency in ccfDNA close to 50% even though these mutations were not detected in leukocyte DNA.

Statistically significant fold change ( $P < 0,05$ ) between -1,2 – 1,4 in plasma post-surgery was observed for four miRNAs.

Keywords: pituitary adenoma, ccfDNA, circulating miRNAs, targeted ccfDNA NGS, miRNA differential expression in plasma, plasma derived biomarkers.

## Ievads

Hipofīzes adenoma (HA) ir labdabīgs audzējs hipofīzes dziedzerī, kurš kopā ar hipotalāmu regulē visu pārējo organismā esošo endokrīno dziedzeru darbību. Populācijā HA ar klīniski nozīmīgu iznākumu ir vienam no 1000 cilvēkiem (Daly A. *et al.* 2006). Tās var izraisīt hormonu disbalansu, kas noved pie nelabvēlīgām fenotipa izmaiņām, un, augstas invazivitātes gadījumos, radīt masas efektu intrakraniālajā reģionā, kas pacientiem var izraisīt HA nespecifiskus simptomus: galvassāpes, reiboni un redzes traucējumus. Jaunu diagnostikas un prognostikas metožu ieviešana, kas ir efektīvākas, ar mazāku invazivitāti un spēj sniegt precīzu informāciju par terapijas efektivitāti, ievērojami uzlabotu klīniski nozīmīgu HA pacientu personalizētās terapijas efektivitāti (Levy A. 2004).

Audzēju diagnostikā šobrīd tiek pētītas minimāli invazīvas metodes, kas ietver cirkulējošās šūnu brīvās DNS (ccfDNA) vai cirkulējošo mikro RNS (miRNS) analīzi. ccfDNA galvenokārt sastāv no 165bp gariem fragmentiem, kuri veidojas, fragmentējoties kodola DNS, apoptozes procesā, un var saturēt audzēja genomam raksturīgos ģenētiskos marķierus (Ma X. *et al.* 2017). miRNS ir aptuveni 22 nukleotīdu garas RNS molekulas, kuras iesaistās pēctranskripcionālā gēnu regulēšanā un to ekspresijas izmaiņas ir asociētas ar vairākiem audzējiem (Palmirota R. *et al.* 2018). miRNS ir iepriekš pētītas HA audos, bet literatūrā ir ierobežots daudzums pieejamās informācijas par cirkulējošām miRNS HA pacientu plazmā (Ieva A. *et al.* 2014), kā arī nav informācijas par HA izcelsmes ccfDNA.

Darbā tika izvirzīti divi mērķi. Pirmkārt: noskaidrot vai ir iespējams detektēt adenomas izcelsmes ccfDNA HA pacientu plazmā, veicot mērķētu otrās paaudzes sekvencēšanu (NGS) pozīcijās, kurās tika iepriekš atklātas somatiskas HA mutācijas. Pētīt cirkulējošo miRNS sastāva izmaiņas pacientu plazmā pirms un 24 stundas pēc HA rezekcijas.

Darba mērķu īstenošanai tika izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- Veikt ccfDNA izdalīšanu no piecu HA pacientu plazmas paraugiem.
- 16 pozīcijās, kurās audzēju materiālos pacientiem tika atklātas mutācijas veikt PCR ar izdalīto ccfDNA, un sagatavot iegūtos fragmentus NGS.
- Pēc sekvencēšanas veikt sekvencēšanas datu apstrādi un analīzi.
- Veikt RNS izdalīšanu no 12 HA pacientu plazmas paraugiem pirms un pēc rezekcijas.
- Ar reālā laika PCR metodi veikt izdalīto RNS paraugu hemolīzes kontroli.
- Optimizēt protokolu miRNS bibliotēku sagatavošanai NGS, lai sekvencēšanas laikā tiktu iegūti pēc iespējas vairāk miRNS nolasījumu.
- Veikt miRNS sekvencēšanas datu apstrādi un novērtēt miRNS sastāva izmaiņas.

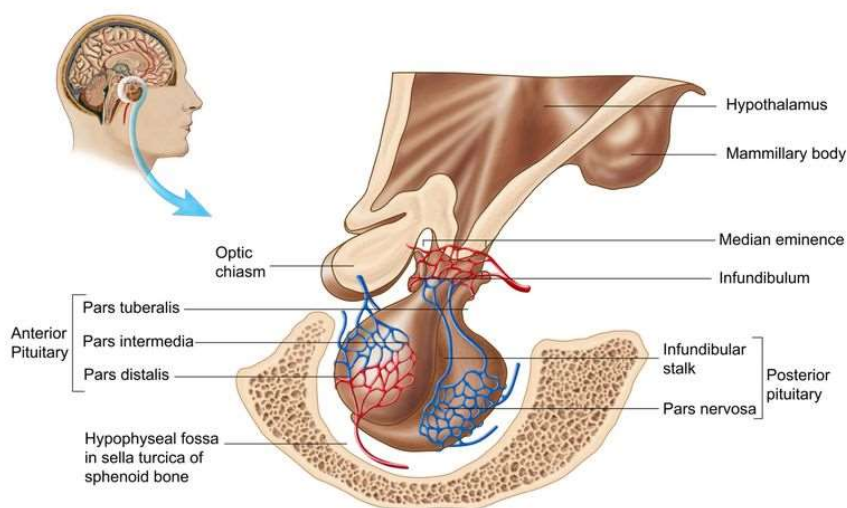
## Darbā lietotie saīsinājumi

ACTH – adrenokortikotropais hormons	JAK – Janus kināze
ADH – vazopresīns	KRAS – Kirstena žurku sarkomas 2. virālā onkogēna homologa gēns
AGO – argonautproteīns	Leu – leicīns
AIP – arilhidrokarbonreceptora mijiedarbības proteīna gēns	LH – luteinizējošais hormons
Arg – arginīns	MEN1 – menīna gēns
cAMP – cikliskais adenozīna monofosfāts	MEN1 (sindroms) – 1. tipa multiplā endokrīnā neoplāzija
ccfDNA – cirkulējošā šūnu brīvā dezoksiribonukleīnskābe	MEN4 – 4. tipa multiplā endokrīnā neoplāzija
cfDNA – šūnu brīvā dezoksiribonukleīnskābe	miRISC – mikro ribonukleīnskābes un proteīnu komplekss.
CDKN1B – ciklīnātkarīgās kināzes inhibitora 1B gēns	miRNS – mikro ribonukleīnskābe
CHR – kortikotropīna atbrīvojošais hormons	MSH – melanocītu stimulējošais hormons
ctDNA – audzēja izcelsmes šūnu brīva dezoksiribonukleīnskābe	NGS – nākamās (otrās) paaudzes sekvenčēšana
Cys – cisteīns	NM23 – nukleozīddifostātkināzes-1 gēns
ddNTP – dideoksinukleotīdi	NRAS – neuroblastomas žurku sarkomas virālā onkogēna homologa gēns
ddPCR – pilienu digitāla PCR	OT – oksitocīns
dH <sub>2</sub> O – dejonizēts ūdens	p53 – audzēja proteīns p53
Dicer1 – Dicer endoribonukleāze	PCR – polimerāzes ķēdes reakcija
DICER1 – Dicer endoribonukleāzes gēns	pKa – proteīnkināze a
DNS – dezoksiribonukleīnskābe	POMC – propiomelanokortīns
dNTP – deoksinukleotīds	PRH – prolaktīnu atbrīvojošais hormons
EGFR – epidermālais augšanas faktors	PRL – prolaktīns
Exo I - <i>E. Coli</i> eksonukleāze I	RAS – žurku sarkomas gēnu saime
FastAP – termosensitīvā sārmainā fosfatāze	RB1 – retinoblastomas proteīna 1 gēns
FIPA – ģimenes izolētā hipofīzes adenoma	RNS – ribonukleīnskābe
FSH – folikulu stimulējošais hormons	RS – dezoksiribonukleīnskābes ķēdes 3' 5' virziens
FW – dezoksiribonukleīnskābes ķēdes 5' 3' virziens	Ser – serīns
GH – augšanas hormons jeb somatotropais hormons	SIX3 – hipofīzes organoģenēzes iniciācijas transkripcijas faktors
GHRH – augšanas hormonu atbrīvojošais hormons	SNP – viena nukleotīda polimorfisms
Gln – glutamīns	SSTR5 – somatostatīna receptors 5
GNAS – G-proteīna afla subvienības gēns	SSTRs – somatostatīna receptori
GnRH – gonadotropīnu atbrīvojošais hormons	STAT – signāla transdukcijas un transkripcijas aktivācijas faktori
G-proteīns – guanīn-nukleotīdu saistošais proteīns	T3 - trijodotironīns
HA – hipofīzes adenoma	T4 – tiroksīns
NFPA – hormonu nesekretējoša hipofīzes adenoma	TAE – tris acetāta etilēndiamīntetraetiķskābes buferšķīdums
Hesx1 – hipofīzes organoģenēzes iniciācijas transkripcijas faktors	TP53 – audzēja proteīna p53 gēns
His – histidīns	TSH – tiroīdstimulējošais hormons
IGF-1 – insulīnam līdzīgais augšanas faktors-1	USP – ubikvitīnspecifiskas proteāzes gēns
IL-1 – interleikīns-1	UV – ultravioletais starojums
IL-6 – interleikīns-6	WHO – Pasaules Veselības organizācija

# 1. Literatūras apskats

## 1.1. Hipofīzes dziedzera anatomiskais un fizioloģiskais raksturojums

Hipofīze ir endokrīnais dziedzeris, kas atrodas galvā un sastāv no anteriorās (adenohipofīze) un posteriorās (neirohipofīze) daivas. Kopā ar hipotalāmu, hipofīze regulē visu pārējo organismā esošo endokrīno dziedzeru darbību, kā arī metaboliskās funkcijas, lai nodrošinātu organisma fizioloģisko parametru homeostāzi (Fountas A., Karavitaki N. 2017). Normāla vidēja hipofīzes dziedzera izmēri parasti ir 13 mm platums, 10 mm garums un 5 mm augstums, un svars aptuveni 0,5g (Rajaratnam S. 2013). Hipofīze ir novietota netālu no vidussmadzenēm un, lai gan atrodas ārpus galvas hematoencefalāliskās barjeras, tomēr saglabā funkcionālu savienojumu ar galvas smadzenēm, jo hipofīzes posteriorā daļa ir anatomiski un funkcionāli savienota ar hipotalāmu. Laterāli hipofīzei atrodas iekšējās miega artērijas (*arteria carotis interna*), kā arī aptuveni 5mm virs adenohipofīzes daļas atrodas redzes nervu krustpunkts (*chiasma opticum*). Dziedzeris ieguļas spārnakaula (*os sphenoidale*), turku sedlu (*sella turcica*) daļā, ko sauc par hipofīzes dobumu (*fossa hypophysialis*), un to aptver smadzeņu cietā apvalka atvasinājums – sedlu diafragma (*diaphragma sellae*), kura piestiprinās pie spārnkaula mugurējā un priekšējā ķīļveida izaugumiem (Hillary S., Balasubramanian S.P. 2017).



**1. attēls.** Hipofīzes dziedzera anatomija (<https://www.thoughtco.com/pituitary-gland-anatomy-373226>).  
**Figure 1.** Anatomy of pituitary gland (<https://www.thoughtco.com/pituitary-gland-anatomy-373226>).

Adenohipofīze un neirohipofīze ir gan anatomiski, gan funkcionāli atšķirīgas. Adenohipofīze (*pars distalis*) sastāv no endokrīnām šūnām, kuras sintezē un sekretē hipofīzei raksturīgos hormonus. Neirohipofīzi (*pars nervosa*) veido no hipotalāma nākošie magnocelulāro nervu aksonu sakopojumi, kuru neironu ķermeņi atrodas pašā hipotalāmā, un

neiroglijas tipa šūnas – pitucīti. Neurohipofīze neveic hormonu sintēzi, bet nodrošina hipotalāmā sintizēto hormonu sekrēciju. Hipofīzei vēl ir vidējā daiva (*pars intermedia*), kura cilvēkiem ir reducēta, un ne visos literatūras avotos izdalīta kā atsevišķa hipofīzes daļa. Vidējo daivu veido Ratkes kabatas atlikums pēc šūnu proliferācijas, un tā sintezē un sekretē vienu hormonu – melanocītu stimulējošo hormonu (Nussey S., Whitehead S. 2001).

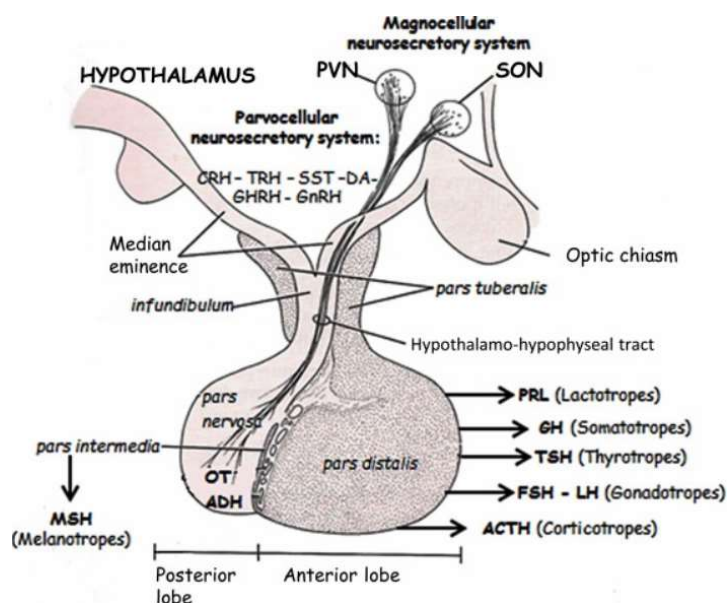
Hipofīzi apasiņo augšējā hipofīzes artērija (*arteria hypophysialis superior*) un apakšējā hipofīzes artērija (*arteria hypophysialis inferior*), un šīs artērijas atzarojas no hipofīzei blakus esošās iekšējās miega artērijas (*arteria carotis interna*). Augšējā hipofīzes artērija apasiņo adenohipofīzes daļu un attiecīgi apakšējā hipofīzes artērija apasiņo neurohipofīzes daļu (Foulad A. 2015). Hipofīzē esošie kapilāri veido hipotalāma-hipofīzes vārtu sistēmu, kas savieno priekšējo hipofīzes daivu ar smadzenēm un nodrošina hipotalāma hormonu (statīnu un liberīnu) transportu, kuri regulē adenohipofīzes hormonu sekrēciju. Viens no hipotalāma-hipofīzes vārtu sistēmas kapilāru tīkliem atrodas neurohipofīzes kājiņas (*infundibulum*) daļā. (Strauss *et al.* 2009).

## 1.2. Hipofīzes embrionālā attīstība

Pamats adenohipofīzes un neurohipofīzes anatomiskai un funkcionālai atšķirībai ir to embrionālā izcelsme. Adenohipofīzes veidojas no mutes dobuma ektodermas, bet neurohipofīze veidojas no neirālās ektodermas. Cilvēkam hipofīze sāk veidoties ceturtajā embrija attīstības nedēļā. Adenohipofīze veidojas, sabiezinoties orālai ektodermai, kā rezultātā izveidojas hipofīzes aizmetnis, no kura tālāk attīstās Ratkes kabata. Priekšējās Ratkes kabatas daļas šūnas iet cauri vairākiem šūnu dalīšanās procesiem, kuru rezultātā izveidojas priekšējā hipofīzes daiva, bet aizmugurējās Ratkes kabatas daļas šūnas proliferē lēni, izveidojot vidējo hipofīzes daivu – *pars intermedia*. Neurohipofīze veidojas uz leju, pagarinoties ventrāli novietotām vidussmadzenēm. Hipofīzes abu daivu precīzu izveidi ar raksturīgo anatomisko formu un fizioloģisko funkciju kontrolē arī vairāki telpiskie un transkripcijas faktori. Kļūdu gadījumā var veidoties hipofīzes dziedzera strukturālas un funkcionālas patoloģijas. Hipofīzes attīstību var iedalīt trīs stadijās, kur 1. stadijā sākās dziedzera organoģenēze un Ratkes kabatas izveide, kuru iniciē SIX3 un Hesx1 transkripcijas faktori. 2. stadijā notiek Ratkes kabatas invaginācija un šūnu proliferācija, 3. stadijā notiek šūnu diferenciācija (Larkin S. Ansorge O. 2017).

### 1.3. Hipofīzes hormoni

Hipofīzes hormonu sintēze notiek adenohipofīzē un vidus daivā, bet sekrēciju veic visas daivas. Adenohipofīze sastāv no endokrīno šūnu kodoliem, kurus klasificē pēc to sekretētajiem hormoniem: somatotrofās šūnas sintezē augšanas hormonu (GH) jeb somatotropīnu, kortikotrofās šūnas sintezē adrenokortikotropono hormonu (ACTH) un beta endorfīnus, gonadotrofās šūnas sintezē luteinizējošo hormonu (LH) un folikulu stimulējošo hormonu



2. attēls. Hipofīzes dziedzerā sekretētie hormoni (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27>)

Figure 2. Hormones secreted by pituitary gland (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27>)

terminālajiem galiem, bet to sintēze notiek magnocelulārajos neironu ķermeņos, kuri atrodas hipotalāmā. Šie hormoni ir oksitocīns (OT) un antiurētiskais hormons (ADH), un to sekrēciju un uzglabāšanu palīdz kontrolēt pituicīti (Nussey S., Whitehead S. 2001).

Katram adenohipofīzes hormonam ir savi mērķa audi un efekts. GH jeb somatotropīna mērķis ir visi organismā esošie audi, kuri satur GH receptorus. GH stimulē augšanai specifisku gēnu transkripcijas aktivēšanu, kuru ekspresijas galaprodukti iesaistās šūnu anabolismā. GH sekrēciju regulē hipotalāma augšanas hormona regulējošie peptīdhormoni: augšanas hormonu atbrīvojošais hormons (GHRH), kura ietekmē GH atbrīvojas no adenohipofīzes somatotrofiem un nonāk asinsritē, un somatostatīns, kurš veic pretēju iedarbību inhibējot GH sekrēciju. Bez GHRH un somatostatīna, GH sekrēciju arī regulē insulīnam līdzīgais augšanas faktors-1 (IGF-1) ar negatīvās atgriezeniskās saites principu. Bez sekrēcijas regulācijas hormoniem arī pastāv hormoni, kuri regulē somatotropīna gēna ekspresiju, tie ir vairogdziedzera sekretētie tiroksīni T3 un T4 (ElSayed S.A, Bhimji S.S. 2017). Ja GH sekrēcija hipofīzē netiek optimāli regulēta,

(FSH), laktotrofās šūnas sintezē prolaktīnu (PRL), tireotrofās šūnas, kuras sintezē tireotropo hormonu (TSH) (Hillary S., Balasubramanian S.P. 2017). Vidējā hipofīzes daivā arī atrodas kortikotrofās šūnas, kuras sintezē un sekretē melanocītus stimulējošos hormonus (MSH) (Childs G.V. 2009).

Neirohipofīze veic hormonu sekrēciju no magnocelulāro neironu aksonu

tad tas var novest pie akromegālijas – paaugstināta GH sekrēcija (hipersekrēcija), kuras rezultātā var veidoties skeleta, sirds, elpošanas, endokrīnās sistēmas un neiromuskulārās sistēmas traucējumi (Ben-Shlomo A., Melmed S. 2008).

PRL ir hormons, kurš gan vīriešiem gan sievietēm tiek sekretēts nelielā daudzumā. Bet sievietēm PRL sekrēcija ir pastiprināta grūtniecības laikā un pēc grūtniecības zīdīšanas periodā. Tā primārais mērķa orgāns ir piena dziedzeri, kur tas piesaistās pie PRL membrānu receptoriem (Liyanarachchi K.D., Debono M. 2017). Prolaktīna sekrēciju arī regulē hipotalāma sekretētie faktori: dopamīns ar inhibējošu ietekmi un prolaktīnu atbrīvojošais hormons (PRH) ar sekrēcijas veicinošu ietekmi (ElSayed S.A, Bhimji S.S. 2017). Nepareiza PRL sekrēcijas regulācija var izraisīt hiperprolaktinēmiju (paaugstināts PRL līmenis). Gan vīriešiem, gan sievietēm hiperprolaktinēmija var izraisīt libido zudumu un laktāciju. Papildus sievietēm hiperprolaktinēmija var izraisīt menstruāciju traucējumus, bet vīriešiem impotenci, neauglību, osteoporozi un svara pieaugumu (Verhelst J., Abs R. 2003).

TSH mērķa orgāns ir vairogdziedzeris, kur tas saistās pie tajā esošo folikulāro šūnu virsmas receptoriem, un veicina vairogdziedzerim raksturīgo hormonu sintēzi un sekrēciju. TSH sekrēciju no adenohipofīzes veicina hipotalāma sekretētais tireotropīnu atbrīvojošais faktors, bet vairogdziedzera tiroksīni T3, T4 izraisa inhibējošu efektu (ElSayed S.A, Bhimji S.S. 2017). Nekontrolēta TSH sekrēcija var izraisīt vairogdziedzera darbības traucējumus. Paaugstinātas TSH sekrēcijas gadījumā veidojas hipertiroidisms – palielināta vairogdziedzera hormonu sekrēcija, kā rezultātā var veidoties nogurums, nepamatotas trauksmes sajūtas, miega traucējumi, svara zudums, palielināta svīšana un siltuma nepanesamība (Leo S. *et al.* 2016).

FSH un LH ir zīdītāju gonādu stimulējoši hormoni, un to mērķa orgāni atšķiras starp dzimumiem. Sievietēm tie iedarbosies uz olnīcām, bet vīriešiem uz sēkliniekiem. FSH vīriešiem ir nozīmīgs spermatogēnēzes veicinošs faktors, bet sievietēm tas stimulē folikulu attīstību. LH ir nepieciešams, lai stimulētu dzimumhormonu sekrēciju no dzimumdziedzeriem, attiecīgi vīriešiem LH stimulēs testosterona sekrēciju, bet sievietēm progesterona sekrēciju. FSH un LH sekrēciju regulē hipotalāma gonadotropīna atbrīvojošie faktori (GnRH) (ElSayed S.A, Bhimji S.S. 2017). Traucēta LH un FSH sekrēcijas kontrole var novest pie šo hormonu hiposekrēcijas vai hipersekrēcijas. Sekas atšķiras starp dzimumiem. Vīriešiem LH un FSH hipersekrēcija var izraisīt paaugstinātu testosterona līmeni, kas var veicināt: svara zudumu, nogurumu, muskuļu mazspēju un libido zudumu (Snyder P., Sterling F. 1976). Bet sievietēm paaugstināta LH sekrēcija var izraisīt policistisko olnīcu sindromu (Watson H. *et al.* 1993).

ACTH ir hormons kurš iedarbojas uz virsnieru dziedzeri, un stimulē glikokortikoīdu sintēzi, kuri pielāgo ķermeni stresa apstākļiem (ElSayed S.A, Bhimji S.S. 2017). Pats ACTH veidojas no lielāka prekursora – propiomelanokortīna (POMC). ACTH Sekrēciju stimulē hipotalāma kortikotropīnu atbrīvojošie hormoni (CRH) un interleikīni (IL-6, IL-1), bet ACTH sekrēciju inhibē glikokortikoīdi (Liyanarachchi K.D., Debono M. 2017). Palielināta ACTH sekrēcija var izraisīt Kušinga sindromu, kā rezultātā pacientam var veidoties svara pieaugums, muskuļu atrofija un osteoporoze. Bērniem Kušinga sindroms arī var ietekmēt augšanu garumā (Sharma S. *et al.* 2015).

#### **1.4. Hipofīzes adenoma**

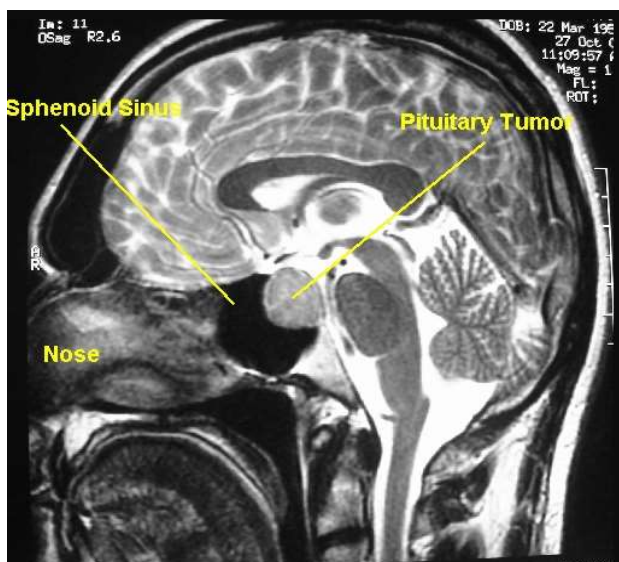
Aptuveni 15-20% no visiem intrakraniālajiem audzējiem ir tieši hipofīzes adenomas (HA), kas ir nemetastazējoši hipofīzes dziedzera audzēji, kuru pamatā ir epitēlijaudi (Melmed S. 2011). Simptomi, kas raksturo klīniski nozīmīgu hipofīzes adenomu, var būt dažādi, un ir atkarīgi no pašas hipofīzes adenomas veida, bet parasti hipofīzes adenomas izpaužas specifiski kā hormonu disbalanss organismā un nespecifiski kā galvassāpes, reiboņi un redzes traucējumi. Hipofīzes adenomas klasificē pēc to izmēriem, agresivitātes, endokrīnās aktivitātes un ekspresētajiem transkripcijas faktoriem (Levy A. 2004). 2017. gadā pasaules veselības organizācija (WHO) izdeva jaunu hipofīzes adenomu klasifikācijas sistēmu. WHO klasifikācijā termins „hormonu producējoša adenoma” ir nomainīts ar „adenohipofīzes šūnu izcelsmes adenomas”, kuras tālāka kategorizēšana balstās uz imunohistoķīmiskām analīzēm un transkripcijas faktoriem (1. tabula). Šī jaunā klasifikācijas sistēma ļauj precīzāk noteikt adenomas invazivitāti, ārstēšanas metodi un adenomas atjaunošanās risku (Lopes M. 2017).

1. tabula. WHO 2017. gada hipofīzes adenomu klasifikācija.

Table 1. WHO 2017 classification of pituitary adenomas.qq

Adenomas tips	Morfoloģija	Hormoni pēc imunohistokīmiskām analīzēm	Transkripcijas faktori
Somatotrofā adenoma	Blīvi granulēta adenoma	GH +/- PRL	PIT-1
	Izkliedēti granulēta adenoma	GH +/- PRL	PIT-1
	Mamosomatotrofā adenoma	GH + PRL (no vienas šūnas)	PIT-1, ER $\alpha$
	Somatotrofā- laktotrofā adenoma	GH + PRL (no atsevišķām šūnām)	PIT-1, ER $\alpha$
Laktotrofā adenoma	Izkliedēti granulēta adenoma	PRL	PIT-1, ER $\alpha$
	Blīvi granulēta adenoma	PRL	PIT-1, ER $\alpha$
	Acidofilo cilmes šūnu adenoma	PRL, GH	PIT-1, ER $\alpha$
Tireotrofā adenoma		$\beta$ -TSH	PIT-1
Kortikotrofā adenoma	Blīvi granulēta adenoma	ACTH	T-PITb
	Izkliedēti granulēta adenoma	ACTH	T-PITb
	Krūka šūnu adenoma ( <i>Crooke's cell adenoma</i> )	ACTH	T-PITb
Gonadotrofā adenoma		$\beta$ -FSH, $\beta$ -LH	SF-1, GATA2, ER $\alpha$
<i>Null cell</i> adenoma		Nav	Nav
Plurihormonāla adenoma	PIT-1 Plurihormonolālā adenoma	GH, PRL, $\beta$ -TSH	PIT-1
	Adenoma ar dažādām hormonu kombinācijām	ACTH/GH, ACTH/ PRL	Nav

Skatoties pēc aktivitātes un agresivitātes, adenomas var iedalīt aktīvās (notiek hormonu sekrēcija un ir klīniskā aina) vai arī klīniski neaktīvās HA (notiek hormonu sekrēcija, bet nav klīniskās ainas, kas atbilstu hormonu disbalansam) un pilnīgi neaktīvās HA (nav hormonu sekrēcija un klīniskās ainas) (Mayson S. un Snyder P. 2014). Tomēr ne visas klīniski neaktīvās adenomas ir klīniski nenozīmīgas, dažas neaktīvās HA var ātras augšanas rezultātā izplesties un radīt lielu spiedienu uz *fossa hypophysialis* sienīņu, kā rezultātā var veidoties audzēja invāzija spārnkaula dobumā (*sinus sphenoidalis*) (skatīt 3. attēlu), kas var radīt stipras galvassāpes. Bez invāzijas *sinus sphenoidalis* HA var veidot spiedienu uz *chiasma opticum*, kā rezultātā pacientam var veidoties redzes traucējumi, kā arī HA var apspiest pašu hipofīzi, izraisot hormonu hiposekrēciju (Levy A. 2004). Vēsturiski HA arī iedala pēc izmēriem, kur mikroadenomas raksturo izmēri, kas ir <10mm un makroadenomas, kuras izmēri ir >10mm. (Kovacs K. *et al.* 1996).



**3. attēls.** Hipofīzes makroadenoma un tās invāzija spārnkaula dobumā *sinus sphenoidalis* vizualizēta ar magnētisko rezonanses tomogrāfijas metodi – Bechara Y. Ghorayeb (<http://www.ghorayeb.com/transsphenoidanatomy.html>)

**Figure 3.** Pituitary macroadenoma with sphenoid sinus invasion visualised with magnetic resonance imaging method – Bechara Y. Ghorayeb (<http://www.ghorayeb.com/transsphenoidanatomy.html>)

Galvenās metodes, lai noskaidrotu hipofīzes adenomas klātbūtni, ir magnētiskās rezonanses izmeklējumi hipofīzes reģionā, Hamfrija redzes lauka testi, imunohistoķīmiskās metodes un analītiskās metodes, lai noskaidrotu attiecīgā hormona disbalansu (Levy A. 2004).

### 1.5. Hipofīzes adenomu iedalījums atkarībā no sekretētā hormona veida

Somatotropinoma ir adenoma, kura sastāv no somatofajām šūnām. Aktīva somatotropinoma ķermenī parasti izraisa palielinātu GH līmeni, kā rezultātā arī paaugstinās IGF-1 produkcija. Paaugstināta GH līmeņa visbiežākās sekas ir akromegālija, kas ir lēni progresējoša slimība un var izraisīt izmaiņas ķermeņa augumā un ķermeņa daļu proporcijās, būtiskas proporciju izmaiņas var parasti novērot sejai, kas izpaužas, kā paplašināts deguns, vaigu kauli un izteikti izaugumi pieres daļā. Bez auguma izmaiņām var arī būt dažādas neiropātijas, kardiovaskulārās izpausmes un arteriālā hipertensija. (Chanson P., Salenave S. 2008). Nepareizas akromegālijas aprūpes gadījumā var ievērojami samazināties pacienta dzīves kvalitāte, kā arī palielināties mirstība, tāpēc ir svarīgi precīzi diagnosticēt akromegāliju pēc iespējas ātrāk. Akromegāliju var diagnosticēt pēc ķermeņa sejas daļas somatiskajām izmaiņām, GH un IGF-1 līmeņa testiem un hipofīzes audzēja izmēriem (Reid T. *et al.* 2010).

Prolaktinoma – hipofīzes adenoma, kas veidojas no laktotrofajām šūnām un ir visbiežākais hormonu sekretējošās hipofīzes adenomas veids, aptuveni 40-60% no visām sekretējošām hipofīzes adenomām (Yatavelli R.K.R., Bhusal K. 2017). Mikroprolaktinomas (<10mm diametrā) ir audzēji, kuri ar laiku var samazināties izmērā un spontāni izzust, kā arī

neveic nozīmīgu hormonu sekrēciju, pēc kuras varētu sekot klīniskā aina. Bet palielināts PRL daudzums organismā ( $\geq 5000\text{mU/l}$ ) liecina par iespējamu makroprolaktinomu ( $>10\text{mm}$  diametrā). Aktīvas makroprolaktinomas izraisa hiperprolaktinēmiju, un tās simptomi ir atkarīgi no dzimuma. Sievietēm par hiperprolaktinēmijas simptomiem bieži liecina oligomenoreja (menstruācijas ilgst tikai vienu līdz divas dienas) vai amenoreja (menstruāciju trūkums). Vīriešiem prolaktinomas parasti ir asociētas ar erekcijas disfunkciju, libido zudumu un spontānu laktāciju (Levy A. 2004). Prolaktinomas visbiežāk ir sastopamas sievietēm vecumā starp 20 un 50 gadiem un 10x biežāk sastopama sievietēm, bet vīriešiem atšķirībā no sievietēm relatīvi biežāk veidojas makroprolaktinomas (Ciccarelli A. *et al.* 2005).

ACTH sekretējošās adenomas jeb kortikotrofās adenomas veido aptuveni 10-15% no visām hipofīzes adenomām, un šīs adenomas ir asociētas ar Kušinga sindromu. Lielākā daļa no ACTH sekretējošām adenomām pēc izmēriem ir makroadenomas (Kovacs K. *et al.* 2001). Bez ACTH sekretējošām adenomām, prolaktinomām un somatotropinomām vēl pastāv adenomas, kas ir saistītas ar TSH hormona sekrēciju, kuras pārsvarā izpaužas kā invazīvas makroadenomas, gonadotropīna sekretējošās adenomas, kuras bieži ir bez klīniskās ainas, kas atbilstu gonadotropīna hormona disbalansam, bet savas invazīvās dabas dēļ parasti izraisa redzes lauka traucējumus un galvassāpes. Plurihormonālā adenoma ir rets hipofīzes adenomas veids, kuras imunohistoķīmiskās analīzes uzrāda antivielu reakciju ar vairākiem hormoniem (Lopes M. 2015).

## 1.6. Hipofīzes adenomu epidemioloģija

Metaanalīzes konstatē, ka hipofīzes adenomas sastopamība vispārējā populācijā ir aptuveni 16,7% (Ezzat S. *et al.* 2004). Lai gan sastopamība populācijā ir augsta, tomēr 95% no 16,7% gadījumiem ir klīniski nenozīmīgi un visbiežāk paliek neaktīvas mikroadenomas stadijā bez jebkādas klīniskas ainas. Pētījums Beļģijas populācijā liecina, ka aptuveni 1 no 1000 cilvēkiem ir hipofīzes adenoma ar klīniski nozīmīgu ainu (Daly A. *et al.* 2006). Akromegālijas izraisošas somatotropinomas sastopamība populācijā ir ar 2,8 – 13,7 jauniem saslimšanas gadījumiem gadā uz 100'000 cilvēkiem (Lavrentaki A. *et al.* 2017). Prolaktinomu sastopamība ir ar frekvenci aptuveni 64 gadījumi uz 100'000 cilvēkiem gadā (Daly A. *et al.* 2006). Kušinga slimības asociētās kortikotrofās adenomas populācijā ir ar sastopamību – 0,7 saslimšanas gadījumi gadā uz 100'000 cilvēkiem (Monson J.P. 2000). TSH sekretējošās adenomas sastopamība populācijā – 0,15 saslimšanas gadījumi gadā uz 1'000'000 cilvēkiem (Onnestam L. *et al.* 2013).

## 1.7. Hipofīzes adenomu ģenētiskie cēloņi

Hipofīzes adenomas ir ar monoklonālu izcelsmi un no ģenētikas viedokļa hipofīzes adenomas var iedalīt divās grupās: pārmantotās/ģimenes (ģimenes vēsture ar hipofīzes adenomām) un sporādiskas (nav ģimenes vēstures ar hipofīzes adenomām). Aptuveni 5% no HA gadījumiem ir ģimenes hipofīzes adenomas. Tās iedala divās grupās: izolētās HA grupa (FIPA – *familial isolated pituitary adenoma*), kur noteiktu *germline* DNS gēnu mutācijas rezultātā veidojas tikai HA, un sindromiskā grupa, kur noteiktu *germline* DNS gēnu mutāciju rezultātā bez HA var attīstīties arī citi audzēji. Sporādiskas hipofīzes adenomas ir apmēram 95% gadījumos, un tās arī iedala divās grupās: sporādiskas HA, kuras izraisa zināmas mutācijas *germline* DNS, bet bez slimības ģimenes vēstures un sporādiskas HA bez mutācijām *germline* DNS – kā cēlonis ir somatiskas mutācijas vai epiģenētiskas izmaiņas (Lecoq A. *et al.* 2015), (Gadelha M. R. *et al.* 2013).

Pazīstamākā FIPA mutācija ir arilhidrokarbonreceptora mijiedarbības proteīna gēnā (*AIP*) (Zhang Q. *et al.* 2017). *AIP* gēns kodē 330 aminoskābju garu proteīnu, kurš ir ar audzēju nomācošu aktivitāti tieši hipofīzes dziedzerī (Trivellin G., Korbonits M. 2011). Mutācijas, kas izmaina proteīna funkcionalitāti, visbiežāk noved pie GH sekretējošas HA attīstības. *Germline AIP* mutācijas, kas izraisa FIPA, tiek nodotas nākamajai paaudzei autosomāli dominantā veidā, un, ja viens no vecākiem ir ar *AIP* saistītu FIPA, tad katram pēcnācējam ir 50% iespēja mantot *AIP* gēna patogēnisko variantu. Penetrance pārmantotam patogēnajam *AIP* variantam ir aptuveni 15-30%, tādēļ nav iespējams precīzi paredzēt vai indivīdam ar šo variantu attīstīsies audzējs (Ibanez-Costa A., Korbonits M. 2017).

Sindromiskās grupas mutācijas ir parasti saistītas ar multiplās endokrīnās neoplāzijas gēnu (*MEN1*) un ciklīnatkarīgās kināzes inhibitora 1B (*CDKN1B*) gēnu (Zhang Q. *et al.* 2017). *MEN1* ir gēns, kurš kodē proteīnu 610 aminoskābju garu proteīnu *menin*, kas ir transkripcijas regulators ar audzēju nomācošu aktivitāti. Mutācijas *MEN1* izraisa autosomāli dominantu saslimšanu, kuru arī dēvē par MEN1 jeb 1. tipa multiplo endokrīno neoplāziju. MEN1 sindroma rezultātā ievērojami palielinās risks saslimt ar hipofīzes adenomu un citiem endokrīno dziedzeru audzējiem. Pētījumā par MEN1 pacientiem Francijā un Beļģijā, tika konstatēts, ka aptuveni 42% MEN1 pacientu attīstās hipofīzes adenomas sākot no 12 gadu vecuma (Thakker P. *et al.* 2012), (Vergès B. *et al.* 2002). Latvijas populācijā tika konstatēts, ka viena nukleotīda polimorfisms (SNP) *MEN1* pozīcijā rs2959656 ir saistīts ar paaugstinātu risku hipofīzes adenomas attīstībai (Peculis R. *et al.* 2016).

*CDKN1B* mutācija, kas izraisa slimību MEN4 (4. tipa multiplā endokrīnā neoplāzija), tika atklāta, kad noskaidrojās, ka aptuveni 10% HA adenomas pacientiem mēdz būt fenotips, kas līdzinās MEN1 fenotipam, bet ģenētiskās analīzes neuzrāda nekādas mutācijas *MEN1* gēnā. Tas ir tādēļ, ka menīns regulē *CDKN1B* transkripciju, turklāt *CDKN1B* ekspresijas produkts (196 aminoskābju proteīns – p27) regulē šūnas ciklu, mijiedarbojoties ar ciklīnatarīgajām kināzēm. Hipofīzes adenomas gadījumā MEN4 izraisa ACTH sekretējošās HA, GH sekretējošās HA un hormonus nesekretējošās HA (NFPA) (Scherthaner-Reiter M. *et al* 2016).

Ģenētiskās izmaiņas sporādiskas izcelsmes hipofīzes adenomās parasti ir saistītas ar izmaiņām onkogēnu rajonos piemēram, G-proteīna aflu subvienības gēnā (*GNAS*), ubikvitīnspecifiskas proteāzes gēnā (*USP8*). Bez onkogēniem zināmas mutācijas, kas izraisa sporādiskas HA, ir somatostatīna receptorā – 5 (*SSTR5*). Arī *MEN1* un *AIP* mutācijas ir atrodamas sporādiskās HA (Marques P., Korbonits M. 2017). Populācijā aptuveni 3% pacientu ar sporādisku HA satur mutācijas *AIP* gēnā (Occhi G. *et al.* 2010). Sporādiskas HA ar *AIP* mutāciju ir daļēji rezistentas pret farmakoloģisku ārstēšanu ar somatostatīna analogiem. Kā arī sporādiskas hipofīzes adenomas ar zemu *AIP* ekspresiju parasti ir ar invazīvu raksturu (Denes J. *et al.* 2015).

*GNAS* kodē G-proteīna alfa subvienību. Pētījuma, kurā piedalījās 60 pacienti ar GH sekretējošām adenomām, 24 pacientiem (40%) tika atklātas vairākas somatiskas mutācijas *GNAS* gēnā (Arg201Cys, Arg201Ser, Arg201His, Gln227Arg, Gln227Leu). Šīs mutācijas traucē GTFāzes darbību, kā rezultātā šūnā adenilciklāze ir visu laiku aktīvā stāvoklī un notiek nepārtraukta šūnas stimulācija. GH sekretējošās adenomas ar pozitīvu *GNAS* mutāciju mēdz būt izmēros mazākas, bet sekretē intensīvāk IGF1 un GH nekā *GNAS* negatīvas GH adenomas (Freda P. *et al.* 2007).

*USP8* gēns kodē deubikvitinējošu enzīmu, kas aizsargā augšanas faktora receptorus no degradācijas proteosomās. Aptuveni 62% no ACTH sekretējošām adenomām satur mutāciju *USP8* gēnā. *USP8* satur 14-3-3 proteīnu piesaistes motīvu. Fosforilējot *USP8* Ser718 atlikumu 14-3-3 proteīni var saistīties ar *USP8* 14-3-3 piesaistes motīvu. Mutācijas *USP8* gēnā samazina 14-3-3 piesaistes motīva spējas saistīt 14-3-3 proteīnus. Tieši *USP8* Ser718 mutācija bieži ir konstatējama ACTH sekretējošu HA pacientiem (Ma Z. *et al.* 2015).

*SSTR5* gēns kodē somatostatīna receptora 5. apakštipu. Somatostatīnam, mijiedarbojoties ar somatostatīna receptoriem (SSTRs), notiek GH hormona sekrēcijas regulācijā, kā arī audzēja proliferācijas regulācija (Bell G., Reisine T. 1993). *SSTR5* receptori ir visvairāk ekspresētie tieši somatotropinomās un SNP (rs34037914 un rs642249) *SSTR5* ir tieši saistīti ar akromegāliju,

kas norāda, ka polimorfismi *SSTR5* var būt saistīti ar aktīvu somatotropinomu (Ciganoka D. *et al.* 2011).

Izmaiņas tumoru surpresoros *TP53*, *RBI* un onkogēnos *HRAS*, *MYC* ir reti atrodamas un pārsvarā ir tikai izteikti agresīvas dabas HA vai hipofīzes karcinomās (Gadelha M. R. *et al.* 2013).

### 1.8. Cirkulējošā šūnu brīvā DNS

Šūnu brīvā DNS (cfDNA) ir šūnu kodola divpavediena DNS fragmenti, kuri ir aptuveni 160 - 180bp gari. Šāds garums atbilst DNS, kura ir uztīta uz vienas nukleosomas kopā ar degradētu nukleosomas savienojošo DNS fragmentu (*linker DNA*). Šie fragmenti ir sastopami cilvēka ķermeņa šķidrumsos, piemēram, asinīs un urīnā. Asinsritē esošo cfDNA dēvē par cirkulējošo šūnu brīvo DNS (ccfDNA). Mehānismi, kā tieši cfDNA nonāk ķermeņa šķidrumsos, līdz galam vēl nav izpētīti, bet pastāv galvenie pieņēmumi, ka cfDNA ķermeņa šķidrumsos nonāk šūnu apoptozes vai nekrozes dēļ (Ivanov M. *et al.* 2015), (Elshimali, Y. I. *et al.* 2013), (Jahr S. *et al.* 2001). Tomēr jaunākie pētījumi liecina par to, ka daļa no plazmā esošā ccfDNA nāk no šūnu sekretētajām eksosomām, norādot uz to, ka tā iespējams iesaistās starpšūnu komunikācijā (Bronkhorst A. B. *et al.* 2016), (Fernando M. R. *et al.* 2017).

ccfDNA izpētei pēdējā laikā ir pievērsta uzmanība, jo ir pierādīts, ka grūtniecības periodā, autoimūno slimību gadījumā, miokarda infarkta un vēža gadījumā ccfDNA koncentrācija plazmā ievērojami palielinās salīdzinājumā ar praktiski veselu cilvēku (Ma X. *et al.* 2017). Ļaundabīgo audzēju gadījumā nekontrolēta šūnu augšana var izraisīt apgrūtinātu vaskularizāciju, kas noved pie audzēja un normālu šūnu hipoksijas inducētas nekrozes vai p53 atkarīgas / neatkarīgas apoptozes. Rezultātā ļaundabīgo audzēju gadījumos ir palielināta kopējā ccfDNA koncentrācija, kā arī 10 – 90% no kopējā ccfDNA mēdz būt audzēju šūnu izcelsmes, kuru dēvē par ctDNA (*circulating tumor DNA*) (Jahr S. *et al.* 2001). Pētījumā, kur tika salīdzinātas plazmas ccfDNA koncentrācijas starp plaušu vēža pacientiem un veseliem cilvēkiem, izmantojot kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas metodi, vidējās ccfDNA koncentrācijas plaušu vēža pacientiem bija 22.6 ng/ml, bet veseliem cilvēkiem 10.4 ng/ml (Yoon K. A. *et al.* 2009). ccfDNA koncentrācijas analīzes var izmantot, lai neinvazīvi diagnosticētu potenciālu ļaundabīgo audzēju recidīvu pēc terapijas, kā arī lai prognozētu pacientu mirstības risku audzēja metastāžu gadījumos (Valpione S. *et al.* 2018), (Hu W. *et al.* 2017).

## 1.9. Audzēja mutācijas cirkulējošajā šūnu brīvajā DNS

Pēdējo gadu laikā tiek pētīts, vai ccfDNA izmantošana ļaundabīgo audzēju diagnostikā (šķidrā biopsija) var aizvietot audu paraugu biopsiju. Šķidrā biopsija var atvieglot diagnozes noteikšanu pacientiem ar veselības stāvokli, kas nav piemērots audu parauga biopsijai. Salīdzinājumā ar audu paraugu biopsiju, ccfDNA iegūšana ir mazāk invazīva un plazmā esošā audzēja izcelsmes ccfDNA frakcija var precīzi atspoguļot daļu no audzēja genoma. Tādēļ sekvenējot no plazmas izdalītu ccfDNA ir iespējams minimāli invazīvi detektēt audzēja genomā esošās somatiskās mutācijas (Ma X. *et al.* 2017). Audzēji var būt heterogēni (genomiskas un fenotipiskas atšķirības starp audzēja šūnām). Klīnikā precīzu heterogēna audzēja genoma aprakstīšanu bieži ierobežo biopsijas parauga daudzums un biopsijas vieta. Šādos gadījumos ccfDNA sekvenēšana var potenciāli sniegt precīzāku informāciju par kopējo audzēja genomu salīdzinājumā ar audu paraugu biopsiju no primārā audzēja. Attiecīgi ļaujot optimizēt terapiju un kontrolēt audzēja progresiju terapijas laikā konkrētam pacientam (Adamo P. *et al.* 2017). Khan K. *et al.* parādīja, ka ccfDNA analīzes var izmantot, lai optimizētu pacientu terapiju kolorektālā vēža gadījumā. Pētījuma autori pierādīja, ka no plazmas izdalītā ccfDNA ir iespējams detektēt iepriekš zināmas *RAS* gēnu saimes mutācijas, kas veido rezistenci pret epidermālā augšanas faktora (EGFR) inhibīcijas terapijām (Khan K. H. *et al.* 2018). 2016. gadā ASV Pārtikas un zāļu pārvalde (FDA) apstiprināja *EGFR* 19. un 21. eksona mutāciju testu “*cobas EGFR mutation test V2*”, izmantojot no plazmas izolētu ccfDNA, lai noskaidrotu pacientus ar metastātisko nesīkšūnu plaušu vēzi (*non-small cell lung cancer*), kuri ir piemēroti terapijai ar erlotinibu (*JAK2 V617F* mutantās kināzes inhibitori) (ASV Pārtikas un zāļu pārvalde 2016).

Parasti zemās audzēja izcelsmes ccfDNA koncentrācijas un normālu šūnu izcelsmes ccfDNA piemaisījumu dēļ ir apgrūtināta audzējam raksturīgo mutāciju detektēšana ar metodēm, kā Sangerā sekvenēšana un reālā laika PCR (polimerāzes ķēdes reakcija). Tādēļ ir jāpielieto metodes, kas var detektēt izmaiņas ar zemu alternatīvās alēles īpatsvaru ( $> 0.1\%$ ) (Mehrotra M. *et al.* 2018). Pašlaik viena no visplašāk pielietotajām metodēm mutāciju detektēšanai ccfDNA ir nākamās paaudzes sekvenēšana (NGS), kas ir balstīta masīvās paralēlās sekvenēšanas principu. Ar NGS metodi mutācijas ccfDNA ir iespējams detektēt ar divu veidu metodēm: mērķētās sekvenēšanas metodi, lai atrastu izmaiņas noteiktos reģionos (parasti iepriekš zināmos), un pilna eksoma/genoma sekvenēšanu, kura pārbauda plašākas DNS izmaiņas (Volik S. *et al.* 2016).

## 1.10. Adenomas izcelsmes cirkulējošā šūnu brīvā DNS

Lai gan vairākkārt ir pierādīts, ka audzēja izcelsmes ccfDNA ir iespējams detektēt ļaundabīgo audzēju pacientiem, tomēr ir maz pētījumu par dažādu orgānu adenomu izcelsmes ccfDNA detektēšanu. Adenomas salīdzinājumā ar ļaundabīgiem audzējiem nav metastazējošas, ir mazāk invazīvas un rada mazāk nelabvēlīgu ietekmi uz blakus audiem (Koten J.W. *et al.* 1993). Šo iemeslu dēļ kopējās ccfDNA koncentrācijas neatšķiras no praktiski veselīem cilvēkiem, un adenomas genoma mutācijas alēles īpatsvars ccfDNA var būt zem detekcijas sliekšņa. Pētījumā, kur tika novērtētas adenomas izcelsmes ccfDNA detektēšanas iespējas kolorektālās adenomas pacientiem, nebija novērojamas statistiski nozīmīgas ccfDNA koncentrācijas izmaiņas plazmā salīdzinājumā ar kontroli (kontroles grupa: 7,5 ng/ml, pacientu grupa 6,3 ng/ml,  $P = 0,19$ ). Kā arī izmantojot pilienu digitālo PCR (ddPCR, *droplet digital PCR*) metodi, kas pētījumā spēja detektēt izmaiņas ar aptuveni 0.5% alēles īpatsvaru, autoriem arī neizdevās detektēt mutācijas onkogēnos *BRAF* un *KRAS*, kuras bija iepriekš atrastas audu biopsijas paraugos (Myint N. N. M. *et al* 2018).

Līdz šim vēl nav veikts neviens pētījums par HA izcelsmes ccfDNA detektēšanas iespējamību. Bet mērķētas ccfDNA analīzes uz konkrētiem ģenētiskajiem marķieriem ļautu minimāli invazīvi novērtēt HA īpašības. Piemēram, mērķētas analīzes uz tumora supresoriem *TP53*, *NM23*, *RBI* ļautu minimāli invazīvi novērtēt HA invazivitāti un malignās transformācijas risku (Lenders N. un McCormack A. 2018), (Suhardja A. *et al.* 2001). Mērķētas analīzes uz *GNAS* gēnu ļautu izvērtēt somatotropinomas pacientus, kuriem veidotos labāka atbilde uz terapiju ar oktreotīdu (viens no somatostatīna analogiem). Jo 40% no somatotropinomām satur somatiskās mutācijas *GNAS* gēnā (Freda P. *et al.* 2007). Somatotropinomas ar mutācijām *GNAS* gēnā mēdz būt mazāk invazīvas un vieglāk pakļaujas terapijai ar oktreotīdu, lai normalizētu GH sekrēciju un samazinātu audzēja masu (Song Z. J. *et al* 2016), (Efstathiadou Z. A. *et al* 2015).

## 1.11. Mikro RNS raksturojums un biogēze

Mikro RNS (miRNS) ir aptuveni 22 nukleotīdu garas nekodējošas vienpavediena ribonukleīnskābes molekulas un ir atrodamas gandrīz visos eikariotos (Pogue A. I. *et al.* 2014). miRNS sākotnējais priekštecis ir pri-miRNS, kura tiek iegūta transkripcijas vai introna procesēšanas rezultātā. Transkripciju šūnas kodolā no miRNS lokusa veic RNS polimerāze II vai III. Kad ir izveidota pri-miRNS, tā tiek modificēta 5' galā ar GpppN kepa struktūru (7-metilguanozīns) un 3' galā poliadenilēta. Modificēto pri-miRNS šūnas kodolā tālāk sašķel

DROSHA/DGCR8 komplekss, rezultātā izveidojas matadatas (*hairpin*) struktūras pre-miRNS. Eksportīns-5 (XPO5) transportē pre-miRNS uz citoplazmu, kur to piesaista TRBP-Dicer1 kompleksa TRBP proteīns. Kompleksam piesaistīto pre-miRNS sašķel Dicer1, izveidojot nobriedušu miRNS. Nobriedušas miRNS viena no ķēdēm tālāk tiek piesaistīta argonautproteīnam (AGO) proteīnam un veido miRISC ribonukleoproteīnu kompleksu (miRNS inducēts gēnu noklusēšanas komplekss) (Shukla G. C. *et al.* 2011), (Fareh M. *et al.* 2016).

Lai gan lielākā daļa no miRNS ir iekššūnas, ir sastopamas arī ārpusšūnas miRNS, piemēram, asinsritē (cirkulējošās miRNS). Ārpusšūnas miRNS, pretēji iekššūnas, ir stabilas pret ribonukleāzēm, augstām un zemām temperatūrām un pH vērtībām. Viens no skaidrojumiem ārpusšūnu miRNS stabilitātei nelabvēlīgos vides apstākļos ir to atrašanās eksosomās un citās ārpusšūnu vezikulās. Ķermeņa šķidrums tiek aktīvi sekretētas ārpusšūnu vezikulās iekļautas miRNS, un *in-vitro* pētījumi norāda, ka tās var iesaistīties starpšūnu komunikācijā izmainot uztvērējšūnas gēnu ekspresiju. Līdzīgi kā cfDNA gadījumā, ārpusšūnu miRNS saturu arī ietekmē šūnu apoptoze (Sohel M. H. 2016). Šobrīd aktīvi tiek pētīts ārpusšūnu miRNS potenciālais pielietojums audzēju diagnostikā un prognostikā, jo ārpusšūnu miRNS saturs var korelēt ar audzēja aktivitāti (Ieva, A *et al.* 2014).

## 1.12. Mikro RNS funkcijas

Cilvēka organismā miRNS nepieciešamas normālai organisma embrionālai attīstībai un homeostāzes uzturēšanai, jo tās regulē šūnu diferencēšanos, proliferāciju un apoptozi. Mutācijas miRNS gēnos, kā arī izmaiņas miRNS ekspresijas profilā ir asociētas ar vairāku slimību izraisīšanu un attīstību. Klīniski nozīmīgas slimības, kurās ir novērojamas miRNS ekspresijas profilu izmaiņas, ir ateroskleroze, išēmiskā kardiomiopātija, autoimūnās slimības un onkoloģiskās slimības (Ardekani A. M. un Naeini M. M. 2010), (Sahu M. un Mallick B. 2018). miRNS regulē arī hipofīzes dziedzerā embrionālo attīstību. Zhang Z. *et al.* mājas pelēm *Mus musculus* veica *DICER1* (nepieciešams miRNS nobriešanai) gēna dubultu izdzēšanu (*double knockout*). Autori novēroja, ka *DICER1* negatīvām pelēm veidojas anteriorās hipofīzes dziedzerā anormāla attīstība un vispārīgi augšanas traucējumi. Pētījuma autori secināja, ka viens no pamatojumiem novērotajam rezultātam ir tieši miRNS miR-26b funkcijas zudums. miR-26b represē Lef-1 transkripcijas faktora translāciju, kurš represē Pit-1 promotera aktivitāti. Anteriorai hipofīzei Pit-1 faktors ir nepieciešams, lai stimulētu šūnu diferenciāciju un veidotos somatotrofu, tireotrofu un laktotrofu šūnu līnijas (Zhang Z. *et al.* 2010).

miRNS galvenokārt iesaistās pēctranskripcionālā gēnu regulēšanā. Tās pēctranskripcionāli regulē aptuveni 60% no cilvēka proteīnu kodējošiem gēniem (Friedman R. C. *et al.* 2009). miRNS translāciju represē kopā ar miRISC ribonukleoproteīnu kompleksa proteīniem. miRISC kompleksa galvenie proteīni ir viens no četriem miRNS saistošiem AGO (1 – 4) proteīniem un 182 kDa glicīna-triptofāna atkārtojumu saturošs proteīns (GW182). miRISC kompleksā esošā miRNS komplementāri saistās pie mērķa mRNS 3' netranslētā reģiona (3' UTR). Pēc miRISC kompleksa piesaistes mērķa mRNS AGO proteīns veic sākotnējo represiju, inhibējot 5' GpppN kepa atkarīgu translāciju. AGO proteīns konkurē ar eikariotisko translācijas iniciācijas faktoru (eIF4E) par piesaisti kepa struktūrai. eIF4E ir nepieciešams, lai ribosoma savāktos ap mRNS. Papildus miRISC komplekss arī veicina mRNS degradāciju, kur mRISC proteīni PAN2-PAN3 katalizē 3' gala poli A sekvences deadenilēšanu. Pēc deadenilēšanas DCP1-DCP2 proteīni katalizē 5' GpppN kepa atšķelšanu. Kad 3' gals ir deadenilēts un 5' kepa struktūra ir atšķelta, mRNS noārda XRN1 5'-3' eksonukleāze (Fabiam M. R., Sonenberg N. 2012).

Ziņots, ka miRNS ne tikai regulē translāciju, bet iesaistās arī transkripcijas represijas regulācijā. *Benhamed M., et al.* novēroja, ka novecojušos fibroblastu kodolos miRNS let-7f kopā ar AGO2 saistās pie *CDCA8* un *CDC2* gēniem, kurus regulē E2F transkripcijas faktors, un veicina šo gēnu transkripcijas represiju (Benhamed M. *et al.* 2017). let-7 samazināta ekspresija ir novērota vairākos audzējos (gan ļaundabīgos, gan labdabīgos), ieskaitot HA, jo tās postranskripcionālās regulācijas mērķis ir *RAS* onkogēna transkripts (Qian Z. R. *et al.* 2009). Bez translācijas un transkripcijas represijas ir pierādīts, ka miRNS var iesaistīties arī translācijas aktivēšanā. Ar miRNP (miRNS ribonukleoproteīnu komplekss) saistīta miRNS kopā ar AGO2 un FXR1 proteīniem iesaistās translācijas aktivēšanā G0 fāzes šūnās, saistoties pie AU sekvenču bagātiem elementiem 3' UTR reģionā (Truesdell S. S. 2012).

### 1.13. Mikro RNS hipofīzes adenomās

Pēdējo gadu laikā pētnieki ir identificējuši vairākas miRNS izmaiņas, kuras ir saistītas ar HA tumorogēnēzi un audzēja attīstību. HA asociētas miRNS var būt ar audzēja stimulējošu vai nomācošu aktivitāti (Feng Y. *et al.* 2018). Vienas no pirmajām atklātajām audzēja nomācošas aktivitātes miRNS, kuras tika asociētas ar HA, bija miR-15a un miR-16-1. To gēni atrodas 13. hromosomas garā pleca q14 reģionā. Šis reģions ir bieži deletēts B šūnu hroniskās limfocitomas gadījumos (>50%) un hipofīzes adenomas gadījumos. Lai gan reģions satur tumora supresoru *RB*, tomēr cilvēku HA mutācijas pašā *RB* gēnā ir ļoti retas. Bet miR-15a un miR16-1 ekspresija apgriezti korelē ar somatotropīnu un prolaktīnu invazivitāti, kas liecina par to, ka

hipofīzes adenomas attīstību iespējams ietekmē miR-15a un miR16-1 delēcijas vai ekspresijas samazināšanās (Bottoni A. *et al.* 2005).

Nefunkcionējošās HA tika atklāts, ka miR-124a un miR-31 ekspresijas profili ir vairākkārt izmainīti salīdzinājumā ar normālu hipofīzi. miR-124a tika ekspresēta piecas reizes vairāk, bet miR-31 21 reizi mazāk. Šādi rezultāti norāda uz iespējamu miR-124a onkogenitāti saistībā ar nefunkcionējošām HA, kā arī miR-31 iespējams piemīt audzēja nomācoša aktivitāte (Liang S. *et al.* 2013). GH un PRL sekretējošām adenomām bieži ir raksturīga palielināta miR-23a, miR-23b un miR-24-2 ekspresija un samazināta miR26-b ekspresija. Savukārt ACTH sekretējošām adenomām ir raksturīga palielināta miR-30a, miR-30b, miR-30c ekspresija (Ieva, A *et al.* 2014).

## 2. Materiāli un metodes

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Reāģenti un izejvielas

2. tabula. Ķīmiskie reāģenti.

Table 2. Chemical reagents.

Reāģenti/Izejvielas	Tīrības pakāpe	Ražotājs	Valsts
100% Etanols	-	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV
96% Etanols (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	>99%	Jaunpagasts Plus	Latvija
25mM magnija hlorīds (MgCl <sub>2</sub> )	-	Solis BioDyne	Igaunija
Etīdija bromīds (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> )	>96%	SERVA	Vācija
20mM dNTP nukleotīdu maisījums	>99%	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV
6x Loading Dye	-	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV
„Top vision” agaroze	-	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV
“Sephadex” dekstrāns	-	GE Healthcare Life Sciences	ASV
HOT FIREPol 10x buferšķīdums B1 (Tris-HCl pH 8.7, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> )	-	Solis Biodyne	Igaunija
NucleoMag - NGS Clean-up and Size Select, magnētiskās lodītes	-	Macherey –Nagel	Vācija

3. tabula. Bioloģiskie preparāti un enzīmi.

Table 3. Biological reagents and enzymes.

Preparāts	Tīrības pakāpe	Ražotājs	Valsts
HOT FIREPol DNS polimerāze	>98%	Solis Biodyne	Igaunija
Eksonukleāze <i>E. Coli</i>	-	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV
Sārmainā fosfatāze <i>FastAP</i>	-	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV
100bp marķieris <i>GeneRuler</i> 100bp <i>DNA Ladder</i>	-	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV

4. tabula. Laboratorijā pagatavotie buferšķīdumi.

Table 4. Buffer solutions prepared in laboratory.

Buferšķīdumi	Sastāvs	1x atšķaidījumam (500ml)
TAE buferšķīdums x50	Tris bāze 121g, 250ml dH <sub>2</sub> O, 28,6ml ledus etiķskābe, 50ml 0,5M EDTA ar ph 8, X ml dH <sub>2</sub> O (lai gala tilpums būtu 500ml)	10ml TAE x50 490ml H <sub>2</sub> O

## 2.1.2. Reaģentu un izejmateriālu komplekti

5. tabula. Reaģentu un izejmateriālu komplekti.

Table 5. Kits containing materials and reagents.

Kita nosaukums	Kataloga nr.	Ražotājs	Valsts	Pielietojums	Saturs
<i>QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit</i>	1017647	Qiagen	Vācija	Cirkulējošās šūnu brīvās DNS izdalīšanai	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vakuuma sūkņa savienotājs</li> <li>Vakuma sūkņa savienotājs</li> <li>Kolonnas pagarinātājs 20ml</li> <li>Buferšķīdums ACB</li> <li>Buferšķīdums ACL</li> <li>Buferšķīdums ACW1</li> <li>Buferšķīdums ACW2</li> <li>Buferšķīdums AVE</li> <li>Proteināze K</li> <li><i>QiAMP mini</i> kolonna</li> <li>Savākšanas stobriņi 2ml</li> <li>NesējRNS</li> </ul>
<i>Ion Plus Fragment Library Kit</i>	4471252	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV	Bibliotēkas sagatavošanai <i>Ion Torrent</i> NGS.	<ul style="list-style-type: none"> <li>5 x <i>EndRepair</i> buferšķīdums</li> <li><i>EndRepair</i> enzīms</li> <li>10x Ligāzes buferšķīdums</li> <li>DNS ligāze</li> <li>Adapteris</li> <li>dNTP maisījums</li> <li><i>Low TE</i> buferšķīdums</li> <li><i>Nick Repair</i> polimerāze</li> <li>PCR praimeru maisījums</li> <li><i>Platinum PCR SuperMix</i></li> </ul>
<i>Ion Xpress Fragment Barcode, Adapters 49 – 64 Kit</i>	4474519	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV	Bibliotēkas sagatavošanai <i>Ion Torrent</i> NGS.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Svītrkodi 49 - 64</li> </ul>
<i>Agilent High Sensitivity DNA kit</i>	5067- 4626	Agilent	ASV	Paraugu sagatavošana analīzei uz bioanalizatora	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>High Sensitivity</i> DNS mikrosihēma</li> <li>Elektrodu tīrītājs</li> <li>Šļirce</li> <li>Šļirces kits</li> </ul>
<i>Agilent High Sensitivity DNA Reagents</i>	5067- 4627	Agilent	ASV	Paraugu sagatavošanai analīzei uz bioanalizatora	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>High Sensitivity DNA ladder</i></li> <li><i>High sensitivity</i> DNS marķieri 35/10380 bp</li> <li><i>High Sensitivity</i> DNS krāsviela</li> <li><i>High Sensitivity</i> DNS migrācijas gels</li> </ul>
<i>Blue Pippin 2%, 3% agarose cassette kits</i>	BDF201 0	Sage Science	ASV	Fragmentu selekcijai ar <i>Blue pippin</i> elektroforēzi	<ul style="list-style-type: none"> <li>2% agarozes gela kasete</li> <li>Marķieris V1</li> <li>3% agarozes gela kasete</li> <li>Marķieris Q3</li> </ul>
<i>Blue Pippin Reagent kit</i>	RSF2010	Sage Science	ASV	<i>Blue Pippin</i> 2% un 3% gela kasetes elektroforēzei	<ul style="list-style-type: none"> <li>Uznesšanas buferšķīdums / marķieru maisījums (V1 un Q3)</li> <li>1x elektroforēzes buferšķīdums</li> </ul>
<i>Qubit™ dsDNA HS Assay Kit</i>	Q32854	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV	DNS paraugu analīzei uz fluorometra	<ul style="list-style-type: none"> <li>Buferšķīdums</li> <li>Fluorescentā krāsviela</li> <li>Standartšķīdumi: 1, 2</li> </ul>

<i>exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit – RNS izdalīšanas kits</i>	77044	Qiagen	Vācija	miRNS izdalīšanai no 1ml plazmas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>exoEasy midi</i> centrifugēšanas kolonna</li> <li>• Savākšanas stobriņi (1.5ml; 1,5ml un 2ml)</li> <li>• Buferšķīdums XBP</li> <li>• Buferšķīdums XWP</li> <li>• <i>RNeasy MinElute</i> centrifugēšanas kolonna</li> <li>• <i>QIAzol</i> lizēšanas reaģents</li> <li>• Buferšķīdums RWT</li> <li>• Buferšķīdums RPE</li> <li>• dH<sub>2</sub>O</li> </ul>
<i>Monarch® PCR &amp; DNA Cleanup Kit</i>	NEB #T1030	New England Biolabs	Lielbritānija	DNS attīrīšanai	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolonnas saistīšanas buferšķīdums</li> <li>• Kolonnas</li> <li>• Savākšanas stobriņi</li> <li>• Kolonnas mazgāšanas buferšķīdums</li> <li>• Eluēšanas buferšķīdums</li> </ul>
<i>miRCURY LNA RT Kit</i>	339340	Qiagen	Vācija	cDNS sintēzei	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5x miRCURY RT reakcijas buferšķīdums</li> <li>• No ribonukleāzes atbrīvots ūdens</li> <li>• 10x miRCURY RT enzīmu maisījums</li> </ul>
<i>miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit</i>	339345	Qiagen	Vācija	qPCR reaģenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2x miRCURY SYBR Green maisījums</li> <li>• ROX references krāsa</li> <li>• No ribonukleāzes atbrīvots ūdens</li> </ul>
<i>miRCURY LNA miRNA PCR Assays</i>	339306	Qiagen	Vācija	Hemolīzes kontroles qPCR praimeris	<ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-451 assay</li> <li>• miR-23a assay</li> </ul>
<i>LEXOGEN Small RNA-Seq Library Prep Kit</i>	-	Lexogen	Austrija	miRNS bibliotēku sagatavošanai NGS uz Illumina MiSeq platformas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3'un 5' adapteri (A3, A5)</li> <li>• Ligēšanas reaģentu maisījums (LM1, LM2)</li> <li>• Ligēšanas enzīmu maisījums (E1, E2)</li> <li>• Reversās transkripcijas praimeris (RTP)</li> <li>• cDNS sintēzes reaģentu maisījums (FS)</li> <li>• Reversās transkripcijas enzīmu maisījums (E3)</li> <li>• dH<sub>2</sub>O</li> <li>• PCR reaģentu maisījums (PCR)</li> <li>• P5 praimeris (P5)</li> <li>• i7 indeksu praimeris (SRi)</li> <li>• Buferšķīdums (CB)</li> <li>• Buferšķīdums (CW)</li> <li>• Buferšķīdums (EB)</li> <li>• Attīrīšanas kolonnas</li> </ul>

### 2.1.3. Izmantotā aparātūra un datorprogrammas

6.tabula. Darbā izmantotās laboratorijas aparatūras.

Table 6. Laboratory equipment used in research.

Aparātūra	Ražotājs	Valsts
<i>Pharmacia Biotech EPS 600</i> elektroforēzes iekārta 120V	Pharmacia	Zviedrija
<i>Super-Vega</i> - vakuumsūknis	Gima	Itālija
<i>Eppendorf 5804</i> centrifūga	Eppendorf	Vācija
<i>Mili-Q A10</i> ūdens attīrīšanas ierīce	MERCK	Itālija
<i>Blue Pippin</i> elektroforēze	Sage Science	ASV
<i>Agilent 2100</i> bioanalizators	Agilent	ASV
<i>Sartorius BP610</i> svāri	MERCK	Itālija
<i>Biosan TBD-120</i> termobloks	Biosan	Latvija
<i>Eppendorf 5424 R</i> centrifūga ar regulējamu temperatūru	Eppendorf	Vācija
<i>LKB bromma – 2219 Multitemp II</i> inkubācijas vanna	LKB Bromma	Vācija
<i>Microspin FV – 2400</i> elektriskais maisītājs	Biosan	Latvija
<i>Herolab E.A.S.Y. 429 K</i> gela dokumentācijas fotokamera	Herolab	Vācija
<i>Herolab UVT-20 M/W</i> UV starojuma lampa	Herolab	Vācija
<i>IKA MS3</i> bioanalizatoru mikroshēmu maisītājs	MERCK	Itālija
<i>Qubit® 2.0</i> fluorometrs	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV
<i>Gene AMP PCR 9700</i> PCR termocikla aparatūra	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV
<i>ViiA 7</i> Reālā laika PCR sistēma	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV
<i>Illumina MiSeq</i> NGS platforma	Illumina	ASV
<i>IonProton</i> NGS platforma	ThermoFisher SCIENTIFIC	ASV

7. tabula. Darbā izmantotās datu apstrādes un vizualizācijas datorprogrammas.

Table 7. Computer programs used in research work.

Datorprogramma	Ražotājs / Autors	Valsts
<i>Integrative Genomics Viewer</i>	Helga Throvaldsdottir, James T. Robinson	ASV
<i>Burrows-Wheeler Aligner</i>	Li H., Durbin R.	-
<i>Samtools</i>	Li H., Durbin R.	-
<i>FastQC</i>	Babraham Bioinformatics	Lielbritānija
<i>FASTQ Groomer</i>	Blankenberg D. <i>et al.</i>	-
<i>FASTQC</i>	Andrews S.	-
<i>Filter FASTQ</i>	Blankenberg D. <i>et al.</i>	-
<i>Cutadapt</i>	Martin M.	-
<i>Htseq-count</i>	Anders S. <i>et al.</i>	-
<i>DESeq2</i>	Love M. I. <i>et al.</i>	-

## 2.1.4. Izmantotie oligonukleotīdi

Darbā izmantotie oligonukleotīdi (praimeru) tika izveidoti un validēti, izmantojot interneta resursus *Ensembl*, *Primer3Plus*, *Primer - Basic Local Alignment Search Tool*. Praimeru tika izveidoti tā, lai tie būtu piemēroti PCR ar ccfDNA - produkta garums nepārsniedz 140bp (ccfDNA minimālais garums). Praimeru tika sintezēti komerciāli (Microsynth, Šveice). Pirms praimeru lietošanas tie tika atšķaidīti ar dH<sub>2</sub>O, lai iegūtu gala koncentrāciju 10µmol. Informācija par praimeriem ir apkopota 8. tabulā.

**8. tabula.** Darbā izmantotie praimeru.

**Table 8.** Primers used in research.

Praimera nosaukums	Nukleotīdu secība ( <i>FW</i> : 5' – 3', <i>RS</i> : 3' – 5')	Pavairotā fragmenta garums (bp)
<i>VPS13D</i>	<i>FW</i> : TGGATTGCGTTGTCGTGGAT <i>RS</i> : CCTCCTGTCTGTCGCACAAA	136
<i>SPEN</i>	<i>FW</i> : TCGTTGGGACTCTCAGATGA <i>RS</i> : TCCAGATCTCGTACAGACCTT	108
<i>LDLRAD2</i>	<i>FW</i> : CCCCTGGCTTCAAGTTCTGT <i>RS</i> : TGACAGCACTGCGGTAAGG	135
<i>CLCNKA</i>	<i>FW</i> : CCACCAAGGTCTTCCGGAAG <i>RS</i> : CCCTCTGCACGATGCCTAC	115
<i>SMARCAD1</i>	<i>FW</i> : TGATTCAGGTTCTGATGTCCGGT <i>RS</i> : CACCAATTGAAGCATCTTGAAGGA	119
<i>PDE3A</i>	<i>FW</i> : TCTTTCTGGTGCTTTTAGTCCTGA <i>RS</i> : ACCTGGTCGACTTTGCTTTT	136
<i>MTFMT</i>	<i>FW</i> : ACTCAGTGGCATATTGAATGTTCA <i>RS</i> : CTCCAGTAACTGTGTCTCCGT	101
<i>PRPF8</i>	<i>FW</i> : CCCACGCTGAAGATCTCTC <i>RS</i> : CCCTCGATTCCAGCCCAC	106
<i>G6PC2</i>	<i>FW</i> : TCCATTCCCCTAACTGTGGTTG <i>RS</i> : GCACTAACTCTAGGCACCACT	102
<i>GPATCH4</i>	<i>FW</i> : GGAATGAGAAGGAGGACGC <i>RS</i> : TCCTCCAAGACCCCATCTT	140
<i>CLEC1B</i>	<i>FW</i> : ACCTCAAATGTAACACTTGACCT <i>RS</i> : AGTGGATTGAATATCTGGGTTCTGT	125
<i>RYR1</i>	<i>FW</i> : TCCAGTTCCACCAGCACTTC <i>RS</i> : GCGCAGGTTTTTCGTAGTCAG	125
<i>CCDC138</i>	<i>FW</i> : AGCAAACTGCAGTTGATTGT <i>RS</i> : TGGAACAGCCTGATACTCCAAAA	130
<i>FXR1</i>	<i>FW</i> : AGTTGCCTTGAGATGAGAGC <i>RS</i> : ATACGGGGTAAGAGGAGGGG	117
<i>MPRIP</i>	<i>FW</i> : CTAGGCCTCCACACACAAG <i>RS</i> : GCACCATGCTGTCTTCCCTA	106
<i>ATF4</i>	<i>FW</i> : TATCTGGGGTCTCCTCAGCA <i>RS</i> : ATCGTAAGGTTTGGGACGGG	105

### 2.1.5. Plazmas paraugi

Darbā izmantotie plazmas paraugi tika iegūti no 15 hipofīzes adenomu (makroadenomas) pacientiem sadarbībā ar Paula Stradiņa klīnisko universitātes slimnīcu. Pētījuma veikšanai saņemts Centrālās medicīnas ētikas komitejas atzinums (protokola Nr. 2/18-02-21) 2018. gada 21. februārī, un apstiprina, ka pētījums „Ar hipofīzes audzēju attīstību un norisi saistīto molekulāro faktoru izpēte” nav pretrunā ar bioētikas normām. Visi pētījumā iesaistītie HA pacienti brīvprātīgi ir parakstījuši informētas piekrišanas veidlapu par dalību pētījumā “Ar hipofīzes audzēju attīstību un norisi saistīto molekulāro faktoru izpēte”.

**9. tabula.** HA pacienti.

**Table 9.** PA patients.

Paraugs	Dzimums	Adenomas tips	Darba ietvaros pētīts
HA069 (AL0042)	Vīrietis	NFPA	miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA070 (AL0043)	Vīrietis	NFPA	Mērķēta ccfDNA sekvenčēšana un miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA071 (AL0044)	Vīrietis	NFPA	miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA073 (AL0046)	Vīrietis	NFPA	Mērķēta ccfDNA sekvenčēšana un miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA074 (AL0048)	Vīrietis	Somatotropinoma	miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA076 (AL0059)	Vīrietis	Prolaktinoma	miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA075 (AL0061)	Sieviete	Prolaktinoma	miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA091 (AL0063)	Sieviete	Somatotropinoma	miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA089 (AL0079)	Sieviete	Prolaktinoma	miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA092 (AL0081)	Vīrietis	NFPA	miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA080 (AL0082)	Sieviete	Somatotropinoma	miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA078 (AL0083)	Vīrietis	NFPA	miRNS ekspresijas izmaiņas pirms un pēc rezekcijas
HA065 (E03998)	Vīrietis	NFPA	Mērķēta ccfDNA sekvenčēšana
HA066 (E03999)	Vīrietis	NFPA	Mērķēta ccfDNA sekvenčēšana
HA067 (E04000)	Sieviete	NFPA	Mērķēta ccfDNA sekvenčēšana

HN – hormonus nesekretējoša

## 2.2. Metodes

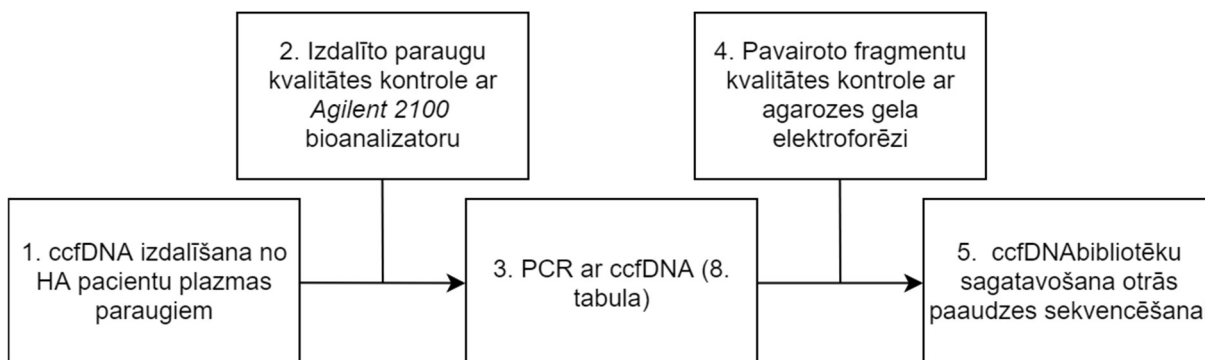
### 2.2.1 Pētījuma dizains mērķētai ccfDNA otrās paaudzes sekvenčēšanai

Pirms darba uzsākšanas projekta ietvaros tika veikta septiņu NFPA pacientu *germline* un somatiskās DNS eksoma sekvenčēšana ar *Illumina NextSeq*. Kurša darba izstrādes laikā atrastās mutācijas tika validētas ar Sangera sekvenčēšanu, un tika identificētas 16 mutācijas somatiskajā audzēja DNS piecos HA pacientos (10. tabula un 1. pielikums). Šī darba viens no galvenajiem mērķiem bija 16 atklāto mutāciju tālāka detekcija pacientu asins plazmā, izmantojot mērķētu (amplikonu bāzētu) NGS uz pusvadītāju sekvenčēšanas platformas (*Ion Proton™ System*).

**10. tabula.** Hipofīzes adenomas pacientos iepriekš atklātās mutācijas ar *Illumina NextSeq* somatiskajā audzēja DNS

**Table 10.** Mutations previously discovered in somatic pituitary tumor DNA with *Illumina NextSeq*.

Parauga kods	Somatisko mutāciju saturošais gēns
HA065	<i>VSP13D, SPEN, LDLRAD2</i>
HA066	<i>G6PC2, GPATCH4</i>
HA067	<i>CLCNKA, SMARCAD1, PDE3A, MTFMT, PRPF8</i>
HA070	<i>CLEC1B, RYR1, CCDC138, FXR1</i>
HA073	<i>MPRIP, ATF4</i>



**4. attēls.** Darba secība ccfDNA bibliotēku iegūšanai NGS.

**Figure 4.** Workflow for ccfDNA library obtainment for next generation sequencing.

Sākumā tika veikta ccfDNA izdalīšana no HA pacientu plazmas. Lai novērtētu izdalītās ccfDNA kvalitāti tika veikta paraugu analīze uz *Agilent 2100* bioanalizatora augstas jutības DNS mikroskāmas (*High Sensitivity DNA Chip*). Paraugiem, kuri atbilda kvalitātes standartiem, tālāk tika veikta PCR ar atbilstošajiem praimeriem (8. tabula). Lai novērtētu PCR reakcijas gala rezultātu un vai pavairoto fragmentu garums atbilst teorētiskajam, fragmentus vizualizēja 1,2% agarozes gelā. Sekmīgi pavairotajiem fragmentiem tālāk tika veikta bibliotēku sagatavošana NGS uz *Ion Proton™ System*.

## 2.2.2. Cirkulējošās šūnu brīvās DNS izdalīšana no asins plazmas

Strādājot ar asins plazmu, ir jāievēro darba drošība, jo pastāv infekciju risks. Darbs jāveic ar cimdiem un laboratorijas halātā. Plazmas paraugi, kuri ir nejauši izlieti uz galda vai grīdas, ir jāsavāc ar salveti un virsma ir jāapstrādā ar deterģentu. Paraugi tika izdalīti ar *QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)*.

### Darba gaita ccfDNA izdalīšanai no 2ml plazmas paraugiem ar *QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit* :

#### Pirms darba uzsākšanas:

Noskaidro vajadzīgo plazmas paraugu tilpums. Metode ir izstrādāta paraugu apstrādei ar tilpumiem: 1ml, 2ml, 3ml (šajā pētījumā ccfDNA izdalīja no 2ml plazmas). Ja pietrūkst attiecīgais tilpums (<1; <2 vai <3), tad attiecīgo plazmas paraugu papildina ar PBS buferšķīdumu, lai iegūtu vēlamu tilpumu.

Sagatavo ūdens vannu priekš 50ml centrifūgas stobriņiem (temperatūra 60°C) un termostatu priekš 2ml stobriņiem (temperatūra 56°C).

Buferšķīdumam ACL pievieno buferī AVE izšķīdinātu nesējRNS pēc tilpumiem, kuri apkopoti 11. tabulā.

**11. tabula.** Tilpumi buferšķīdumam ACL un buferšķīdumam AVE ar izšķīdinātu nesējRNS metodei ar 2ml plazmas paraugu.

**Table 11.** Volumes for buffer ACL and buffer AVE with dissolved carrier RNA for method involving 2ml plasma sample.

Paraugu skaits	Nepieciešamais ACL (ml)	Nepieciešamais AVE ar izšķīdinātu nesējRNS (µl)
1	1,8	5,6
2	3,5	11,3
3	5,3	16,9
4	7,0	22,5
5	8,8	28,1
6	10,6	33,8
7	12,3	39,4
8	14,1	45,0
9	15,8	50,6
10	17,6	56,3

1. 50ml centrifūgas stobriņā ar pipetes palīdzību pārnes 200µl QIAGEN Proteināzi K un 2ml plazmas paraugu.
2. Pievieno 1,6µl buferšķīdumu ACL, kurš satur 1µg nesējRNS, un veic pulsveida elektrisko maisīšanu 30 sekundes. Pārlicinās, vai ir izveidojies homogēns maisījums.
3. Inkubē 50ml stobriņu ar lizātu ūdens vannā 60°C uz 30 minūtēm.

4. Pēc inkubēšanas pievieno stobriņam 3,6ml buferšķīduma ACB un veic pulsveida elektrisko maisīšanu 15-30 sekundes.
5. Inkubē stobriņu ledū uz 5 minūtēm.
6. Savieno QIAamp mini kolonnu ar vakuumsūkņa savienotāju un pēc tam savieno ar vakuumsūkņa kolektoru. Kad kolonna ir savienota ar vakuumsūkņa kolektoru, tad kolonnu vēl savieno ar 20ml kolonnas pagarinātāju.
7. 50ml stobriņa saturu lēnām pārlej QIAamp mini kolonnas 20ml kolonnas pagarinātājā un ieslēdz vakuumsūkni. Kad lizāts ir izfiltrēts no kolonnas, tad izslēdz sūkni un samazina spiedienu vakuumsūkņa kolektorā līdz 0 mbar, un noņem 20ml kolonnas pagarinātāju.
8. Pievieno 600µl buferšķīduma ACW1 QIAamp mini kolonnai (kolonnu atstāj vaļā) un ieslēdz vakuumsūkni. Kad buferšķīdums ACW1 ir izfiltrēts, tad izslēdz sūkni un atbrīvo spiedienu līdz 0 mbar.
9. Pievieno 750µl buferšķīduma ACW2 QIAamp mini kolonnai (kolonnu atstāj vaļā) un ieslēdz vakuumsūkni. Kad buferšķīdums ACW2 ir izfiltrēts, tad izslēdz sūkni un atbrīvo spiedienu līdz 0 mbar.
10. Pievieno 96% - 100% etanolu QIAamp mini kolonnai (kolonnu atstāj vaļā) un ieslēdz vakuumsūkni. Kad buferšķīdums etanols ir izfiltrēts, tad izslēdz sūkni un atbrīvo spiedienu līdz 0 mbar.
11. QIAamp kolonnu aizver ciet un noņem no QIAvac, un ievieto kolonnu tīrā 2ml savākšanas stobriņā, un stobriņu ar kolonnu centrifugē (20000 x g; 14000 rpm; 3 minūtes)
12. QIAamp mini kolonnu atver un ievieto jaunā 2ml savākšanas stobriņā, un inkubē 56°C uz 10 minūtēm
13. QIAamp mini kolonnu ievieto 1,5ml savākšanas stobriņā, un 2ml stobriņu no 12. soļa izmet atkritumos. Pievieno 20 – 150µl AVE buferšķīdumu, pievienojot to tieši kolonnā esošās membrānas vidusdaļā, aizver kolonnas vāku un inkubē istabas temperatūrā 25°C uz 3 minūtēm.
14. Pēc inkubācijas kolonnu centrifugē (20000x g; 14000rpm; 1 minūte), lai eluētu uz membrānas esošās nukleīnskābes

### 2.2.3. Polimerāzes ķēdes reakcija

Ievērot darba drošību, strādājot ar PCR aparatūru. Aparatūrā iebūvētais termobloks bloks PCR reakcijas laikā var sasniegt augstas temperatūras, kas var radīt apdegumus. Paraugus no termobloka drīkst izņemt tikai tad, kad termobloka temperatūra ir sasniegusi aptuveni 40°C.

Reakcijas pagatavošanas laikā praimeru un ccfDNA pievienošana ir jāveic speciālās šiem procesiem paredzētās laboratorijas telpās, kā arī laboratorijas darbiniekam ir jāvelk laboratorijas halāts un aizsargcimdi, lai samazinātu nevēlamu piemaisījumu risku.

#### PCR darba gaita:

1. Atkarībā no reakciju skaita aprēķina nepieciešamo reaģentu tilpumus priekš *master mix*, kur vienai reakcijai:
  - 10X buferšķīdums B1 – 1,2 μL;
  - 25 mM magnija hlorīds (MgCl<sub>2</sub>) – 1,2 μL;
  - Nukleotīdu trifosfātu maisījums (dNTP mix) – 0,24 μL;
  - dejonizēts ūdens (dH<sub>2</sub>O) – X μL (dH<sub>2</sub>O tilpumu aprēķina tā, lai 10x buferšķīdums; B1 pret reakcijas kopējo tilpumu būtu 1 : 10);
  - *HOT FIREPol* DNS polimerāze;
  - Pavairojamais ccfDNA – 3 μL (nepievieno *master mix*);
  - Praimers FW – 0,4 μL (nepievieno *master mix*);
  - Praimeris RS – 0,4 μL (nepievieno *master mix*).

Reakciju tilpumu aprēķināšanai *master mix*:  $V_m = (n + 1) \times V_{r1}$ , kur „V<sub>r1</sub>” ir reaģenta tilpums vienai reakcijai un „n” reakciju skaits (Kopējais reakcijas tilpums 12 μL).

2. Reaģentus (izņemot polimerāzes enzīmu) pēc aprēķinātajiem tilpumiem un bez noteiktas secības pievieno 1,5 ml stobriņā.
3. *Master mix* pievieno polimerāzes enzīmu.
4. Pagatavoto *master mix* sadala pa 0,2 ml PCR stobriņiem tā, lai katrā stobriņā pēc DNS un praimeru pievienošanas gala tilpums būtu 12 μL.
5. Katram stobriņam pievieno attiecīgu FW praimeru un RS praimeru.
6. Katram stobriņam pievieno attiecīgo ccfDNA.
7. Stobriņus ievieto PCR aparatūrā un uzstāda attiecīgo PCR programmu
  - 1. Posms 95°C – 10 minūtes
  - 2. Posms 40 cikli: 1. 95°C – 10 sekundes, 2. 60°C – 30 sekundes, 3. 72°C – 30 sekundes.
  - 3. Posms 72°C – 7 minūtes

#### 2.2.4. Elektroforēze

Darbā tika izmantoti 1,2% agarozes gels un 1x TAE buferšķīdums, DNS fragmentu lielumi jau bija iepriekš zināmi (100 - 140bp). DNS vizualizēšanai gelam pievienoja etīdija bromīdu (absorbcijas spektrs 300 - 360nm emisijas spektrs 590nm).

Etīdija bromīds ir potenciāli kancerogēna viela, un, strādājot ar to, ir jāvelk aizsargcimdi un laboratorijas halāts, kā arī darba vieta pēc darba beigšanas jānotīra ar 70% etanolu.

Ievērot darba drošību, veicot gela vārīšanu mikroviļņu krāsnī. Lietot karstumizturīgus aizsargcimdus. Pirms stikla trauka likšanas mikroviļņu krāsnī, pārlicināties, vai trauka vāks nav pārāk cieši uzskrūvēts, lai novērstu augsta spiediena veidošanos vārīšanās laikā.

#### Darba gaita DNS fragmentu vizualizēšana agarozes gela elektroforēzē:

1. Pagatavo agarozes gelu, nosverot nepieciešamo daudzumu agarozes un pievienojot 100ml TAE (X% agarozes gels – Xg agaroze uz 100ml TAE).
2. Lai agaroze izšķīstu TAE buferšķīdumā, to silda mikroviļņu krāsnī uz augstāko jaudu aptuveni 1 – 2 minūtes.
3. Kad agaroze ir izšķīdusi un ir izveidojies homogēns viskozs šķīdums, tam pievieno 6μL etīdija bromīda.
4. Izvēlās darbam piemērotāko gela rāmi un to nostiprina, kā arī rāmī nostiprina ķemmīti. Nostiprinātā rāmī ielej nepieciešamo agarozes daudzumu.
5. Kad agaroze ir atdzisusi un ir izveidojies gels, tad izņem ķemmīti un to ar visu rāmīti ievieto elektroforēzes vannā tā, lai gals ar bedrītēm atrastos uz anoda pusi.
6. Pirms paraugus uznes uz gela tos sajauc ar uznešanas krāsvielu (~3μL DNS 1,5μL 6xLoadingDye), lai spētu redzēt DNS migrāciju, kā arī nodrošinātu to, ka DNS elektroforēzes laikā neizplūstu no bedrītes.
7. Paraugus uznes uz gela un brīvā bedrītē pievieno 2 - 3μL 100bp *GeneRuler* marķieri.

#### 2.2.5. Nukleīnskābju garuma un koncentrāciju noteikšana uz bioanalizatora

Darbā bioanalizators (*Agilent 2100*) tika pielietots, lai analizētu izdalīto ccfDNA un veiktu miRNS un ccfDNA bibliotēku kvalitātes kontroli pirms nākamās paaudzes sekvencēšanas. Paraugu sagatavošanai apskatei tika pielietoti *Agilent High Sensitivity DNA kit* un *Agilent High Sensitivity DNA Reagents* komplekti.

## Darba gaita paraugu uznešanai uz bioanalizatora mikroshēmas:

### Pirms darba uzsākšanas:

Reāģenti ir jāizņem no ledusskapja un jānovieto istabas temperatūrā aptuveni 30 minūtes.

1. Paraugu uznešanas rāmim uzskrūvē statīvā ievietotu šļirci.
2. Ievieto *High Sensitivity* DNS mikroshēmu paraugu uznešanas rāmī.
3. Atbilstoši marķētajā mikroshēmas bedrītē pievieno 9µl gela – krāsvielas maisījumu.
4. Pārlicināties, ka šļirces virzulis ir atvilks līdz 1ml un aizver paraugu uzneses rāmi.
5. Nospiež šļirces virzuli līdz to satver šļirces statīvs, lai gela – krāsas maisījums nonāk mikroshēmas kapilāros.
6. Pēc 60 sekundēm šļirces virzuli atbrīvo un pēc 5 sekundēm lēnām atvelk līdz 1ml.
7. Atver paraugu uznešanas rāmi un atbilstoši marķētajās mikroshēmas bedrītēs pievieno gela – krāsvielas maisījumu.
8. Pievieno marķieri un *ladder* atbilstoši marķētajās mikroshēmas bedrītēs.
9. Atlikušajās brīvajās bedrītēs pievieno DNS paraugus (1µl)
10. Mikroshēmu ievieto maisītājā uz 1 minūti, 2400rpm
11. Mikroshēmu ievieto bioanalizatorā *Agilent 2100* un uzstāda darbam paredzēto programmu.

### 2.2.6. No ccfDNA pavairoto fragmentu bibliotēku sagatavošana otrās paaudzes sekvencēšanai uz Ion Proton™ System platformas

Bibliotēku sagatavošanai tika pielietots *Ion Plus Fragment Library* reaģentu komplekts. Protokola izpildi veikt procesam atbilstošās laboratorijas telpās, lai samazinātu nevēlamu piemaisījumu risku.

Bibliotēku sagatavošanas protokols sastāv no četriem galvenajiem posmiem. 1. posms - *EndRepair*, kur notiek DNS parauga galu labošana. 2. posms - ligēšana, kur notiek DNS parauga galu savienošana ar adapteri un unikālas nukleotīdu sekvences svītrkodu 3. posms - *Blue Pippin* elektroforēze, lai atbrīvotos no cita garuma nevēlamiem DNS piemaisījumiem, kā adapteru dimēriem, kuri veidojas ligēšanas posmā. 4. posms - selektīva paraugu pavairošana, kur tiek amplificēti tikai sekmīgi ligēti interesējošie paraugi. Starp katru no šiem posmiem tika veikta parauga attīrīšana ar *NucleoMag* lodītēm, izņemot pēc 1. posma, kur paraugs tika attīrīts ar sefadeksu, lai novērstu pārāk lielus parauga zudumus, jo darbā tika izmantoti aptuveni 136bp gari DNS fragmenti, kas ir ārpus *NucleoMag* lodīšu attīrīšanas diapazona (150 – 800bp).

## Darba gaita no ccfDNA pavairoto fragmentu bibliotēku sagatavošanai *Ion Proton™ System* NGS:

### Pirms darba uzsākšanas:

Paraugs ir jāattīra ar FastAP/Exo, lai atbrīvotos piemaisījumiem pēc PCR.

#### 1. *EndRepair*

- 1,5µl stobriņā pārnes 39µl DNS parauga (ja nepieciešams paraugu var papildināt ar dH<sub>2</sub>O, lai iegūtu 39µl).
- Pievieno 10µl 5x *EndRepair* buferšķīdumu.
- Pievieno 10µl *EndRepair* enzīmu.
- Samaisa uz elektriskā maisītāja un inkubē istabas temperatūrā 30 minūtes.
- Veic parauga attīrīšanu ar sefadeksu.

#### 2. Ligēšana

- PCR* stobriņā pārnes 25µl parauga.
- Pievieno 5µl 10x ligēšanas buferšķīdumu.
- Pievieno 2µl svītrkodu.
- Pievieno 2µl PI adapteri.
- Pievieno 2µl dNTP.
- Pievieno 1µl ligāzi.
- Pievieno 4µl *Nick Repair* polimerāzi.
- Pievieno 9µl dH<sub>2</sub>O.
- Paraugu liek uz PCR aparatūras ar programmu.
  - 25°C – 15 minūtes
  - 72°C – 5 minūtes
  - 4°C bez laika limita
- Veic parauga attīrīšanu ar *NucleoMag* lodītēm attiecībā 1 : 1,15 un eluē 13µl *Low TE* buferšķīdumā.

#### 3. *Blue Pippin* elektroforēze

- Ieslēdz aparātu un kalibrē to ar kalibrācijas plati.
- Iestata programmu.
  - Izvēlas mērķa DNS fragmenta garumam atbilstošu kaseti
  - Bedrītēm, kuras tiks izmantotas, atzīmē - *tight*
  - Ieraksta mērķa DNS fragmenta garumu
- Pārbauda, vai gela kasetē nav izveidojušies gaisa burbuļi eluācijas bedrītē, kā arī pārbauda, vai gēls nav ieplaisājis.

4. Nomaina 40µl eluēšanas buferšķīdumu paraugu uznešanas bedrītēs, kuras izmantos.
5. Testē plati uz aparāta.
6. 13µl DNS paraugam pievieno 17µl *Low TE* buferšķīduma un 10µl platei atbilstošo krāsu (*Low TE* buferšķīdumu pievieno, lai parauga tilpums būtu 40µl).
7. No paraugu uznešanas bedrītēm izsūc 40µl buferšķīduma un ātri apmaina ar 40µl parauga maisījumu.
8. Plati ievieto aparatūrā un uzsāk elektroforēzes procesu.
9. Kad process ir beidzies, paraugu izsūc no eluēšanas bedrītes un ar 10µl *Low TE* buferšķīdumu skalo bedrīti.
10. Paraugam pievieno dH<sub>2</sub>O, lai sasniegtu gala tilpumu 60µl.
11. Paraugu attīra ar *NucleoMag* lodītēm attiecībā 1 : 1,15 un eluē 13µl *Low TE* buferšķīdumā.

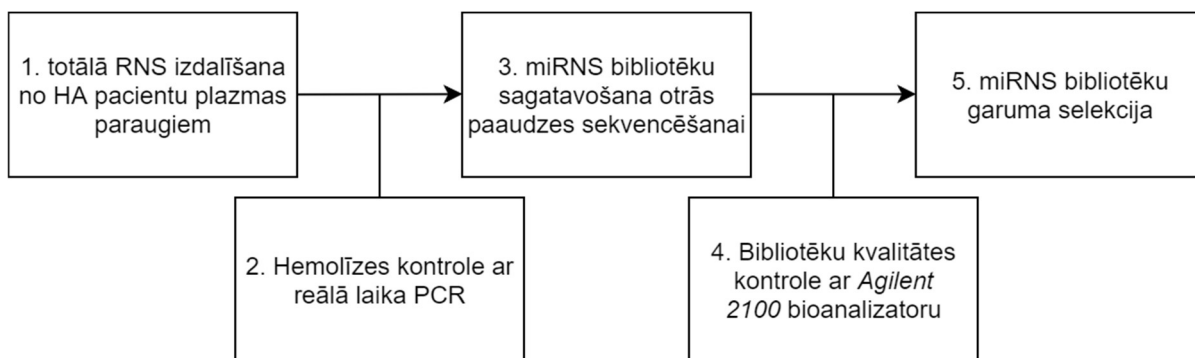
#### **4. Parauga pavairošana**

1. PCR stobriņā pārnes 12,5µl paraugu.
2. Pievieno 50µl *Platinum MasterMix*.
3. Pievieno 2,5µl *Library amplification Primer mix*.
4. Uzsūc PCR aparatūrā programmu.
  - 95°C – 5 minūtes
  - 8 cikli: 95°C – 15 sekundes, 58°C – 15 sekundes; 70°C – 1minūte
5. Attīra ar *NucleoMag* lodītēm attiecībā 1 : 1,15 un elulē 15µl *Low TE* buferšķīdumā.
6. Paraugu apskata bioanalizatorā, lai noskaidrotu DNS fragmenta garumu.

Pēc parauga sagatavošanas paraugus apskata uz bionalizatora (*Agilent 2100*), lai noskaidrotu vidējo fragmentu garumu ietvaros no 150 – 550bp, un uz fluorometra (*Qbit 2.0*), lai noskaidrotu paraugā esošo DNS fragmentu gala koncentrāciju.

### 2.2.7. Pētījuma dizains cirkulējošo miRNS sastāva izmaiņu noteikšanai

Darba otrs galvenais mērķis bija veikt cirkulējošo miRNS sastāva izmaiņu noteikšanu ar NGS *Illumina MiSeq*. Pirms rezekcijas un 24 stundas pēc rezekcijas 12 HA pacientiem (9. tabula). RNS tika izdalīta no plazmas paraugos esošajām eksosomām un ārpusšūnu vezikulām. Tādēļ izdalīšanai tika izmantoti plazmas paraugi, kuri bija iegūti no otrā un trešā asins ievākšanas vakutainera, lai novērstu RNS fonu no asins paraugu ievākšanas gaitā bojātajiem audiem. Kopējā darba secība ir apkopota 5. attēlā.



**5. attēls.** Darba secība cirkulējošo miRNS sastāva izmaiņu noteikšanai plazmā pirms HA rezekcijas un 24 stundas pēc rezekcijas.

**Figure 5.** Workflow for determining circulating miRNA profile changes in plasma before PA surgery and 24 hours after surgery.

Pirmajā posmā tika veikta RNS izdalīšana no plazmā esošajām eksosomām un ārpusšūnu vezikulām. Pēc totalās RNS izdalīšanas tika veikta hemolīzes marķieru kontrole, lai noskaidrotu, vai bez eksosomu un ārpusšūnu vezikulu izcelsmes RNS, ir papildus RNS piemaisījumi no hemolizētām sarkanajām asins šūnām, kas būtiski var ietekmēt gala rezultātu precizitāti. Izdalītajiem paraugiem, kuri atbilda hemolīzes testa prasībām, tālāk tika veikta miRNS bibliotēku sagatavošana NGS uz *Illumina MiSeq* platformas. Bibliotēku sagatavošanas beigu posmā tika veikta kvalitātes kontrole ar *Agilent 2100* bioanalizatoru, lai noskaidrotu adapteru dimēru un citu mazo nekodējošo RNS garumam neatbilstošu nukleīnskābju piemaisījumu daudzumu, kas var aizņemt sekvencēšanas kapacitāti. Paraugiem, kuri saturēja adapteru dimērus un citus nevēlamus nukleīnskābju piemaisījumus tika veikta fragmentu selekcija, lai sekvencēšanas laikā tiktu iegūti pēc iespējas vairāk miRNS nolasījumi.

RNS izdalīšana no paraugiem pirms un pēc rezekcijas, kā arī bibliotēku sagatavošana un fragmentu selekcija paraugiem pirms un pēc rezekcijas tika veikta vienlaicīgi, lai novērstu miRNS sastāva izmaiņas, kuras var rasties metožu izpildes gaitā.

## 2.2.8. RNS izdalīšana no asins plazmas

Darbs ar RNS ir jāveic sterilā vidē lamināras plūsmas skapī, lai novērstu ribonukleāžu kontamināciju. RNS izdalīšana no eksosomām un ārpusšūnu vezikulām tika paveikta izmantojot *exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit*.

### **Darba gaita RNS izdalīšanai no 1ml plazmas paraugiem ar *exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit*:**

#### **Pirms darba uzsākšanas:**

Buferšķīdumiem RWT un RPE pirms lietošanas ir jāpievieno 96% - 100% etanols (tilpums norādīts uz buferšķīdumu flakoniem).

Plazmas paraugus ir ieteicams nocentrifugēt pie 16000g un pārnest jaunās stobriņos, lai novērstu iespējamu dažādu šūnu daļiņu pārnesi tālākos posmos.

1. Pievieno buferšķīdumu XBP plazmas paraugiem 1 : 1 tilpuma attiecībā un samaisa uzreiz invertējot stobriņu piecas reizes.
2. Parauga un XBP maisījumu pārnes uz *exoEasy* centrifugēšanas kolonnu un centrifugē 1 minūti pie 500g. Kolonnas šķidruma savākšanas stobrā lieko šķidrumu izlej un kolonnu ievieto atpakaļ stobrā.
3. Pievieno 3,5ml buferšķīdumu XWP un centrifugē piecas minūtes pie 5000g, lai nomazgātu kolonnas membrānu. Lieko šķidrumu izmet kopā ar šķidruma savākšanas stobru un pārnes centrifugēšanas kolonnu jaunā savākšanas stobrā.
4. Pievieno 700µl QIAzol lizēšanas buferšķīdumu un kolonnu centrifugē 5 minūtes pie 5000g. Lizātu pārnes jaunā 2ml stobriņā.
5. Lizātu samaisa uz elektroniskā maisītāja un inkubē istabas temperatūrā uz 5 minūtēm.
6. Lizātam pievieno 90µl hloroformu un stobriņu spēcīgi maisa 15 sekundes. Pēc samaisīšanas paraugu inkubē istabas temperatūrā 2 – 3 minūtes.
7. Paraugu centrifugē 15 minūtes pie 12000g un 4°C. Pēc centrifugēšanas augšējo caurspīdīgo slāni pārnes jaunā stobriņā, izvairās no vidus slāņa pārnesi (DNS slānis).
8. Atkarībā no pārnestā augšējā slāņa daudzuma, paraugam pievieno divas reizes vairāk 100% etanola un samaisa ar pipetēšanas metodi.
9. Paraugu pārnes *RNeasy MinElute* centrifugēšanas kolonnā. Procesu atkārto, ja paraugs ir vairāk par 700µl, jo kolonnas tilpums ir 700µl. Kolonnu centrifugē 15 sekundes pie >8000g (istabas temperatūrā). Lieko šķidrumu izlej atkritumos.
10. Pievieno 700µl buferšķīdumu RWT un kolonnu centrifugē 15 sekundes pie >8000g (istabas temperatūrā). Lieko šķidrumu izlej atkritumos.

11. Pievieno 500µl buferšķīdumu RPE un kolonnu centrifugē 15 sekundes pie >8000g (istabas temperatūrā). Lieko šķidrumu izlej atkritumos. Procesu atkārto, bet centrifugē 2 minūtes pie >8000g (istabas temperatūrā).
12. Kolonnu pārnes jaunā savākšanas stobriņā un centrifugē 5 minūtes pie maksimāliem apgriezieniem, lai izžāvētu membrānu. Savākšanas stobriņu izmet.
13. Kolonnu ievieto jaunā 1.5ml savākšanas stobriņā un pievieno 14µl dH<sub>2</sub>O ūdeni tieši kolonnas membrānas vidū. Aizver kolonnas vāku un kolonnu inkubē 1 minūti. Pēc inkubēšanas centrifugē 1 minūti pie maksimāliem apgriezieniem, lai eluētu RNS.
14. Pēc 14. punkta paraugu var uzglabāt -80°C.

### 2.2.9. Hemolīzes kontrole ar reālā laika PCR

Hemolīzes kontrole darbā tika veikta ar *miRCURY LNA SYBR Green PCR* reaģentu komplektu uz *ViiA 7* reālā laika PCR sistēmu. Hemolīzes kontroles mērķis ir noskaidrot vai no plazmas izdalītās RNS avots ir eksomas un citas ārpusšūnas vezikulas vai hemolizētas sarkanās asins šūnas. Ja RNS avots ir hemolizētas asinsšūnas, tad paraugu nedrīkst izmantot tālākai analīzei, lai saglabātu datu precizitāti.

Pirms hemolīzes kontroles ir jāveic reversās transkripcijas reakcija. Tā tika veikta ar *miRCURY LNA RT* reaģentu komplektu. Darbs ar RNS ir jāveic sterilā vidē lamināras plūsmas skapī, lai novērstu ribonukleāžu kontamināciju. Lai novērstu iespējamu RNS degradāciju reversās transkripcijas reakcijas sagatavošanas laikā, reakcijas sagatavošana un RNS atkausēšana ir jāveic aukstumblokā.

#### Darba gaita reversās transkripcijas reakcijai ar *miRCURY LNA RT*:

1. Atkausē RNS paraugu un 5x *miRCURY RT* reakcijas buferšķīdumu uz ledus vai aukstumblokā. Atkausē dH<sub>2</sub>O istabas temperatūrā.
2. Aprēķina RNS parauga pievienojamo tilpumu atkarībā no izejas plazmas daudzuma un eluācijas tilpuma. Tilpumu aprēķina tā, ka, ja paraugs būtu izolēts no 200µl plazmas un eluēts 50µl tad, tad reakcijā jāizmanto 2 µl tilpums.
3. Sagatavo reversās transkripcijas *master mix* aukstumblokā, kur uz vienu paraugu:
  - 5x *miRCURY RT* reakcijas buferšķīdums - 2µl;
  - dH<sub>2</sub>O – x µl (atkarībā no aprēķinātā RNS tilpuma);
  - 10x *miRCURY RT* enzīmu maisījums - 1µl;
  - RNS – x µl (atkarībā no aprēķina 2. punktā), (nepievieno *master mix*);Reakcijas kopējais tilpums - 10µl.

4. Attiecīgu *Master mix* tilpumu pārnes uz 200µl PCR stobriņiem un pievieno RNS.
5. Inkubē istabas temperatūrā uz 60 minūtēm pie 42°C un pēc tam 5 minūtes 95°C.

**Darba gaita reversās hemolīzes kontroles reālā laika PCR ar *miRCURY LNA SYBR Green PCR*:**

**Pirms darba uzsākšanas:**

Reversajā transkripcijā iegūto cDNS paraugu atšķaida 1 : 30.

Sagatavo miR23a-3p un miR451a praimeru maisījumus. Katram pievieno 220µl dH<sub>2</sub>O un inkubē istabas temperatūrā 20 minūtes.

1. Sagatavo reakcijas maisījumu, kur uz vienu paraugu:
  - 2x *miRCURY SYBR Green master mix* – 5µl
  - *ROX* references krāsviela – 0,05µl
  - miR451a, miR23a-3p - 1µl
  - cDNS (1 : 30) – 3µl
  - dH<sub>2</sub>O – 1µl
2. Maisījumu samaisa un pārnes 200µl PCR stobriņos (katrā 7µl).
3. Paraugus ieliek *ViiA 7* PCR sistēmā un uzstāda attiecīgo programmu:
  - 1. posms: 2min – 95°C
  - 2. posms: denaturācija – 10 sekundes 95°C, praimeru kušana un polimerāzes darbība - 56°C (45 cikli)
  - Kušanas līknes analīze 60 – 95°C
4. Datus eksportē *Microsoft Excel* datorprogrammā un aprēķina ΔC<sub>q</sub>.

## **2.2.10. miRNS bibliotēku sagatavošana otrās paaudzes sekvenčēšanai uz *Illumina MiSeq* platformas.**

Bibliotēku sagatavošanai tika pielietots *LEXOGEN Small RNA-Seq Library Prep* reaģentu komplekts. Protokola izpilde ir jāveic atbilstošās laboratorijas telpās. Lai samazinātu nevēlamu ribonukleāžu kontaminācijas risku līdz reversās transkripcijas beigu posmam, protokola izpilde ir jāveic sterilā lamināras plūsmas skapī.

Bibliotēku sagatavošanas protokols sastāv no sešiem galvenajiem posmiem. 1. posms – adapteru ligēšana RNS 3' galam. 2. posms – attīrīšana, kur tiek aizvākti 1. posmā neligēti adapteri, lai 5' adaptera ligēšanas posmā nomāktu adapteru dimēru veidošanos. 3. posms – adaptera ligēšana 5' galam. 4. posms – 3' un 5' ligēta parauga reversā transkripcija, lai iegūtu cDNS. 5. posms - selektīva paraugu pavairošana un indeksu sekvenču ieviešana paraugā (indeksi – specifiskas paraugu marķējošas sekvences, kas nodrošina multiplexu sekvenčēšanu). 6. posms – parauga attīrīšana no PCR, reversās transkriptāzes un 5' gala ligēšanas reaģentiem.

### **Darba gaita miRNS bibliotēku sagatavošanai *Illumina MiSeq* NGS:**

#### **Pirms darba uzsākšanas:**

5' adapterim (A5), 3' adapterim (A3) un reversās transkriptāzes praimeriem (RTP) pievieno dH<sub>2</sub>O, tā lai iegūtu 0,3x atšķaidījumu.

Sagatavo centrifūgu ar regulējamu temperatūru, jo visi centrifugēšanas soļi tiek veikti pie 18°C.

1. 6µl RNS paraugam pievieno 1µl A3 (3' adapteris) un denaturē inkubējot 2 minūtes pie 70°C, pēc inkubēšanas maisījumu tur uz ledus.
2. Katrai reakcijai samaisa 12 µl LM1 (ligēšanas maisījums 1) un 1µl E1 (ligāze).
3. Katrā stobriņā ar denaturētu adapteri un RNS pārnes 13µl LM1 un E1 maisījumu.
4. Inkubē 28°C uz 60 minūtēm.
5. Pievieno 300µl CB (kolonnas saistīšanas buferšķīdums) un 50µl 100% etanolu. Paraugu samaisa un pārnes attīrīšanas kolonnā.
6. Kolonnu centrifugē 1 minūti pie 3,500 x g, lieko šķīdumu izlej.
7. Pievieno 600µl CW (kolonnas mazgāšanas buferšķīdums) un centrifugē 1 minūti pie 14000 x g.
8. Centrifugē 2 minūtes pie 14000 x g, lai izžāvētu kolonnu.
9. Nomaina savākšanas stobriņu ar tīru 1,5ml stobriņu un pievieno 12µl eluēšanas buferi.

10. Centrifugē 1 minūti pie 200 x g, pēc tam 2 minūtes pie 14000g, lai eluētu paraugu.
11. Katrai reakcijai denaturē 1,1μl A5 (5' adapteris) inkubējot to 2 minūtes pie 70°C, pēc inkubēšanas denaturēto A5 tur uz ledus.
12. Katrai reakcijai samaisa 1μl denaturētu A5 ar 11μl LM2 (ligēšanas maisījums 2) un 1μl E2 (ligāze 2).
13. Katrai stobriņam ar iepriekš attīrīto RNS pievieno 13μl A5, LM2 un E1 maisījumu un samaisa.
14. Inkubē 28°C uz 60 minūtēm.
15. Katram paraugam pēc ligēšanas reakcijas pievieno 1μl RTP un maisījumu denaturē 2 minūtes pie 70°C. Pēc denaturēšanas maisījumu tur uz ledus.
16. Katrai reakcijai samaisa 8μl FS (reversās transkripcijas maisījums) un 1μl E3 (reversā transkriptāze).
17. Katram denaturētajam paraugam pievieno 8μl FS / E3 maisījuma.
18. Inkubē 50°C uz 60 minūtēm.
19. Katrai reakcijai samaisa 50μl PCR (PCR maisījums), 3μl P5 (PCR praimeris) un 11μl dH<sub>2</sub>O.
20. Katram paraugam pēc reversās transkripcijas pievieno 64μl PCR / P5 / H<sub>2</sub>O maisījuma.
21. Katram paraugam pievieno vienu konkrētu SRi indeksu. Izvairīties no savstarpējas kontaminācijas.
22. PCR reakcijas programma:
  - 98°C, 30 sekundes;
  - 98°C, 10 sekundes, 60 °C, 30 sekundes, 72 °C, 15 sekundes (22 cikli);
  - 72°C - 10 minūtes.
  - Inkubēšana - 10°C
23. Pēc PCR produktam pievieno 300μl CB un 50μl 100% etanola. Paraugu samaisa un pārnes uz attīrīšanas kolonnu.
24. Kolonnu centrifugē 1 minūti pie 3,500 x g, lieko šķidrumu izlej.
25. Pievieno 600μl CW (kolonnas mazgāšanas buferšķīdums) un centrifugē 1 minūti pie 14000 x g. 25. soli atkārto vienu reizi.
26. Nomaina savākšanas stobriņu ar tīru 1,5ml stobriņu un pievieno 20μl eluēšanas buferi.
27. Centrifugē 1 minūti pie 200 x g, pēc tam 2 minūtes pie 14000g, lai eluētu paraugu.

### 2.2.11. miRNS bibliotēku fragmentu selekcija

Ja sagatavotājām miRNS bibliotēkām pēc apskates bioanalizatora elektroferogrammā ir redzams pārāk liels adapteru dimēru saturs, ir jāveic bibliotēkas fragmentu selekcija. Darbā fragmentu selekcijai tika pielietota *Blue Pippin* metode ar 3% agarozes gela plati (darba gaita iepriekš aprakstīta 3.6. nodaļā 4. punkts). Lai paraugiem pēc fragmentu selekcijas spētu nomērīt koncentrācijas ar fluorometru un vēlreiz veikt bibliotēkas garuma sadalījuma kontroli ar bioanalizatoru, kā arī sekvencēt ir jāveic parauga attīrīšana no *Blue Pippin* reaģentiem. Attīrīšanai tika pielietots *Monarch PCR & DNA Cleanup* reaģentu komplekts.

#### **Darba gaita miRNS bibliotēku attīrīšanai pēc *Blue Pippin*:**

##### **Pirms darba uzsākšanas:**

Pievieno >95% etanolu kolonnas mazgāšanas buferšķīdumam.

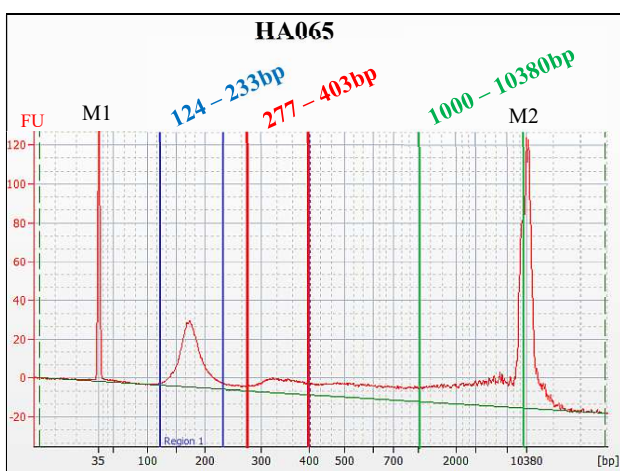
1. Paraugu atšķaida ar kolonnas piesaistīšanas buferi 7 : 1 tilpuma attiecībā un samaisa ar pipetēšanas metodi, paraugu ir aizliegts maisīt uz elektroniskā maisītājā.
2. Līdz 800µl parauga pārnes uz kolonnu. Kolonnu ievieto savākšanas stobriņā un centrifugē 1 minūti pie 16000 x g. lieko šķidrumu izlej.
3. Pievieno 200µl kolonnas mazgāšanas buferšķīdumu un centrifugē 1 minūti pie 16000 x g. Atkārti vienu reizi.
4. Kolonnu pārnes jaunā 1,5ml stobriņā.
5. Pievieno 6µl eluēšanas buferšķīdumu tieši kolonnas matricas centrā. Inkubē 1 minūti istabas temperatūrā un pēc tam centrifugē 1 minūti 16000 x g, lai eluētu paraugu.

### 3. Rezultāti

#### 3.1. Adenomas izcelsmes ccfDNA detektēšana ar mērķētu otrās paaudzes sekvencēšanu

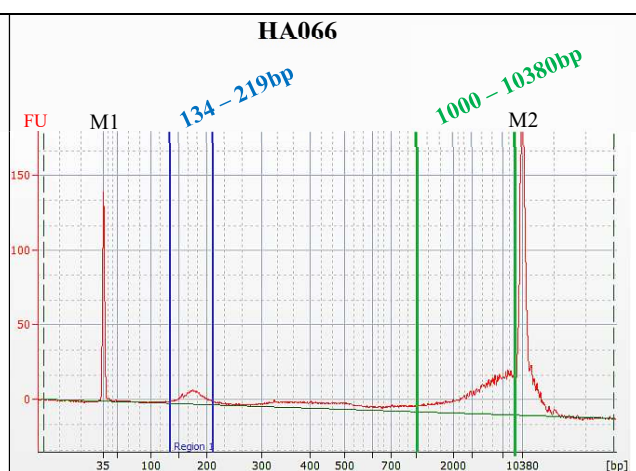
##### 3.1.1. ccfDNA izdalīšana

Darbā ccfDNA tika izdalīta no piecu NFPA pacientu plazmas paraugiem. ccfDNA četriem paraugiem tika izdalīta no 2ml plazmas, un vienam paraugam (HA0073) ccfDNA tika izdalīta no 1ml plazmas. Paraugi izdalīšanas beigās tika eluēti 20µl AVE buferšķīdumā. Izdalīto ccfDNA paraugu garumi un koncentrācijas tika nomērītas ar bioanalizatoru, un rezultāti ir apkopoti attēlos (6. – 10.).



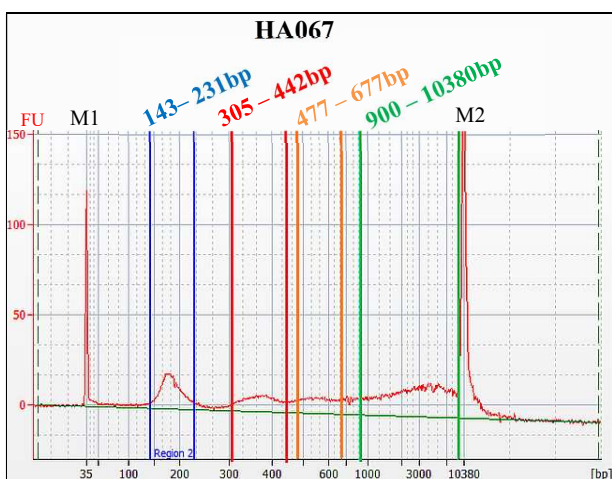
6. attēls. ccfDNA izdalīšanas rezultāti no parauga HA065.

Figure 6. ccfDNA extraction results from sample HA065.



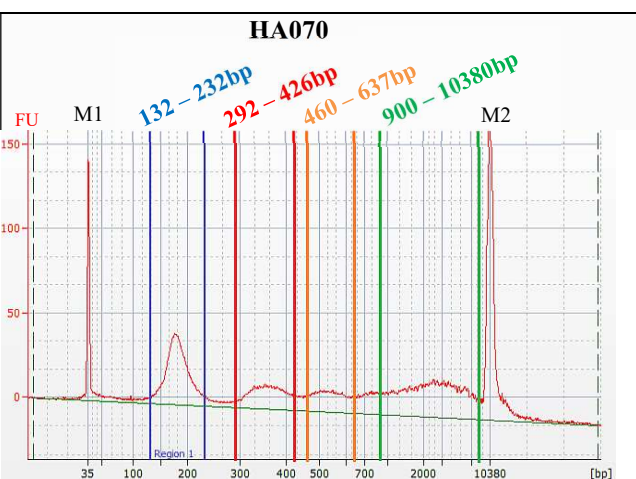
7. attēls. ccfDNA izdalīšanas rezultāti no parauga HA066.

Figure 7. ccfDNA extraction results from sample HA066.



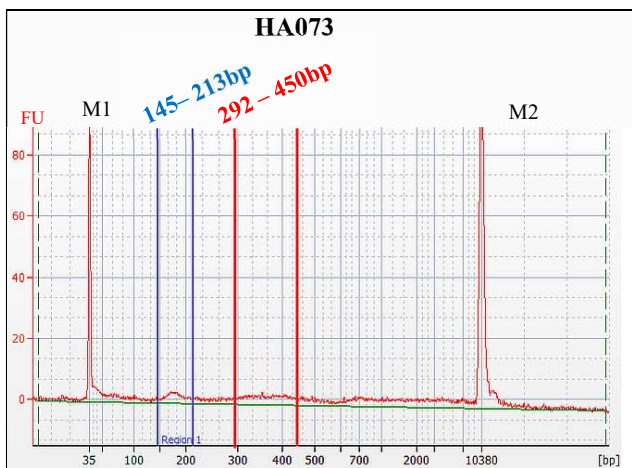
8. attēls. ccfDNA izdalīšanas rezultāti no parauga HA067.

Figure 8. ccfDNA extraction results from sample HA067.



9. attēls. ccfDNA izdalīšanas rezultāti no parauga HA070.

Figure 9. ccfDNA extraction results from sample HA070.

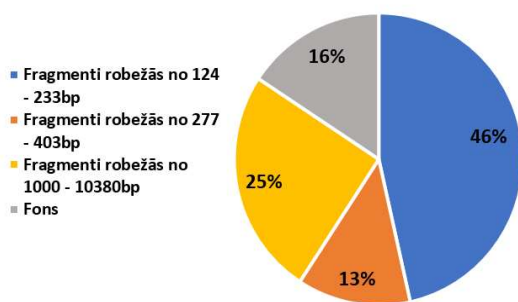


10. attēls. ccfDNA izdalīšanas rezultāti no parauga HA073.

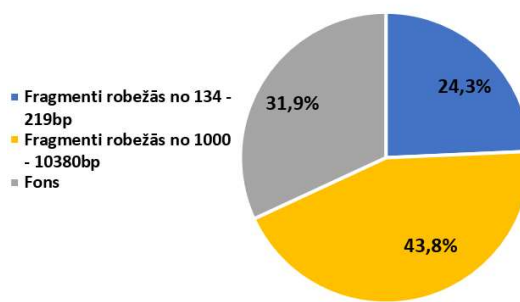
Figure 10. ccfDNA extraction results from sample HA073.

ccfDNA no plazmas tika sekmīgi izdalīta visiem pieciem paraugiem. Visaugstākās kopējās ccfDNA fragmentu koncentrācijas bija paraugos HA070 (502,21 pg/μl) un HA065 (466,84 pg/μl), bet viszemākās koncentrācijas bija paraugos HA066 (178,13 pg/μl) un HA073 (108,21 pg/μl). Paraugā HA067 DNS fragmentu kopējā koncentrācija bija 383,44 pg/μl.

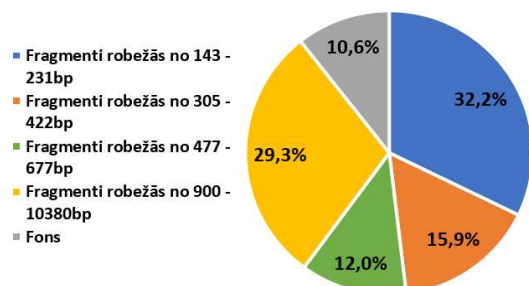
ccfDNA fragmenti paraugā HA065



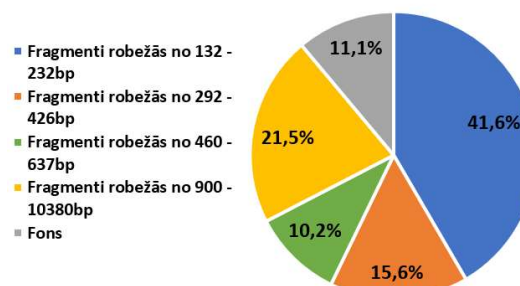
ccfDNA fragmenti paraugā HA066



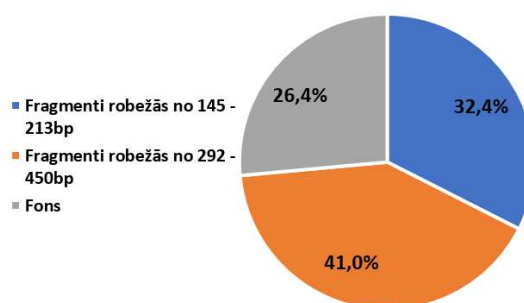
ccfDNA fragmenti paraugā HA067



ccfDNA fragmenti paraugā HA070



ccfDNA fragmenti paraugā HA073



11. attēls. ccfDNA fragmentu frakcijas paraugos. 100% atbilst parauga kopējai ccfDNA fragmentu koncentrācijai.

Figure 11. Fractions of ccfDNA fragments in samples. 100% represents total sample concentration across all fragments.

Izdalītajiem paraugiem elektroferogrammas attēlos robežās no aptuveni  $135 \pm 8\text{bp}$  līdz  $225 \pm 8\text{bp}$  var novērot izteiktu DNS fragmentu sadalījumu. Šo fragmentu vidējais garums visiem paraugiem ir tuvu  $177\text{bp}$  ( $\pm 3\text{bp}$ , lielākais HA067 –  $181\text{bp}$ , mazākais HA065 un HA073 –  $175\text{bp}$ ). DNS fragmentu koncentrācijas robežās no  $135 \pm 8\text{bp}$  līdz  $225 \pm 8\text{bp}$  pēc bioanalizatora datiem visiem paraugiem ir: HA065 –  $217,12\text{ pg}/\mu\text{l}$ , HA066 –  $43,26\text{ pg}/\mu\text{l}$ , HA067 –  $123,39\text{ pg}/\mu\text{l}$ , HA070 –  $208,86\text{ pg}/\mu\text{l}$  un HA073 –  $35,08\text{ pg}/\mu\text{l}$ .

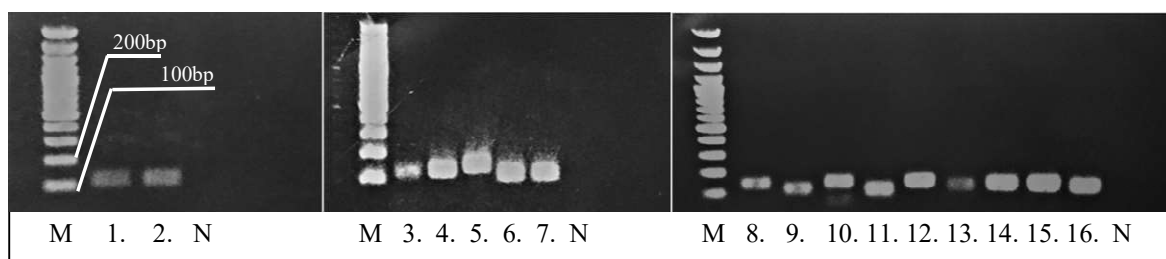
Visiem paraugiem, izņemot HA066, elektroferogrammu attēlos (6. – 10.) bez DNS fragmentiem starp  $135 \pm 8\text{bp}$  –  $225 \pm 8\text{bp}$  vizuāli ir izšķirami arī citi DNS fragmenti, kas veido sadalījumus. HA065 un HA073 paraugiem šis fragmentu sadalījums ir novērojams vienā vietā. HA065 starp  $277$  –  $403\text{bp}$  ar vidējo garumu  $344\text{bp}$  un koncentrāciju  $59,26\text{ pg}/\mu\text{l}$ , un HA073 starp  $292$  –  $450\text{bp}$  ar vidējo garumu  $365\text{bp}$ , bet ar augstāku fragmentu koncentrāciju, nekā fragmenti starp  $135 \pm 8\text{bp}$  –  $225 \pm 8\text{bp}$  ( $35,08\text{ pg}/\mu\text{l}$  pret  $44,38\text{ pg}/\mu\text{l}$ ). HA067 DNS fragmenti veido sadalījumu divās vietās – starp  $305$  –  $422\text{bp}$  (vid. –  $371\text{bp}$ , konc. –  $61,11\text{ pg}/\mu\text{l}$ ) un  $477$  –  $677\text{bp}$  (vid. –  $565\text{bp}$ , konc. –  $46,92\text{ pg}/\mu\text{l}$ ). HA070 arī divās vietās – starp  $292$  –  $426\text{bp}$  (vid. –  $359\text{bp}$ , konc. –  $78,13\text{ pg}/\mu\text{l}$ ) un  $460$  –  $637\text{bp}$  (vid. –  $539\text{bp}$ , konc. –  $51,24\text{ pg}/\mu\text{l}$ ).

Visiem paraugiem, izņemot HA073, arī ir novērojams DNS fragmentu sadalījums, sākot no  $950\text{bp} \pm 50\text{bp}$ . Šo fragmentu vidējie garumi un koncentrācijas diapazonā  $950\text{bp} \pm 50\text{bp}$  –  $10380$  paraugiem ir sekojošas: HA065 ( $5568\text{bp}$ ;  $116,83\text{ pg}/\mu\text{l}$ ), HA066 ( $7132\text{bp}$ ,  $78,02\text{ pg}/\mu\text{l}$ ), HA067 ( $3674\text{bp}$ ,  $112,31\text{ pg}/\mu\text{l}$ ) un HA070 ( $3142\text{bp}$ ,  $108\text{ pg}/\mu\text{l}$ ).

### 3.1.2. PCR ar ccfDNA

Pirms darba uzsākšanas ar interneta brīvpieejas genomu pārlūku (*Ensembl*) mutāciju saturošiem gēniem (1. pielikums) noteica nukleotīdu sekvences, kurās atrodas mutācijas. Lai no ccfDNA sekmīgi pavairotu fragmentus, interesējošam reģionam tika izveidoti praimerī ar *Primer3Plus* izmantotā algoritma palīdzību tā, lai to PCR produkta garums nepārsniegtu 140 bp. (8. tabula). Lai pārlicinātos, vai piemeklētie praimerī atbilst gēnam, un automātiski noskaidrotu pavairojamā parauga garumu, tika pielietoti interneta resursi no *UCSC In-Silico PCR*.

Darbā PCR tika veikta visiem pieciem izdalītajiem ccfDNA paraugiem. PCR produkti tika vizualizēti 1,2% agarozes gelā. Rezultāti ir interpretēti, balstoties uz zonu skaitu migrācijas joslā un to pārvietošanās attālumu (12. attēls).



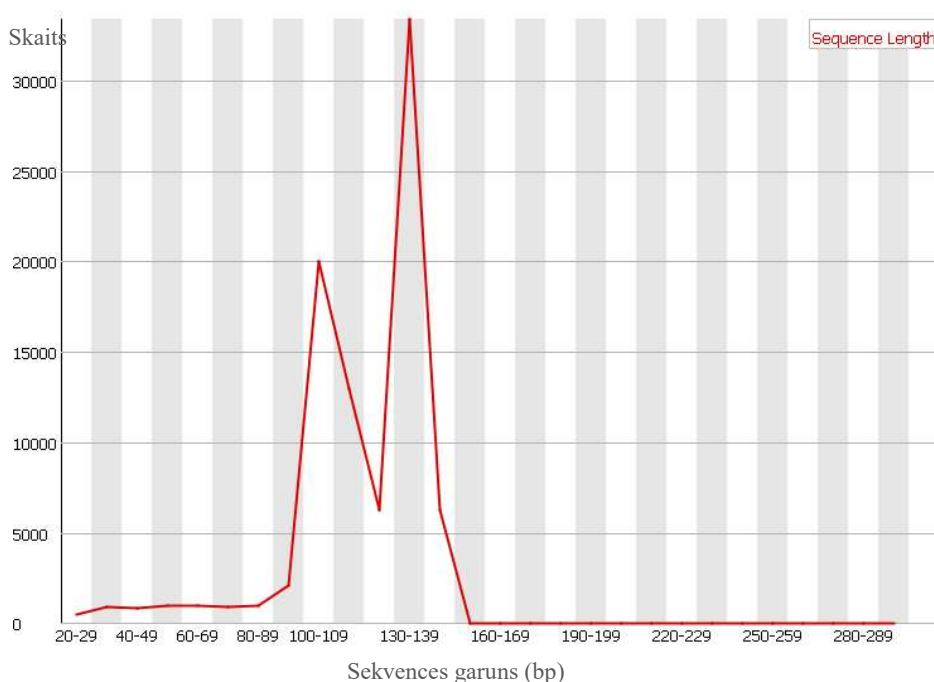
**12. attēls.** PCR ar ccfDNA. **M** - 100bp DNS marķieris (*GeneRuler 100bp DNA Ladder*). **1.** – *MPRIP* (HA073), **2.** – *ATF4* (HA073), **3.** – *CLCNKA*, (HA067), **4.** – *SMARCAD1* (HA067), **5.** – *PDE3A* (HA067), **6.** – *MTFMT* (HA067), **7.** - *PRPF8*, **8.** – *VPSI3D* (HA065), **9.** – *SPEN* (HA065), **10.** – *LDLRAD2* (HA065), **11.** – *G6PC2* (HA066), **12.** – *GPATCH4* (HA066), **13.** *CLECLIB* (HA070), **14.** – *RYR1* (HA070), **15.** - *CCDC138* (HA070), **16.** – *FXRI* (HA070), **N** – negatīvā kontrole.

**Figure 12.** PCR with ccfDNA. **M** - 100bp DNA marker (*GeneRuler 100bp DNA Ladder*). **1.** – *MPRIP* (HA073), **2.** – *ATF4* (HA073), **3.** – *CLCNKA*, (HA067), **4.** – *SMARCAD1* (HA067), **5.** – *PDE3A* (HA067), **6.** – *MTFMT* (HA067), **7.** - *PRPF8*, **8.** – *VPSI3D* (HA065), **9.** – *SPEN* (HA065), **10.** – *LDLRAD2* (HA065), **11.** – *G6PC2* (HA066), **12.** – *GPATCH4* (HA066), **13.** *CLECLIB* (HA070), **14.** – *RYR1* (HA070), **15.** - *CCDC138* (HA070), **16.** – *FXRI* (HA070), **N** – negative control.

Sekmīgai fragmenta pavairošanai atbilst viena zona migrācijas joslā, kuras migrācijas attālums atbilst aptuveni 120 – 140bp zonai (par atsauci izmantojot pievienoto marķieri). Negatīvās kontroles maisījumam nepievienoja DNS, lai pārlicinātos par svešas DNS piemaisījumu neesamību reakcijas sagatavošanā. Analizējot 5. attēlu var secināt, ka 16 ccfDNA PCR reakcijās izdevās sekmīgi iegūt fragmentus, kuru garums atbilst teorētiskajam garumam (100 – 140bp). Negatīvās kontrolēs joslās nebija novērojami fragmenti, kas apstiprina, ka fragmenti netika pavairoti no svešas DNS piemaisījumiem.

### 3.1.3. ccfDNA otrās paaudzes sekvencēšana

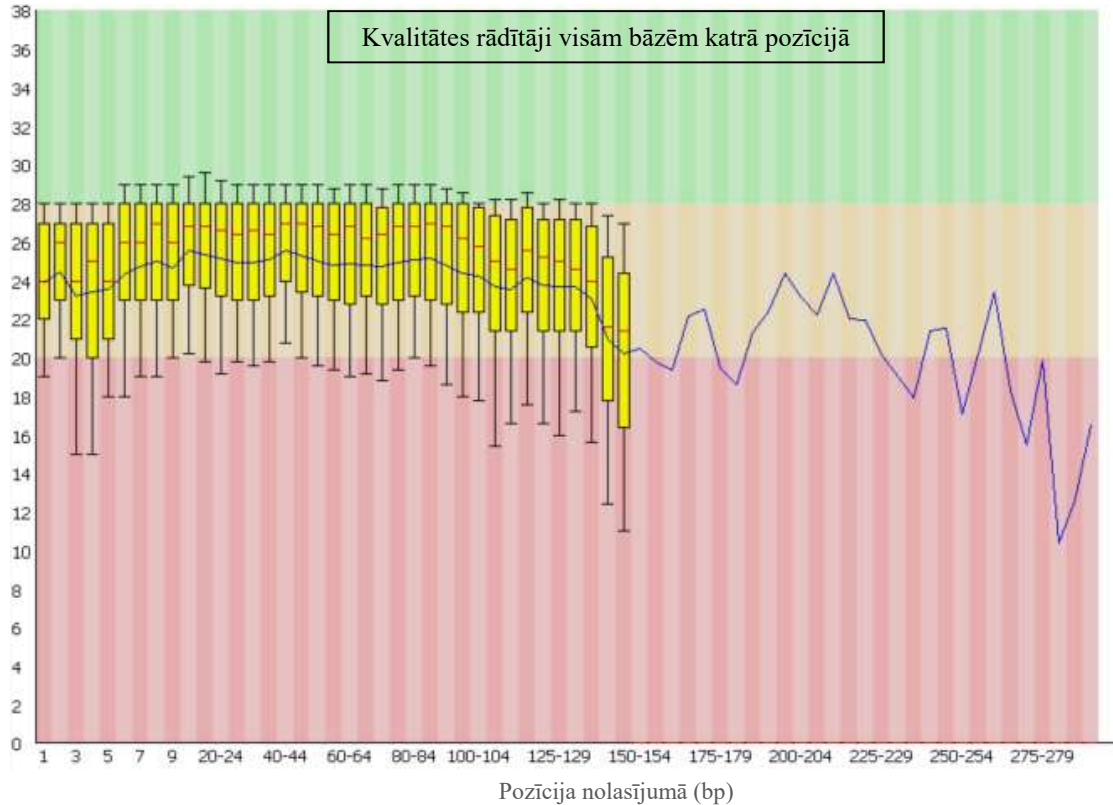
Darbā iegūti 16 ccfDNA PCR fragmenti tika sagatavoti NGS uz *Ion Proton™ System* platformas. Iegūtās sekvenču sarakstus sākotnēji tika eksportētas FASTQ formātā. FASTQ failā saglabātie sekvencēšanas dati pirms tālākas apstrādes tika vizualizēti ar *FastQC* datorprogrammas palīdzību, lai noskaidrotu sekvencēšanas kvalitāti un kļūdu iespējamību sekvencēšanas laikā. Kopā tika iegūtas 87493 sekvenču, no kurām neviena nebija marķēta kā zemas kvalitātes sekvenču. Sekvenču garumi bija no 25 līdz 293bp un visspārštāvētākās sekvenču bija ar garuma robežās no 100 līdz 125bp un no 130 līdz 145bp, kas atbilst PCR produktu garumiem.



13. Attēls. Sekvenču garuma sadalījums.

Figure 13. Sequence length distribution

Vidējais kvalitātes indekss (*Phred quality score*) visām nukleobāzēm bija 26, kas norāda, ka vidēji bāzes noteikšana sekvencēšanas laikā ir notikusi ar 0,32% kļūdas iespējamību ( $Q = -10\log_{10}P$ , kur  $Q$  ir kvalitātes indekss un  $P$  ir kļūdas varbūtība), (14. attēls).



**14. Attēls.** Kvalitātes rādītāji visām bāzēm. Centrālā sarkanā līnija norāda uz kvalitātes indeksa mediānu un zilā līnija norāda uz vidējo vērtību. Phred kvalitātes vērtības: no 38 līdz 28 – augsta kvalitāte ( $P$ : 0,0158% līdz 0,158%), no 28 līdz 20 – vidēja kvalitāte ( $P$ : 0,158% līdz 1%), no 20 līdz 0 – zema kvalitāte ( $P$ : 1% - 100%).

**Figure 14.** Quality scores across all bases. Central red line represents median, blue line represents mean value. Phred quality scores: from 38 to 28 – high quality ( $P$ : 0,0158% to 0,158%), from 28 to 20 – average quality ( $P$ : 0,158% to 1%), from 20 to 0 – low quality ( $P$ : 1% - 100%).

Iegūtās sekvenču tīklu tika pielīdzinātas cilvēka referenču genomam (*GRCh37 – hg19*) izmantojot datorprogrammu *Burrow-Wheeler Aligner* un iegūtais SAM (*Sequence Alignment Map*) teksta formāta fails tika sakompresēts BAM (*Binary Alignment Map*) formātā. Bāzu signālu apkopojums, un SAM formāta nomainīšana uz BAM tika veikta ar datorprogrammu *SAMtools*. Sekvenču rezultāti pēc apstrādes tika vizualizēti izmantojot datorprogrammu *Integrative Genomics Viewer* un ir apkopoti 13. tabulā.

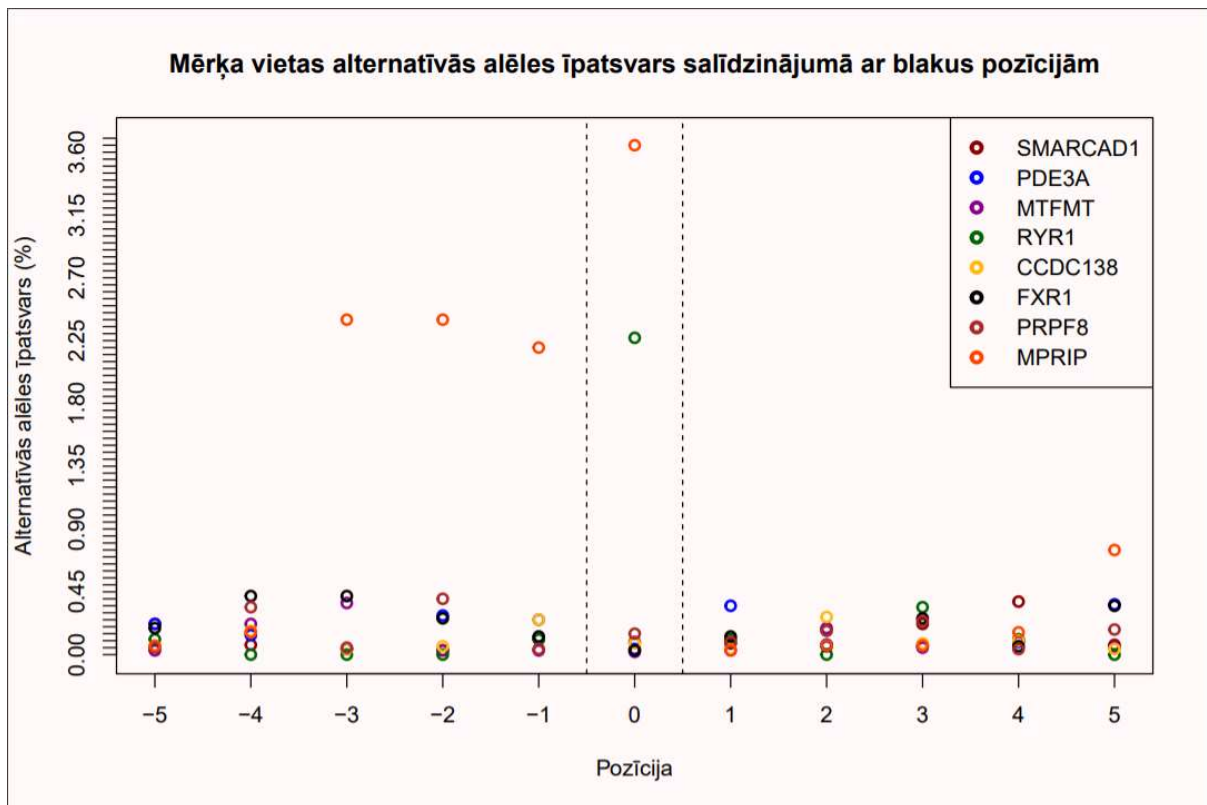
13. tabula. Mērķētas ccfDNA NGS rezultāti.

Table 13. Targeted ccfDNA NGS results.

Gēns	Pacients	Wild-type / mutantā alēle	Kopējais nolasījumu skaits	Alt. alēles īpatsvars	Pārklājums			
					A	C	G	T
<b>Alternatīvās alēles īpatsvars aptuveni 50%</b>								
<i>VPS13D</i>	HA065	C/T	10585	48,63%	6	5420	11	5148
<i>LDLRAD2</i>	HA065	C/T	7641	47,07%	3	4033	8	3597
<i>SPEN</i>	HA065	A/G	444	49,10%	225	0	218	1
<i>GPATCH4</i>	HA066	C/T	8726	58,50%	9	3611	1	5105
<i>G6PC2</i>	HA066	C/G	1567	44,47%	0	869	697	1
<b>Alternatīvās alēles īpatsvars starp 2% un 4%</b>								
<i>RYRI</i>	HA070	G/A	882	2,27%	20	0	862	0
<i>MPRIP</i>	HA073	C/T	3066	3,65%	0	2949	5	112
<b>Alternatīvās alēles īpatsvars zem 0,5%</b>								
<i>PDE3A</i>	HA067	G/A	13014	0,04%	5	1	13008	0
<i>MTFMT</i>	HA067	A/T	5964	0,02%	5950	0	13	1
<i>CCDC138</i>	HA070	G/A	4833	0,08%	4	0	4829	0
<i>FXRI</i>	HA070	T/A	3117	0,03%	1	6	1	3109
<i>PRPF8</i>	HA067	A/G	8239	0,14%	8227	0	12	0
<i>SMARCAD1</i>	HA067	A/G	8968	0,09%	8958	2	8	0
<b>Alternatīvā alēle nav detektēta</b>								
<i>CLECL1B</i>	HA070	G/A	2560	0	0	0	2559	1
<i>ATF4</i>	HA073	C/A	1336	0	0	0	1336	0
<i>CLCNKA</i>	HA067	C/G	1666	0	0	1664	0	2

Zilā krāsā un treknrakstā ir izcelts alternatīvās alēles pārklājums, bet zaļā krāsā ir izcelts *wild-type* alēles nolasījumu skaits

Sekvencēšanas pārklājums iespējamo mutāciju pozīcijās bija vidēji 6191 nolasījumi uz tiešās (5' 3') un apgrieztās ķēdes (3' 5') (diapazons 444 – 13026 nolasījumi). Piecos amplikonos (*VPS13D*, *LDLRAD2*, *SPEN*, *GPATCH4*, *G6PC2*) no diviem HA pacientiem, alternatīvās alēles īpatsvars bija tuvu 50% no nolasījumiem (44,47 – 58,50%). Dīvos amplikonos (*RYRI*, *MPRIP*) no diviem atsevišķiem HA pacientiem, alternatīvās alēles īpatsvars bija starp 2% un 4%. Sešos amplikonos (*PDE3A*, *MTFMT*, *CCDC138*, *FXRI*, *PRPF8*, *SMARCAD1*) alternatīvā alēle bija zem 0,5%, bet trijos amplikonos (*CLECL1B*, *ATF4*, *CLCNKA*) alternatīvo alēli nebija iespējams detektēt. Amplikoni, kuriem alternatīvā alēle mutācijas pozīcijā bija zem 4%, tika salīdzināti ar blakus pozīciju ( $\pm 5$  bp no mutācijas pozīcijas) alternatīvo alēļu īpatsvaram (NGS tehniskās kļūdas). Starp izdalītām ccfDNA koncentrācijām un alternatīvās alēles frekvenci korelācija nav novērojama (Pīrsona  $r = -0,066$ ,  $P = 0,92$ ).



**15. attēls.** Mutācijas vietas alternatīvās alēles īpatsvars salīdzinājumā ar blakus pozīciju ( $\pm 5$ bp no mutācijas pozīcijas) alternatīvo alēļu īpatsvaru (sekvencēšanas tehniskās kļūdas).

**Figure 15.** Alternate allele frequency of mutation position compared to alternate allele frequency (technical sequencing errors) of adjacent positions ( $\pm 5$ bp from mutation position).

Analizējot grafiku var secināt, ka sekvencēšanas fona kļūdas ir ar 0,01% - 0,9% īpatsvaru. Analizējot amplikonus: *PDE3A* (0,04%), *MTFMT* (0,02%), *SMARCAD1* (0,09%), *CCDC138* (0,08%), *FXR1* (0,03%), *PRPF8* (0,14%) ar Hi-kvadrāta testu var secināt, ka alternatīvās alēles īpatsvars mutāciju pozīcijās (0) statistiski neatšķiras (visiem amplikoniem  $P = 0,99\%$ ) no blakus pozīciju alternatīvo alēļu īpatsvariem (0,1 - 0,9%). Savukārt statistiski nozīmīgas atšķirības no fona pēc Hi-kvadrāta testa ir novērojamas amplikoniem *RYR1* (2,27%,  $P = 0,0002$ ) un *MPRIP* (3,65%,  $P = 0,0021$ ).

### 3.2. miRNS sastāva izmaiņu noteikšana ar otrās paaudzes sekvencēšanu

#### 3.2.1. Izdalīto RNS paraugu hemolīzes kontroles rezultāti

RNS sekmīgi tika izdalīta no visu 12 HA pacientu plazmas paraugiem pirms un pēc rezekcijas (kopā 24 RNS paraugi). Šiem RNS paraugiem tālāk tika veikta hemolīzes kontrole. Hemolīzes kontrole ar *miRCURY LNA SYBR Green PCR* ir balstīta uz miR-23a-3p un miR-451a miRNS marķieru kvantitatīvu analīzi. miR-23a-3p ir serumā un plazmā sastopama miRNS un tās daudzumu neietekmē hemolīze. miR-451a arī ir serumā un plazmā sastopama miRNS, bet tās avots galvenokārt ir sarkanās asins šūnas. Reālā laika PCR laikā tiek iegūtas šo marķieru Cq vērtības (cikls pie kura amplifikācijas līkne šķērso sliekšņa līniju un ir atkarīgs no sākuma

molekulu skaita). Hemolīzes gadījumā miR-451a daudzums ievērojami palielinās neatkarīgi no miR-23a-3p, tādēļ hemolīzes kontroli raksturo  $\Delta Cq$  ( $Cq_{miR23a-3p} - Cq_{miR451a}$ ). Pēc ražotāja Qiagen datiem  $\Delta Cq$  vērtības, kas ir zem 5 norāda, ka paraugos nav notikusi hemolīze,  $\Delta Cq$  starp 5 un 7 norāda uz iespējamu hemolīzi paraugos, bet  $\Delta Cq$  virs 7 norāda uz paraugu hemolīzi. Paraugu izdalīšanas datumi un hemolīzes kontroles rezultāti ir apkopoti 14. tabulā.

**14. tabula.** RNS paraugu hemolīzes kontroles rezultāti

**Table 14.** RNA samples hemolysis test results.

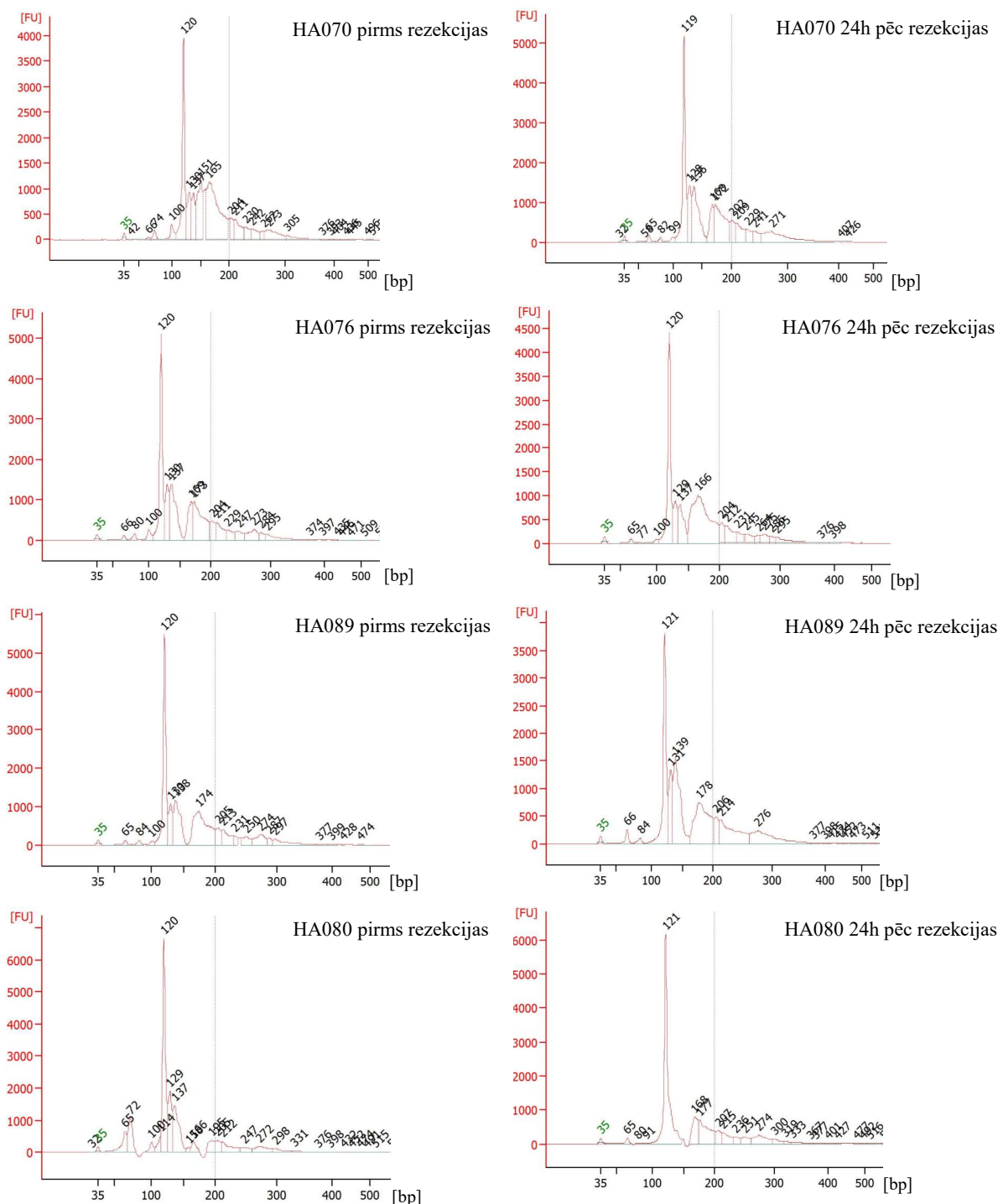
Paraugš	Parauga veids	Izdalīšanas datums	Hemolīzes testa $\Delta Cq$
HA069	Pirms rezekcijas	05.03.2019	4,706
	24h pēc rezekcijas	05.03.2019	4,109
HA070	Pirms rezekcijas	05.03.2019	4,435
	24h pēc rezekcijas	05.03.2019	3,736
<b>HA071</b>	<b>Pirms rezekcijas</b>	05.03.2019	<b>4,969</b>
	24h pēc rezekcijas	05.03.2019	4,849
<b>HA073</b>	<b>Pirms rezekcijas</b>	26.02.2019	<b>7.501</b>
	24h pēc rezekcijas	26.02.2019	4.085
<b>HA074</b>	<b>Pirms rezekcijas</b>	26.02.2019	<b>5.915</b>
	24h pēc rezekcijas	26.02.2019	3.410
HA076	Pirms rezekcijas	26.02.2019	3.840
	24h pēc rezekcijas	26.02.2019	2.949
<b>HA075</b>	Pirms rezekcijas	26.02.2019	4.396
	<b>24h pēc rezekcijas</b>	26.02.2019	<b>5.291</b>
<b>HA091</b>	<b>Pirms rezekcijas</b>	05.03.2019	<b>6,084</b>
	24h pēc rezekcijas	05.03.2019	1,782
HA089	Pirms rezekcijas	19.02.2019	3.454
	24h pēc rezekcijas	19.02.2019	2.577
<b>HA092</b>	<b>Pirms rezekcijas</b>	19.02.2019	<b>5.574</b>
	24h pēc rezekcijas	19.02.2019	3.163
HA080	Pirms rezekcijas	19.02.2019	4.802
	24h pēc rezekcijas	19.02.2019	4.038
<b>HA065</b>	<b>Pirms rezekcijas</b>	19.02.2019	<b>5.356</b>
	24h pēc rezekcijas	19.02.2019	4.450

Sarkanā krāsā ir atzīmēti paraugi kuriem ir detektēta hemolīze  
Oranžā krāsā ir atzīmēti paraugi kuriem ir iespējama hemolīze

No 24 miRNS paraugiem, kas tika izdalīti no plazmas, vienam paraugam (HA073, pirms rezekcijas) hemolīzes kontrole uzrāda, ka paraugā ir notikusi hemolīze. Bet sešiem paraugiem: HA074 (pirms rezekcijas), HA075 (24h pēc rezekcijas), HA091 (pirms rezekcijas), HA092 (pirms rezekcijas), HA065 (pēc rezekcijas), HA071 (pirms rezekcijas) hemolīzes kontrole uzrāda, ka pastāv palielināts hemolīzes risks šajos paraugos.

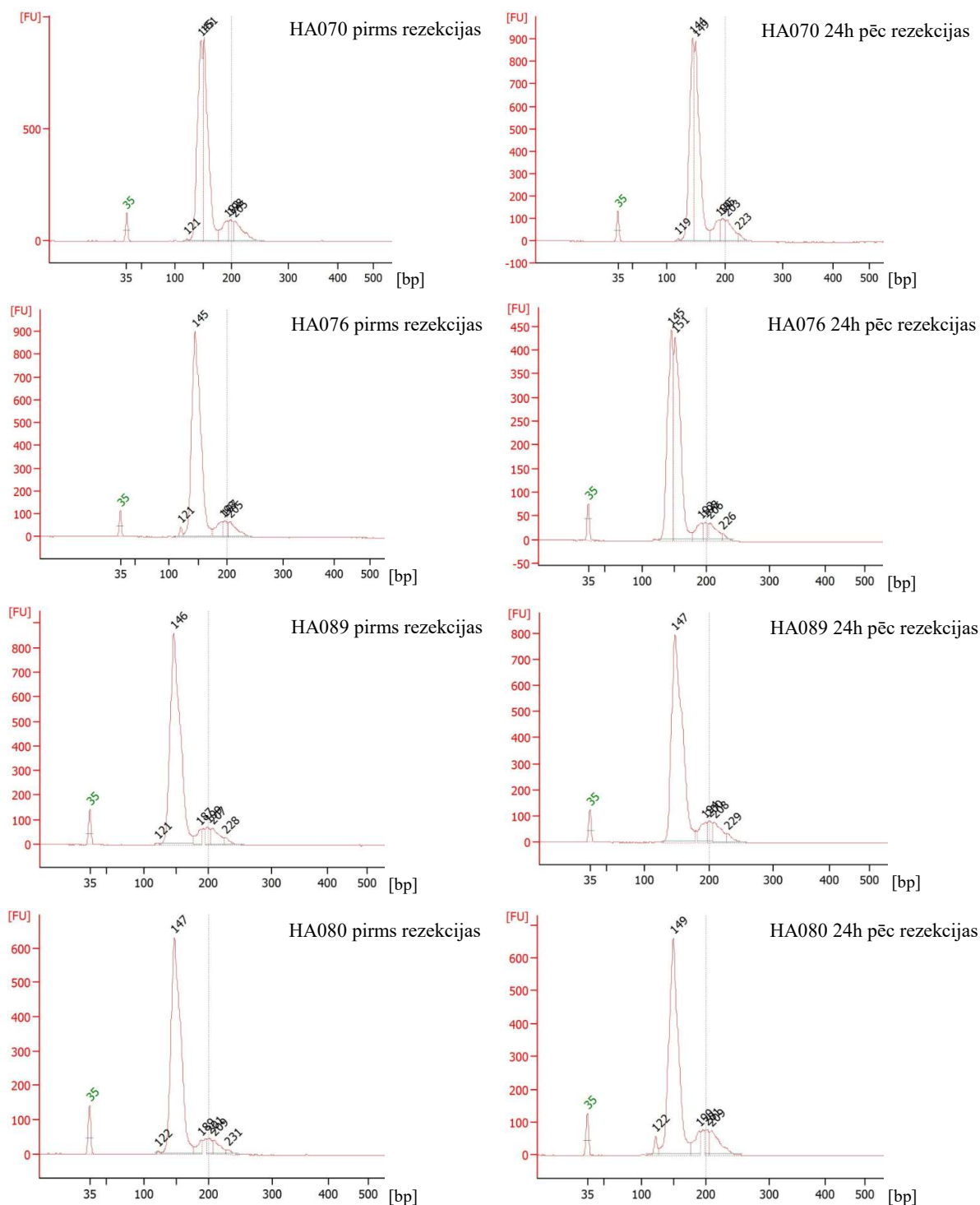
### 3.2.2. miRNS bibliotēku sagatavošana otrās paaudzes sekvencēšanai

No HA 12 pacientu izdalītajiem RNS paraugiem, četrus pacientus pirms un pēc rezekcijas RNS paraugiem tālāk tika veikta bibliotēku sagatavošana NGS uz *Illumina MiSeq* platformas (HA070, HA076, HA089, HA080). Bibliotēku sagatavošanas kvalitātes kontroles rezultāti pirms fragmentu selekcijas ir apkopoti 16. attēlā.



16. attēls. miRNS bibliotēku kvalitātes kontrole pirms garuma selekcijas.  
Figure 16. miRNA library quality control before size selection.

Vadoties pēc bibliotēku sagatavošanas reaģentu komplekta ražotāja (*Lexogen*) rokasgrāmatas adapteru izmēri ir 60bp un indeksu izmēri ir 5bp. Visu paraugu elektroferogrammās varēja novērot pīķus, kas atbilst adapteru dimēru izmēriem, kuru vidējā koncentrācija bija  $4,72 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 0,48 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Visos paraugos nebija iespējams atsevišķi izšķirt miRNS pīķi (145bp) no fona. Lai atbrīvotos no fona un adapteru dimēriem tika veikta *Blue Pippin* elektroforēze, kur mērķa garums tika iestatīts 145bp. Rezultāti ir apkopoti 17. attēlā.

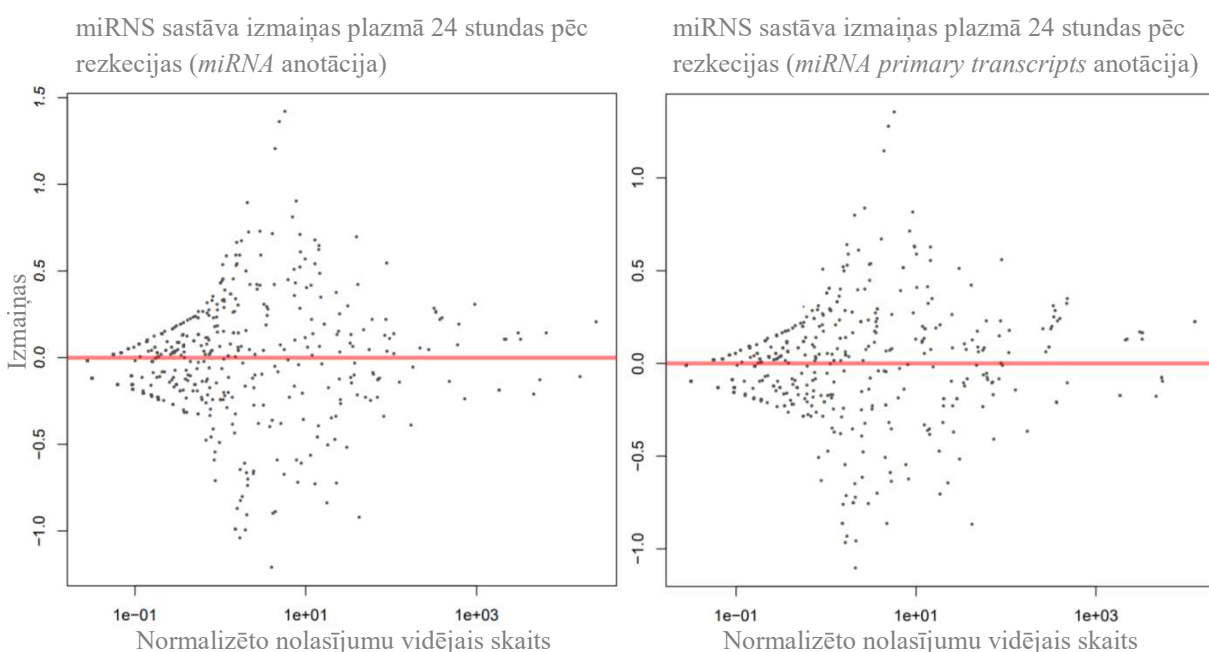


**17. attēls.** miRNS bibliotēku kvalitātes kontrole pēc fragmentu selekcijas.  
**Figure 17.** miRNA library quality control after size selection.

Pēc fragmentu selekcijas visiem paraugiem varēja novērot izteiktu pīķi, kas ietilpst miRNS garuma diapazonā. Vidējo adapteru dimēru koncentrāciju izdevās samazināt par 99,7%. Paraugiem HA070 (pirms rezekcijas pirms un pēc rezekcijas) un HA076 (24h pēc rezekcijas) blakus miRNS pīķim arī var novērot pīķi, kas ir ārpus miRNS garuma (151bp). Paraugam HA076 24h (24h pēc rezekcijas) ir novērojama divas reizes zemāka koncentrācija nekā HA076 (pirms rezekcijas) paraugam.

### 3.2.3. miRNS sekvencēšanas rezultāti

miRNS sekvencēšanas datu “*fastqsanger.gz*” faila formāts tika pārbaudīts un pārveidots ar datorprogrammu *FASTQ Groomer* uz “*fastqsanger*” faila formātu. Sekvencēšanas datu kvalitāte tika vizualizēta ar datorprogrammu *FASTQC*. Atbilstoši kvalitātes atskaitei sekvencēšanas datiem tika veikta nolasījumu filtrēšana ar datorprogrammu *filter FASTQ*. Rezultātā tika atlasīti un saglabāti tie nolasījumi, kuriem visas bāzes bija ar *Phred quality score* vērtību > 13, un kuru garums ietilpa diapazonā no 17 līdz 40bp. Nolasījumi, kuri neatbilda izvirzītajiem nosacījumiem tika izslēgti no analīzes. Nolasījumiem tālāk tika veikta 3’ un 5’ adapteru sekvenču aizvākšana ar ar datorprogrammu *Cutadapt*, un pielīdzināšana *GRCh37 – hg19* cilvēka references genomam, izmantojot datorprogrammu *Bowtie*. miRNS saskaitīšana tika veikta divas reizes ar datorprogrammu *htseq-count*, attiecīgi izmantojot vienu no divām miRNS anotācijām (*miRNA*, *miRNA primary transcripts*). Diferenciālās ekspresijas statistiskā analīze tika veikta ar datorprogrammu *DESeq2*.



**18. attēls.** miRNS sastāva izmaiņas plazmā 24 stundas pēc rezekcijas.  
**Figure 18.** miRNA profile changes in plasma 24 hours post surgery.

No abām miRNS anotācijām kopā tika identificētas 1059 dažādas miRNS. Izmaiņas bija novērojamas no -1,21 līdz 1,42 reizēm. Individuāli analizējot miRNS, statistiski nozīmīgas izmaiņas ( $P < 0,05$ ) pirms un pēc rezekcijas tika konstatētas četrām miRNS (15. tabula). Tomēr pēc datu normalizācijas ar *Benjamin – Hochber* metodi kopsummā nav novērojamas statistiski būtiskas izmaiņas miRNS sastāvā pirms un pēc rezekcijas ( $P_{adjusted} = 0,99$ ).

**15 tabula.** miRNS ar statistiski nozīmīgām izmaiņām 24h pēc audzēja rezekcijas.

**Table 15.** miRNAs with statistically significant changes 24h post surgery.

miRNS veids	Izmaiņas (reizes)	<i>P</i> vērtība
hsa-miR-1307	1,28	0,035484386
hsa-miR-378i	1,42	0,023476989
hsa-miR-1307-3p	1,36	0,037814295
hsa-miR-6511b-3p	-1,21	0,046008026

Attiecīgi 24 stundas pēc audzēja rezekcijas palielināta ekspresija bija novērojama hsa-miR-1307 (1,28 reizes), hsa-miR-378i (1,42 reizes) un hsa-miR-1307-3p, bet samazināta ekspresija bija novērojama hsa-miR-6511b-3p (-1,21 reizes).

## 4. Diskusija

### 4.1. Hipofīzes adenomas izcelsmes ccfDNA detektēšana

Pēdējo gadu laikā ir gūti vairāki priekšstati par ļaundabīgo audzēju ģenētisko marķieru detektēšanu ccfDNA. Pašlaik ccfDNA analīzes tiek adoptētas onkoloģisko slimību diagnostikā ar nosaukumu – šķidrā biopsija (Perakis S., Speicher M. R. 2017). Vadoties pēc vairāku pētījumu datiem, pasaules mēroga populācijā klīniski nozīmīgas HA ir ar sastopamību 1 gadījums uz 1000 cilvēkiem (Daly A. *et al.* 2006), (Day P. F. *et al.* 2016). ccfDNA analīžu ieviešana HA pacientiem ievērojami atvieglotu slimības diagnostiku, jo audu paraugu biopsija salīdzinājumā ar šķidro biopsiju ir invazīva un grūti izpildāma dēļ hipofīzes anatomiskā novietojuma, izmēra un konsistences, kā arī nesniedz pilnvērtīgu informāciju par audzēju ar genomisku heterogeniāti (Arneth B. 2018), (Hillary S., Balasubramanian S.P. 2017). Darba viens no mērķiem bija noskaidrot vai ir iespējams detektēt HA izcelsmes ccfDNA pacientu plazmā, veicot mērķētu NGS 16 pozīcijās (katra savā gēnā), kurās iepriekš BMC veiktajā HA eksoma sekvencēšanā pieciem pacientiem tika detektētas somatiskās mutācijas (1. pielikums).

Līdz šim vēl nav bijis neviens publicēts pētījums par HA izcelsmes ccfDNA detektēšanu ķermeņa šķidrums. Kā arī ir publicēts tikai viens pētījums par adenomu izcelsmes ccfDNA detektēšanu, kur pētījuma autoriem pacientu plazmā neizdevās detektēt kolorektālās adenomas izcelsmes ccfDNA (Myint N. N. M. *et al.* 2018). Lai detektētu HA izcelsmes ccfDNA piecu HA pacientu plazmas paraugos tika pielietota, mērķēta NGS uz *Ion Torrent (Ion Proton)* iekārta platformas, kas spēj iegūt vairākus paralēlus nolasījumus noteiktam lokusam, sniedzot iespēju detektēt vienu nukleotīdu mainošas mutācijas ar alternatīvās alēles īpatsvaru sākot no 0,1 – 1% (Stasik T. *et al.* 2018), (Tucker T. *et al.* 2009).

ccfDNA izdalīšana no plazmas tika veikta ar *QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit*. Visi plazmas paraugi tika izdalīti vienlaikus. Četriem paraugiem ccfDNA tika izdalīta no 2ml pacientu plazmas, bet paraugam HA073 no 1ml plazmas, izmantojot visu pieejamo plazmas daudzumu. Starp izdalītajiem paraugiem varēja novērot izdalīto ccfDNA fragmentu kopējo koncentrāciju atšķirības. Pašas ccfDNA koncentrācijas asinsritē var ietekmēt fizioloģiskais stāvoklis, blakusslimības, fiziskās aktivitātes pirms asins parauga ievākšanas un audzēja aktivitāte (Haller N. *et al.* 2018), (Ma X. *et al.* 2017). Darbā statistiski nozīmīga korelācija starp kopējām ccfDNA koncentrācijām paraugos un alternatīvo alēļu īpatsvaru mutāciju pozīcijās netika novērota ( $r = -0,066$ ,  $P = 0,92$ ). Norādot uz to, ka ccfDNA koncentrāciju atšķirības starp pacientiem, visticamāk, nav saistītas ar audzēja aktivitāti. Pacientiem arī nebija novērojamas

blakusslimības, kas ietekmētu ccfDNA koncentrācijas plazmā. Darbā iegūtās koncentrācijas ir problemātiski salīdzināt ar citu pētījumu rezultātiem, jo pašlaik starp pētījumiem ccfDNA izdalīšanas un koncentrācijas analīzes metodes atšķiras.

Visiem izdalītajiem ccfDNA paraugiem diapazonā  $135 \pm 8$ bp līdz  $225 \pm 8$ bp bija novērojami fragmenti, kuru vidējais garums bija  $177 \pm 3$ bp. Šādi rezultāti sakrīt ar līdzīgos pētījumos publicētajiem rezultātiem, kur tika veikta ccfDNA garuma noteikšana šizofrēnijas pacientiem ar fluorescences korelācijas spektroskopiju (Jiang. J. *et al.* 2018) un hepatocelulārās karcinomas pacientiem ar NGS (Jiang P. *et al.* 2015). Fragmenti ar aptuvenu garumu 180bp reprezentē DNS, kas ir uztīts uz vienas nukleosomas kopā ar degradētu *linker* DNS. Lai gan šo fragmentu izcelsme vēl joprojām tiek apspriesta literatūrā, *Jahr et al.* bija pirmie, kuri sniedza pierādījumu, ka 180bp izmēra fragmenti ir galvenokārt ar apoptotisku šūnu izcelsmi. Iemesls tam ir, ka apoptozes laikā notiek aktīva dezoksiribonukleāzes mediēta hromatīna degradēšana starp *linker DNA* sekvencēm (Jahr S. *et al.* 2001). Turklāt 180bp fragmenti asinsritē tiek atbrīvoti ne tikai šūnu apoptozes rezultātā, bet arī starpšūnu sekrēcijas rezultātā (Mouliere F., Thierry A. R. 2012).

Sākot no  $225 \pm 8$ bp līdz  $950\text{bp} \pm 50\text{bp}$  starp pacientu paraugiem bija novērojamas atšķirības fragmentācijā. Visi paraugi izņemot HA066 līdz 1000bp arī saturēja fragmentus, kuru vidējais garums bija aptuveni divas līdz trīs reizes garāks par 180bp fragmentiem. Arī citos ccfDNA pētījumos ir novēroti šāda izmēra fragmenti un šo fragmentu garums atbilst DNS, kas ir uztīts uz divām vai trīs nukleosomām. Attiecīgi dinukleosomālu un trinukleosomālu garumu fragmenti bija novērojami paraugiem HA067 un HA070. Savukārt HA065 un HA073 bija novērojami tikai dinukleosomāla garuma fragmenti. Lai gan šo fragmentu garumi liecina par to, ka šo fragmentu izcelsme arī ir apoptotiskas šūnas, tomēr daži autori uzskata, ka fragmenti, kuri ir lielāki par 320bp ir arī nekrotisku šūnu izcelsmes (Elazezy M., Joosse S. A. 2018), (Jiang. J. *et al.* 2018). Paraugos HA065, HA066, HA070 un HA073 vispārstāvētākie fragmenti bija tie, kuru garums atbilda DNS garumam kurš uztīts uz vienu vai vairākām nukleosomām liecinot par to, ka plazmā esošās ccfDNA avots ir galvenokārt apoptotiskas un ccfDNA sekretējošas šūnas.

Visi paraugi izņemot HA073 saturēja arī fragmentus, kas veidoja sadalījumu sākot no 1000bp. Ja HA073 ccfDNA tiktu izdalīta no 2ml plazmas, tad šie fragmenti, iespējams, arī būtu novērojami. To koncentrācijas un vidējie garumi rezultātos ir analizēti sākot no  $950\text{bp} \pm 50\text{bp}$  līdz 10380bp, jo datu ekstrapolācija ārpus bioanalizatora marķieriem nav vēlama. Vadoties pēc uzskatiem literatūrā, fragmenti, kas ir lielāki par 1000bp arī ir pieskaitāmi pie ccfDNA, bet tie

ir pārsvarā saistīti tieši ar šūnu nekrozi, jo nekrozes laikā DNS degradācija starp nukleosomām notiek mazāk aktīvi (Mouliere F., Thierry A. R. 2012), (Wang W. *et al.* 2017). HA066 bija vienīgais paraugs, kurā varēja novērot, ka nekrotisku šūnu izcelsmes fragmenti ir izteikti vairāk nekā apoptotisku šūnu izcelsmes fragmenti (Jahr S. *et al.* 2001).

Literatūrā pausts uzskats, ka audzēja izcelsmes ccfDNA fragmenti ir vairāk fragmentēti salīdzinājumā ar normālu šūnu fragmentiem, un tie ir parasti ar mazāku izmēru salīdzinājumā ar normālu šūnu izcelsmes vienukleosomālo (165bp) ccfDNA. Kā arī fragmenti, kas ir lielāki par 1000bp pārsvarā ir tikai normālu šūnu izcelsmes nevis audzēja šūnu (Mouliere F., Thierry A. R. 2012). Norādot uz to, ka varbūtība detektēt adenomas izcelsmes ccfDNA ir lielāka paraugos, kuros fragmenti pārsvarā ir ar apoptotisku izcelsmi (HA065, HA067, HA070 un HA073). Tomēr starp vienukleosomālo fragmentu procentuālo saturu ccfDNA paraugos un alternatīvo alēļu frekvencēm mutāciju pozīcijās nebija novērojama statistiski nozīmīga korelācija ( $r = -0,054$ ,  $P = 0,93$ ). Kas norāda uz to, ka atšķirīgo fragmentāciju iespējams neietekmē HA, bet gan citi faktori.

Mutācijas iepriekš hipotētiski sagaidāmā līmenī izdevās detektēt divās no 16 pozīcijām (*RYRI* – HA070 un *MPRIP* – HA073). Šo pozīciju alternatīvo alēļu īpatsvars bija starp 2% un 4% un statistiski būtiski atšķiras no fona līmeņa. Šādi rezultāti ir līdzīgi ar rezultātiem pētījumos par ļaundabīgo audzēju marķieru detektēšanu, kur ccfDNA alternatīvās alēles parasti ir ar īpatsvaru no 1% līdz 30% (Page K. *et al.* 2017). Lai gan paraugam *MPRIP* alternatīvās alēles īpatsvars mutācijas pozīcijā ir statistiski atšķirīgs no fona, tomēr salīdzinājumā ar *RYRI*, *MPRIP* fona sekvencēšanas tehnisko kļūdu īpatsvars trīs pozīcijas pirms mutācijas vietas ir samērā augsts (~2,3%). Iespējamais iemesls augstam kļūdu īpatsvaram ir tas, ka mutācijas pozīcijai (chr17:17068722) abās pusēs ir 5x G atkārtojumi (GGGGGCT (C) CTCCGGGGG). Rezultātā pozīcijās chr17:17068715 un chr17:17068727 bija novērojami vairāki nolasījumi ar nepatiesi pozitīvām insercijām un delēcijām, kas datus izraisīja sekvenču nobīdi. *IonTorrent* sekvencēšanas metode salīdzinājumā ar citām NGS metodēm ir neprecīzāka homopolimēru sekvenču un biežāk reģistrē viltus pozitīvas delēcijas vai insercijas (Kulski J. K. 2016).

*VPS13D*, *LDLRAD*, *SPEN* (HA065) un *GPATCH4*, *G6PC2* (HA066) pozīcijās arī izdevās detektēt mutācijas, bet iegūtais alternatīvo alēļu īpatsvars ir tuvu 50%, kas ir pārsteidzoši HA gadījumā (2. un 2.1. pielikums). Ļaundabīgajos audzējos alternatīvo alēļu saturs >50% no plazmas izdalītā ccfDNA ir reti novērojams. Pārsvarā tad, kad pacientam ir novērojama vēlīna audzēja metastāze (Bohers E. *et al.* 2015), (Boons G. *et al.* 2018). *Phred*

*quality score* vērtībās norāda, ka alternatīvās alēles īpatsvars tuvu 50% visticamāk nav dēļ viltus pozitīviem nolasījumiem.

Veselos cilvēkos lielākā daļa no plazmā esošā ccfDNA ir ar balto asins šūnu izcelsmi (55%) (Moss J. *et al.* 2018). HA eksoma sekvencēšanas laikā, lai identificētu somatiskās audzēja mutācijas, tika arī sekvencēts *germline* DNS, kurš tika izdalīts no baltajām asins šūnām (1. pielikums). Balto asins šūnu DNS netika atklātas mutācijas gēnos *VPS13D*, *LDLRAD*, *SPEN*, *GPATCH4* un *G6PC2*. Tas norāda uz to, ka lielāka daļa no pacientu HA065 un HA066 plazmā esošā ccfDNA iespējams ir ar audzēja šūnu izcelsmi. HA eksoma sekvencēšanas laikā pacientiem HA065 un HA066 tika atklāts liels skaits somatisko mutāciju audzēja DNS (HA065 – 269 mutācijas, HA066 – 671 mutācija) (Pečulis R., npublicēti dati). Iespējams, ka šo mutāciju rezultātā ir palielināta HA šūnu apoptoze, nekroze vai ccfDNA sekrēcija, un rezultātā mutācijas plazmā tika detektētas ar alternatīvas alēles īpatsvaru tuvu 50%. Tomēr jāņem vērā, ka pacientam HA066 bija otra zemākā ccfDNA koncentrācija.

Alternatīvs skaidrojums šādiem rezultātiem varētu būt hipofīzes apopleksija. Hipofīzes apopleksija ir dzīvību apdraudošs sindroms, kuru raksturo straujš asins apgādes pārtrūkums hipofīzes dziedzerim, kurš HA gadījumā var rasties audzēja hemorāģiskā infarkta dēļ. Apopleksijas gadījumā ir ievērojami palielināta audzēja nekroze, kas attiecīgi var palielināt HA izcelsmes ccfDNA koncentrācijas asinsritē (Jang, J. H. *et al.* 2018). Lai gan HA066 ccfDNA paraugā dominēja nekrotisku šūnu izcelsmes fragmenti, tomēr paraugam HA066 ccfDNA koncentrācija ir otra zemākā no visiem paraugiem, un HA065 paraugam ccfDNA koncentrācija ir zemāka nekā parauga HA070 ccfDNA koncentrācija, kurā nebija novērojamas mutācijas ar augstu alternatīvās alēles īpatsvaru. Kā arī HA065 un HA066 magnētiskās rezonanses izmeklēšanas attēlos nebija novērojama hipofīzes apopleksija, tomēr jāņem vērā, ka pacientiem magnētiskās rezonanses izmeklēšana netika veikta vienlaicīgi ar asinsparaugu ievākšanu.

Deviņos no 16 paraugiem neizdevās detektēt mutācijas, jo alternatīvās alēles īpatsvars statistiski neatšķīrās no fona vai arī neviens no nolasījumiem nesaturēja alternatīvo alēli mutācijas pozīcijā. Tas norāda, ka šajos paraugos mutāciju saturošais adenomas izcelsmes ccfDNA nebija pietiekamā skaitā salīdzinājumā ar normālu šūnu ccfDNA, lai to spētu detektēt ar darbā pielietoto metodi. Lai gan pacientu HA070 un HA073 plazmā izdevās detektēt mutācijas gēnos *MPRIP* un *RYRI*, tomēr mutācijas gēnos *CCDC138*, *FXR1*, *CLEC1B* (HA070) un *ATF4* (HA073) neizdevās detektēt. Šāds rezultāts varētu būt saistīts ar to, ka šiem pacientiem hipofīzes adenomas ir ar genomisku heterogenitāti (Myint N. N. M. *et al.* 2018). Pastāv iespēja, ka eksoma sekvencēšanas laikā pieejamais DNS daudzums ar izoperētā audzēja audu

paraugiem nereprezentē visa audzēja genomu. Rezultātā var izvirzīt hipotēzi, ka atrastās mutācijas gēnos *CCDC138*, *FXR1*, *CLEC1B*, *ATF4* ir tikai daļā no audzēja šūnām, savukārt mutācijas *RYR1* un *MPRIP* ir atrodamas visā audzējā vai arī lielākajā daļā no audzēja šūnām, tādēļ ccfDNA fragmenti plazmā ar mutācijām *MPRIP* un *RYR1* bija lielākā skaitā salīdzinājumā ar fragmentiem, kas nesa mutācijas gēnos *CCDC138*, *FXR1*, *CLEC1B*, *ATF4*.

*Ion Torrent* sekvencēšanas platforma balstās uz “*sequencing by synthesis*” (sekvencēšana sintēzes laikā) metodi, kur tiek detektētas pH izmaiņas sintezējoties jaunajai DNS ķēdei. Lai gan sekvencēšana uz *Ion Torrent* platformām ir jutīga un, salīdzinājumā ar citām NGS platformām, lētāka un mazāk laukietilpīga, tomēr *IonTorrent* metode ir neprecīzāka (kļūdu biežums 1,7%) (Kulski J. K. 2016). Tomēr balstoties pēc FASTQ datiem, šajā darbā novērotais aptuvenais sekvencēšanas kļūdu biežums bija 0,32%. Lai optimāli detektētu ļaundabīgo audzēju izcelsmes ccfDNA ir rekomendētas metodes, kas var detektēt un izšķirt no fona mutācijas ar alēles īpatsvaru zem 0,1% (Pantel K. 2016), (Bennet C.W. *et al.* 2016).

Arī ļaundabīgo audzēju gadījumā audzēja izcelsmes ccfDNA (ctDNA) detektēšana ir bieži problemātiska dēļ ccfDNA fragmentu piemaisījumiem no normālām šūnām (Elazezy M., Joosse S. A. 2018). NGS metodes gadījumā populārs dažādu pētnieku risinājums izvirzītajai problēmai, ir palielināt sekvencēšanas dziļumu, lai palielinātu iespēju detektēt ctDNA (Mouliere F. *et al.* 2018). Arī šajā darbā tika palielināts sekvencēšanas dziļums (vidēji 6191 nolasījumi), bet mutācijas neizdevās detektēt deviņos no 16 paraugiem, norādot uz to, ka HA izcelsmes ccfDNA salīdzinājumā ar normālu audu izcelsmes ccfDNA ir nelielā daudzumā.

Bez sekvencēšanas metožu optimizācijas šobrīd arī tiek pētītas un ieviestas jaunas metodes, lai samazinātu fonu no normālu audu izcelsmes ccfDNA un palielinātu iespēju detektēt ctDNA. Šīs metodes ir balstītas uz iepriekš aprakstīto pieņēmumu, ka ctDNA fragmenti ir vairāk fragmentēti un parasti ir ar mazāku izmēru salīdzinājumā ar normālu šūnu izcelsmes ccfDNA (Mouliere F., Thierry A. R. 2012). *Underhill H. R. et al.* bija vieni no pirmajiem kuri pierādīja, ka no izdalītā ccfDNA atlasot fragmentus ar specifisku garumu starp 132 – 145bp var palielināt iespēju detektēt melanomas ctDNA (*Underhill H. R. et al.* 2016). Līdzīgus rezultātus arī ieguva *Mouliere F. et al.*, kur izdevās detektēt gan palielinātu ctDNA starp 90 un 150bp, gan palielinātu ctDNA daudzumu starp 250 – 320bp (*Mouliere F. et al.* 2018). Lai gan pētījumi, kas atbalsta tieši specifiska garuma ccfDNA atlasīšanu pirms sekvencēšanas, lai uzlabotu ctDNA detekciju šobrīd ir veikti tikai par ļaundabīgajiem audzējiem. Fragmentu atlasīšana starp 90 – 150bp pirms PCR reakcijas, ir potenciāls darba uzlabojums, kura rezultātā iespējams tiktu uzlabota varbūtība detektēt adenomas eksoma mutācijas ccfDNA.

Darbā iegūtie ccfDNA sekvencēšanas rezultāti norāda uz to, ka pielietotā bibliotēku sagatavošanas metode, kā arī izmantotā sekvencēšanas metode ir spējīga detektēt adenomas izcelsmes ccfDNA. Tomēr, lai konsekventi spētu detektēt adenomas izcelsmes ccfDNA ir nepieciešams veikt papildus optimizāciju vai pielietot alternatīvu metodi. Kā arī HA065 un HA066 gadījumos ir nepieciešams papildus validēt ccfDNA fragmentu izcelsmi.

#### 4.2. miRNS sastāva izmaiņu noteikšana plazmā

Darba otrs mērķis bija noteikt miRNS sastāva izmaiņas HA pacientu plazmā starp paraugiem, kas ievākti pirms un 24 stundas pēc HA rezekcijas, izmantojot NGS uz *Illumina MiSeq* platformas. Arpusšūnu miRNS sastāva izmaiņas plazmā var būt asociētas ar dažādu audzēju aktivitāti (Ieva, A *et al.* 2014). Lai noteiktu miRNS sastāva izmaiņas plazmā pēc HA rezekcijas 12 HA pacientiem tika atlasīti 24 plazmas paraugi (12 pirms rezekcijas un 12 paraugi 24 stundas pēc rezekcijas), no kuriem tika izdalīta RNS. Viena pacienta paraugā tika konstatētas miRNS ar hemolīzes izcelsmi, savukārt sešu pacientu paraugos tika konstatēta iespējama hemolīzes izcelsmes miRNS klātbūtne.

Hemolīze ir process, kurā plīst sarkanās asinsšūnas un to iekššūnas saturs, ieskaitot miRNS, nonāk starpšūnu vidē. Hemolīze visbiežāk notiek asins paraugu ievākšanas vai apstrādes brīdī. Vairāki pētījumi ir pierādījuši, ka hemolīze var ietekmēt plazmā esošo miRNS saturu (Kirschner M. B. *et al.* 2011). Gadījumos, kad hemolīze netiek ņemta vērā tā var veidot neprecīzu priekšstatu par miRNS, kuras ir asociētas ar dažādām slimībām, kā rezultātā var tikt ieviesti neobjektīvi biomarķieri (Kirschner M. B. *et al.* 2013). Šī iemesla dēļ septiņu pacientu paraugiem tālāk netika veikta miRNS bibliotēku sagatavošana NGS.

NGS ir plaši pielietota metode miRNS pētījumos, jo tā ir multipleksa ar augstu jutību un sniedz iespēju atklāt jaunus miRNS veidus. Bet šobrīd miRNS bibliotēku sagatavošana ir problemātiska dēļ citu mazo nekodējošo RNS piemaisījumiem. Kā arī dēļ zemām izejas RNS koncentrācijām bibliotēku sagatavošanas laikā bieži veidojas liels daudzums adapteru dimēru. Citu mazo nekodējošo RNS un adapteru dimēru piemaisījumi aizņem sekvencēšanas kapacitāti, kā rezultātā mazos daudzumos pārstāvētas miRNS var netikt detektētas, tādēļ no šiem piemaisījumiem ir nepieciešams atbrīvoties (Coenen-Stass, A. *et al.* 2018).

Lai atbrīvotos no adapteru dimēriem un citu RNS piemaisījumiem, sākotnēji tika izmantotas magnētiskās lodītes, bet to efektivitāte bija pārāk zema, lai sekmīgi attīrītu bibliotēkas no adapteriem. Viena no augstas izšķirtspējas stratēģijām, lai bibliotēkās miRNS fragmentus atdalītu no piemaisījumiem, ir agarozes gela elektroforēze (Motameny, S. *et al.*

2010). Darbā tika pielietota *Blue Pippin* elektroforēze, kas veic automatizētu paraugu eluēšanu no gela. Rezultātā visiem paraugiem tika iegūtas bibliotēkas, kur fragmentu pīķa vidējais garums atbilda miRNS garumam. Tomēr paraugiem HA070 (pirms rezekcijas) un HA076 (24h pēc rezekcijas) paraugiem arī bija novērojami pīķi, kas atbilda piRNS, norādot uz to, ka šiem diviem paraugiem ir augstāks piRNS saturs plazmā salīdzinājumā ar pārējiem paraugiem (Ishizu H. *et al* 2012).

Sekvencēšanas rezultātu analīze norāda, ka augstākās atšķirības plazmā bija hsa-miR-6511b-3p (-1,21 reizes) un hsa-miR-378i (1,42 reizes), kas salīdzinājumā ar pētījumiem par miRNS ekspresijas atšķirībām starp HA audu paraugiem un normālas hipofīzes audu paraugiem ir nelielas (Feng Y. *et al.* 2018). Iespējams bioloģiskais skaidrojums šādām nelielām atšķirībām ir tas, ka HA rezekcijas laikā netiek izņemta visa audzēja masa. Rezultātā audzēja daļa, kas netika izņemta turpināja nelielā daudzumā sekretēt ārpusšūnas miRNS (Berkmann S. *et al.* 2013).

Tomēr miRNS statistiskās analīzes rezultāti norāda, ka kopsummā pēc datu normalizācijas miRNS sastāva izmaiņas pirms un pēc rezekcijas nav statistiski nozīmīgas ( $P_{adjusted}=0,99$ ). Norādot uz to, ka atšķirības pirms un pēc rezekcijas visticamāk nav saistītas ar HA vai arī darbā analizētā paraugkopa ir pārāk maza, lai spētu identificēt statistiski nozīmīgas izmaiņas. Fragmentu garumu atlase arī samazināja pašu miRNS koncentrāciju, kā rezultāta iespējams izmainījās miRNS sastāvs bibliotēkās. Kā arī paraugiem HA070 (pirms rezekcijas un pēc rezekcijas) un HA076 (pēc rezekcijas) ir piRNS izmēra pīķi, kuri ir ar līdzīgu koncentrāciju kā miRNS pīķi, rezultātā šajos paraugos tika iegūti mazāk miRNS nolasījumi, kas varēja ietekmēt kopējo statistiku (Ishizu H. *et al.* 2012). Vadoties pēc bioanalizatora attēliem trīs pacientu paraugiem miRNS pīķa fluorescences intensitātē pirms un pēc rezekcijas nav novērojamas atšķirības, bet pacientam HA076 pirms rezekcijas paraugā var novērot divas reizes augstāku fluorescences intensitāti nekā pēc rezekcijas paraugā. Iespējams, ka HA076 (pēc rezekcijas) parauga RNS izdalīšanas vai bibliotēkas sagatavošanas procesā ir radušies miRNS zudumi, kas ietekmēja kopējo statistiku.

Individuāli analizējot miRNS veidus četriem miRNS varēja novērot statistiski nozīmīgas izmaiņas. hsa-miR-1307 var novērot 1,28 reižu lielu pieaugumu 24 stundas pēc rezekcijas. Lai gan literatūrā nav informācijas par hsa-miR-1307 saistību ar HA, pētījumi par hsa-miR-1307 funkciju norāda uz tās saistību ar šūnu proliferāciju, diferenciaciju un iespējams tumorogēnēzi. Zhou Y. *et al.* novēroja, ka hsa-miR-1307 ekspresijas pieaugums olnīcu karcinomas šūnās ir saistīts ar platīna bāzes ķīmijterapijas rezistences attīstīšanos (Zhou Y. *et al.* 2015). Ņemot vērā,

ka hsa-miR-1307 iesaistās šūnu diferenciācijā un prolifēcijā, pozitīvs hsa-miR-1307 ekspresijas pieaugums iespējams ir saistīts ar rezekcijas laikā bojāto audu atjaunošanos.

hsa-miR-1307-3p paaugstināta ekspresija arī ir iepriekš novērota olnīcu karcinomā (Chen S. F. *et al.* 2018). Han S. *et al.* konstatēja, ka hsa-miR-1307-3p ekspresijas pieaugums ir korelē samazinātu izdzīvošanas līmeni krūts vēža gadījumā un novēroja, ka hsa-miR-1307-3p ekspresijas pieaugums stimulē šūnu proliferāciju. Iespējams, līdzīgi kā hsa-miR-1307 gadījumā, 1,36 reižu ekspresijas pieaugums 24 stundas pēc rezekcijas ir saistīts ar bojāto audu atjaunošanos.

hsa-miR-6511b-3p bija novērojams 1,21 reižu samazinājums pēc rezekcijas (-1,21). Literatūrā nav informācijas par hsa-miR-6511b-3p iesaisti bioloģiskajos ceļos, bet šīs miRNS samazināta ekspresija ir iepriekš novērota urīnpūšļa vēža audos, liecinot ka tā, iespējams, ir ar audzēju nomācošu aktivitāti (Chen L. *et al.* 2017). Tomēr darbā tika novērota -1,21 reižu samazināta ekspresija pēc rezekcijas, kas neatbalsta iespēju, ka hsa-miR-6511b-3p piemīt audzēju nomācoša aktivitāte.

hsa-miR-378i pieaugums pēc rezekcijas bija 1,42 reizes, bet šīs miRNS iesaiste bioloģiskajos ceļos šobrīd arī nav zināma. Starp 1059 miRNS arī tika identificētas astoņas miRNS, kuras ir saistītas ar HA (hsa-miR-26b, hsa-miR-130b, hsa-miR-155b, hsa-miR-200c, hsa-miR-326, hsa-miR-432, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-107), bet šo miRNS izmaiņu vērtībās, pielāgotās (*adjusted*) un individuālās P vērtības norāda, ka šo miRNS daudzums plazmā nav mainījies pēc rezekcijas, vai arī nav pietiekami liels paraugkopas skaits, lai statistiski identificētu izmaiņas (Li X. H. *et al.* 2014).

HA līdzīgi kā hipofīzes dziedzerim ir izteikta vaskularizācija, kas palielina iespējamību detektēt HA sekretētus biomarķierus plazmā (Ieva A. *et al.* 2014). Tomēr darbā iegūtie rezultāti norāda, ka HA neveic pietiekami aktīvu miRNS sekrēciju, lai spētu detektēt statistiski nozīmīgas miRNS sastāva izmaiņas pirms un 24 stundas pēc HA rezekcijas.

Pēdējo gadu laikā pētniecība par šķidrās biopsijas (no asinīm iegūtu biomarķieru analīzes) potenciālo pielietojumu ir strauji progresējusi. Šobrīd šķidrās biopsijas analīzes, kas ir vērstas uz miRNS un ccfDNA analīzēm tiek adoptētas ļaundabīgo audzēju diagnostikā un prognostikā, jo tās ir minimāli invazīvas un var sniegt plašu informāciju par audzēju (Palmirotta R. *et al.* 2018). Darba kopējais mērķis bija sniegt pirmo ieskatu un aprakstīt problēmas, kas ir saistītas ar HA izcelsmes ccfDNA detektēšanas iespējamību HA pacientu plazmā, un miRNS sastāva izmaiņu novērtēšanu HA pacientu plazmā pirms un 24 stundas pēc rezekcijas. Šķidrajai

biopsijai ir ievērojams potenciāls uzlabot HA pacientu personalizēto terapiju. Mērķētas ccfDNA analīzes ļautu novērtēt HA malignās transformācijas risku attiecīgi atvieglojot lēmumu pieņemšanu par terapijas veidu, kā arī ļautu novērtēt pēc terapijas recidīva risku (Hu W. *et al.* 2017), (Lenders N. un McCormack A. 2018). Savukārt miRNS analīzes arī var tikt pielietotas paralēli ccfDNA analīzēm arī, lai novērotu audzēja invazivitāti un recidīva risku. Kā arī katru gadu tiek identificētas jaunas miRNS, kas ir saistītas ar HA aktivitāti (Li X. H. *et al* 2014), (Yu G. *et al.* 2017). Tādēļ ir vērts turpināt pētniecību par šķidrās biopsijas pielietojuma iespējamību HA pacientiem, it īpaši tagad, kad darbā iegūtie rezultāti liecina, ka ir iespējams detektēt adenomas izcelsmes ccfDNA.

## Secinājumi

- HA pacientu plazmā ir iespējams detektēt atsevišķas HA eksoma mutācijas, izmantojot pusvadītāju NGS
- Paraugiem, kuriem plazmas ccfDNA detektēto mutāciju alternatīvās alēles īpatsvars bija tuvu 50%, nepieciešams validēt mutāciju izcelsmi.
- Četras plazmā noteiktas miRNS ir ar būtiski izmainītu ekspresiju 24 stundas pēc HA rezekcijas, tomēr šos rezultātus nepieciešams pārbaudīt plašākā HA paraugkopā.
- Asins paraugu ievākšanai un plazmas iegūšanai ir kritiska loma piemērotas miRNS izpētes paraugkopas nodrošināšanā.

## **Pateicības**

Izsaku pateicību Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centram par iespēju veikt bakalaura darba izstrādi. Paldies darba vadītājam Raitim Pečulim par palīdzību, skaidrojumiem un apmācību bakalaura darba izstrādes laikā. Paldies Kasparam Megnim par palīdzību apgūt laboratorijas metodes. Paldies Vitai Rovītei par konsultācijām un padomu sniegšanu. Paldies recenzentam Artūram Ābolam par darba novērtēšanu.

## Literatūras saraksts

1. Adamo, P., Cowley, C. M., Neal, C. P., Mistry, V., Page, K., Dennison, A. R., Shaw, J. A. (2017). 'Profiling tumour heterogeneity through circulating tumour DNA in patients with pancreatic cancer.' *Oncotarget*, 8(50), pp.87221–87233.
2. Ardekani, A. M., Naeini, M. M. (2010). 'The Role of MicroRNAs in Human Diseases', *Avicenna journal of medical biotechnology*, 2(4), pp. 161–179.
3. Arneth, B. (2018). 'Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review'. *BMC cancer*, 18(1), pp. 527.
4. ASV Pārtikas un zāļu pārvalde (2016). 'cobas EFR Mutation test v2'. (Atjaunināts 2016. gada 6. februārī, skatīts 2019. gada 12. februārī). Pieejams: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/cobas-egfr-mutation-test-v2>
5. Bell, G. I. and Reisine, T. (1993) 'Molecular biology of somatostatin receptors', *Trends in Neurosciences*. Elsevier Current Trends, 16(1), pp. 34–38.
6. Ben-Shlomo, A. and Melmed, S. (2008) 'Acromegaly', *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. Elsevier, 37(1), pp. 101–122.
7. Benhamed, M., Herbig, U., Ye, T., Dejean, A., Bischof, O. (2012) 'Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells', *Nature cell biology*, 14(3), pp. 266–275.
8. Bennett, C. W., Berchem, G., Kim, Y. J., El-Khoury, V. (2016) 'Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer', *Oncotarget*, 7(43), pp. 71013–71035.
9. Berkmann, S., Schlaffer, S., Buchfelder, M. (2013) 'Tumor shrinkage after transsphenoidal surgery for nonfunctioning pituitary adenoma', *Journal of Neurosurgery*, 119(6), pp. 1447 - 1452.
10. Bohers, E., Viailly, P. J., Dubois, S., Bertrand, P., Maingonnat, C., Mareschal, S., ... Jardin, F. (2015) 'Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis', *Haematologica*, 100(7), pp. e280–e284.
11. Boons, G., Vandamme, T., Peeters, M., Beyens, M., Driessen, A., Janssens, K., Zwaenepoel, K., Roeyen, G., Camp, G., Beeck, K., (2018) 'Cell-Free DNA From Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Tumor Patients Contains Tumor-Specific Mutations and Copy Number Variations', *Frontiers in Oncology*.

12. Bottoni, A., Piccin, D., Tagliati, F., Luchin, A., Zatelli, M. C., Uberti, E. C. D. (2005) 'miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas', *Cellular Physiology*, 204(1), pp. 280-285.
13. Bronkhorst, A. B., Wentzel, J. F., Aucamp, J., Dyk, E., Plessis, L., Pretorius, P. J. (2016) 'Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(1), pp. 157–165.
14. Chanson, P. and Salenave, S. (2008) 'Acromegaly', *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3(1), pp. 1–17.
15. Chen, L., Yuan, L., Wang, G., Cao, R., Cao, R., Peng, J., Shu, Bo., Qian, G., Wang, X., Xiao, T. (2017) 'Identification and bioinformatics analysis of miRNAs associated with human muscle invasive bladder cancer', *Molecular Medicine Reports* 16 pp. 8709-8720.
16. Chen, S. F., Liu, Z., Chaurasiya, S., Dellinger, T. H., Lu, J., Wu, X., Qin, H., Wang, J., Fong, Y., Yuan, Y. (2018) 'Identification of core aberrantly expressed microRNAs in serous ovarian carcinoma', *Oncotarget*, 9, pp. 20451-20466
17. Childs, G. V. (2009) 'Pituitary Gland (Cell Types, Mediators, Development)', in *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier, pp. 719–726.
18. Ciccarelli, A., Daly, A. F. and Beckers, A. (2005) 'The epidemiology of prolactinomas', *Pituitary*, 8(1), pp. 3–6.
19. Ciganoka, D., Balcere, I., Kapa, I., Peculis, R., Valtere, A., Nikitina-Zake, L., Lase, I., Schiöth, H. B., Pirags, V. and Klovins, J. (2011) 'Identification of somatostatin receptor type 5 gene polymorphisms associated with acromegaly', *European journal of endocrinology*, 165(4), pp. 517–25.
20. Coenen-Stass, A., Magen, I., Brooks, T., Ben-Dov, I. Z., Greensmith, L., Hornstein, E., Fratta, P. (2018) 'Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation sequencing', *RNA biology*, 15(8), pp. 1133–1145.
21. Day, P. F., Loto, M. G., Glerean, M., Russo-Picasso, M. F., Soledad, L., Giunta, D. H., (2016) 'Incidence and prevalence of clinically relevant pituitary adenomas: retrospective cohort study in a Health Management Organization in Buenos Aires, Argentina', *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 60(6).
22. Daly, A. F., Rixhon, M., Adam, C., Dempegioti, A., Tichomirowa, M. A. and Beckers, A. (2006) 'High prevalence of pituitary adenomas: A cross-sectional study in the province of Liège, Belgium', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(12), pp. 4769–4775.
23. Dénes, J., Kasuki, L., Trivellin, G., Colli, L. M., Takiya, C. M., Stiles, C. E., Barry, S., de Castro, M., Gadelha, M. R. and Korbonits, M. (2015) 'Regulation of Aryl Hydrocarbon

- Receptor Interacting Protein (AIP) Protein Expression by MiR-34a in Sporadic Somatotropinomas', *PLoS ONE*. Edited by R. M. Luque. San Francisco, CA USA: Public Library of Science, 10(2), p. e0117107.
24. Efstathiadou, Z. A., Bargiota, A., Chrisoulidou, A., Kanakis, G., Papanastasiou, L., Theodoropoulou, A., Tigas, S. K., Vassiliadi, D. A., Alevizaki, M., Tsagarakis, S. (2015) 'Impact of gsp mutations in somatotroph pituitary adenomas on growth hormone response to somatostatin analogs: a meta-analysis', *Pituitary*, 18(6), pp. 861-867.
  25. Elazezy, M., Joosse, S. A. (2018) 'Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management', *Computational and structural biotechnology journal*, 16, pp. 370–378.
  26. ElSayed SA, Bhimji SS. 'Physiology, Endocrine, Pituitary Gland'. (Atjaunināts 2017. gada 17. oktobrī, skatīts 2018. gada 12. febrūārī). StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018. Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459247/>
  27. Elshimali, Y. I., Khaddour, H., Sarkissyan, M., Wu, Y. and Vadgama, J. V (2013) 'The Clinical Utilization of Circulating Cell Free DNA (CCFDNA) in Blood of Cancer Patients, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI, 14(9), pp. 18925–18958.
  28. Ezzat, S., Asa, S. L., Couldwell, W. T., Barr, C. E., Dodge, W. E., Vance, M. L. and McCutcheon, I. E. (2004) 'The prevalence of pituitary adenomas: A systematic review', *Cancer*, 101(3), pp. 613–619.
  29. Fabian, M. R., Sonenberg, N. (2012) 'The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC', *Nature Structural & Molecular Biology*, 19, pp. 586-593.
  30. Fareh, M., Yeom, K. H., Haagsma, A. C., Chauhan, S., Heo, I., Joo, C. (2016) 'TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments', *Nature Communications*, 7, article number: 13694.
  31. Feng, Y., Mao, Z., Wang, X., Du, Q., Jian, M., Zhu, D., Xiao, Z., Wang, H., Zhu, Y. (2018) 'MicroRNAs and Target Genes in Pituitary Adenomas', *Hormone and Metabolic Research*, 50(3), pp. 179-192.
  32. Fernando, M. R., Jiang, C., Krzyzanowski, G. D., Ryan, W. L. (2017). 'New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes', *PloS one*, 12(8), e0183915
  33. Foulad, A., Bhandarkar, N. D. (2015) 'Pituitary Gland Anatomy Medscape'. (Atjaunināts 2015. gada 29. jūlijā, skatīts 2018. gada 15. janvārī).
  34. Fountas, A. and Karavitaki, N. (2017) 'Diagnosis of pituitary disease', *Medicine*. Elsevier, 45(8), pp. 464–469.

35. Freda, P. U., Chung, W. K., Matsuoka, N., Walsh, J. E., Kanibir, M. N., Kleinman, G., Wang, Y., Bruce, J. N. and Post, K. D. (2007) 'Analysis of GNAS mutations in 60 growth hormone secreting pituitary tumors: correlation with clinical and pathological characteristics and surgical outcome based on highly sensitive GH and IGF-I criteria for remission.', *Pituitary*, 10(3), pp. 275–82.
36. Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2009) 'Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs', *Genome research*, 19(1), pp. 92–105.
37. Gadelha, M. R., Trivellin, G., Hernández-Ramírez, L.C., Korbonits, M. (2013) 'Endocrine Tumor Syndromes and Their Genetics.' *Front Horm Res. Basel, Karger*, 2013, vol 41, pp. 111-140.
38. Haller, N., Helmig, S., Taenny, P., Petry, J., Schmidt, S., Simon, P. (2018) 'Circulating, cell-free DNA as a marker for exercise load in intermittent sports', *PloS one*, 13(1), e0191915.
39. Hillary, S. and Balasubramanian, S. P. (2017) 'Anatomy of the thyroid, parathyroid, pituitary and adrenal glands', *Surgery (United Kingdom)*. Elsevier Ltd, 35(10), pp. 537–541.
40. Hu, W., Yang, Y., Zhang, L., Yin, J., Huang, J., Huang, L., Fang, J. (2017) 'Post surgery circulating free tumor DNA is a predictive biomarker for relapse of lung cancer', *Cancer medicine*, 6(5), pp. 962–974.
41. Ibanez-Costa, A. and Korbonits, M. (2017) 'AIP and the somatostatin system in pituitary tumours.', *The Journal of endocrinology*. England, 235(3), pp. R101–R116.
42. Ieva, A., Butz, H., Niamah, M., Rotondo, F., Rosa, S., Sav, A., Yousef, G. M., Kovacs, K., Cusimano, M., 'MicroRNAs as Biomarkers in Pituitary Tumors', *Neurosurgery*, 75(2), pp. 181–189.
43. Ishizu, H., Siomi, H., Siomi, M. C. (2012) 'Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines', *Genes & development*, 26(21), pp. 2361–2373.
44. Ivanov, M., Baranova, A., Butler, T., Spellman, P. and Mileyko, V. (2015) 'Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation', *BMC Genomics*. BioMed Central, 16(Suppl 13), pp. S1–S1.
45. Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. O., Knippers, R. (2001) 'DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells', *Cancer Research* 61(4), pp. 1659-1665.
46. Jang, J. H., Ko, Y. S., Hong, E. K., Gwak, H. S. (2018) 'Extensive Pituitary Apoplexy after

- Chemotherapy in a Patient with Metastatic Breast Cancer’, *Brain tumor research and treatment*, 6(1), pp. 43–46.
47. Jiang, J., Chen, X., Sun, L., Qing, Y., Yang, X., Hu, X., Wan, C. (2018) ‘Analysis of the concentrations and size distributions of cell-free DNA in schizophrenia using fluorescence correlation spectroscopy’, *Translational psychiatry*, 8(1), pp. 104.
  48. Jiang, P., Chan, C. W., Chan, K. C., Cheng, S. H., Wong, J., Wong, V. W., Lo, Y. M. (2015) ‘Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), pp. E1317–E1325.
  49. Khan, K. H., Cunningham, D., Werner B., Vlachogiannis G., Spiteri, I., Heide, T., Mateos, J. F., Vatsiou, A., Lampis, A., Damavandi, M. D., Lote, H., Valeri, N. (2018) ‘Longitudinal Liquid Biopsy and Mathematical Modeling of Clonal Evolution Forecast Time to Treatment Failure in the PROSPECT-C Phase II Colorectal Cancer Clinical Trial’, *Cancer Discovery* 8(10), pp. 1270-1285.
  50. Pantel K. (2016) ‘Blood-Based Analysis of Circulating Cell-Free DNA and Tumor Cells for Early Cancer Detection’, *PLoS medicine*, 13(12), e1002205.
  51. Kolen, J.W., Neijt, J.P., Zonnenberg, B.A., Den-Otter, W. (1993) ‘The difference between benign and malignant tumours explained with the 4-mutation paradigm for carcinogenesis’, *Anticancer Research* 13(4), pp. 1179 - 1182.
  52. Kirschner, M. B., Edelman, J. J., Kao, S. C., Vallely, M. P., van Zandwijk, N., Reid, G. (2013) ‘The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers’, *Frontiers in genetics*, 4(94).
  53. Kirschner, M., Kao, S. C., Edelman, J., Armstrong, N., Valley, M. P., Zandwijk, N., Reid, G. (2011) ‘Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma’, *PLoS ONE*, 6(9), e24145.
  54. Kovacs, K., Horvath, E. and Vidal, S. (2001) ‘Classification of pituitary adenomas.’, *Journal of neuro-oncology*. United States, 54(2), pp. 121–127.
  55. Kovacs, K., Scheithauer, B. W., Horvath, E., Lloyd, R. V. (1996). ‘The world health organization classification of adenohypophysial neoplasms: A proposed five-tier scheme’. *Cancer*, 78(3), pp. 502–510.
  56. Kulski, K. (2016) ‘Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications’, *IntechOpen*.
  57. Larkin, S., Ansorge, O. ‘Development And Microscopic Anatomy Of The Pituitary Gland’. (Atjaunināts 2017. gada 15. februārī, skatīts 2018. gada 15. janvārī). De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com.

Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425703/?report=classic>

58. Lavrentaki, A., Paluzzi, A., Wass, J. A. H. and Karavitaki, N. (2017) 'Epidemiology of acromegaly: review of population studies', *Pituitary*. Springer US, 20(1), pp. 4–9.
59. Lecoq, A. L., Kamenický, P., Guiochon-Mantel, A. and Chanson, P. (2015) 'Genetic mutations in sporadic pituitary adenomas - What to screen for?', *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 43–54.
60. Lenders, N. un McCormack, A. (2018) 'Malignant transformation in non-functioning pituitary adenomas (pituitary carcinoma)', *Pituitary*. Springer US, 21(2), pp. 217-229.
61. Leo, S. De, Lee, S. Y., Braverman, L. E., Unit, E. and Sciences, C. (2016) 'Hyperthyroidism', *HHS Public Access*, 388(10047), pp. 906–918.
62. Levy, A. (2004) 'Pituitary disease: presentation, diagnosis, and management', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 75(suppl\_3), pp. iii47-iii52.
63. Li, X. H., Wang, E. L., Zhou, H. M., Yoshimoto, K., Qian, Z. R. (2014) 'MicroRNAs in Human Pituitary Adenomas', *International journal of endocrinology*, 2014, pp. 435171.
64. Liang, S., Chen, L., Huang, H., Zhi, D. (2013) 'The Experimental Study of miRNA in Pituitary Adenomas', *Turkish Neurosurgery*, 23(6), pp. 721 - 727.
65. Liyanarachchi, K. D. and Debono, M. (2017) 'Physiology of the pituitary, thyroid, parathyroid and adrenal glands', *Surgery (United Kingdom)*. Elsevier Ltd, 35(10), pp. 542–555.
66. Lopes, M. B. S. (2017) 'The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary.', *Acta neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 134(4), pp. 521–535.
67. Lopes, M. B. S. (2017) 'Pituitary Tumors'. (Atjaunināts 2015. gada 17. novembrī, skatīts 2018. gada 10. janvārī). eMedicine, Medscape. Pieejams: <https://emedicine.medscape.com/article/1868045-overview>
68. Ma, X., Zhu, L., Wu, X., Bao, H., Wang, X., Chang, Z., Shao, Y. W. and Wang, Z. (2017) 'Cell-Free DNA Provides a Good Representation of the Tumor Genome Despite Its Biased Fragmentation Patterns.', *PloS one*. United States, 12(1), p. e0169231.
69. Ma, Z. Y., Song, Z. J., Chen, J. H., Wang, Y. F., Li, S. Q., Zhou, L. F., Mao, Y., Li, Y. M., Hu, R. G., Zhang, Z. Y., Ye, H. Y., Shen, M., Shou, X. F., Li, Z. Q., Peng, H., Wang, Q. Z., Zhou, D. Z., Qin, X. L., Ji, J., Zheng, J., Chen, H., Wang, Y., Geng, D. Y., Tang, W. J., Fu, C. W., Shi, Z. F., Zhang, Y. C., Ye, Z., He, W. Q., Zhang, Q. L., Tang, Q. S., Xie, R., Shen, J. W., Wen, Z. J., Zhou, J., Wang, T., Huang, S., Qiu, H. J., Qiao, N. D., Zhang, Y., Pan, L., Bao, W. M., Liu, Y. C., Huang, C. X., Shi, Y. Y. and Zhao, Y. (2015) 'Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease', *Cell Research*. Nature Publishing

- Group, 25(3), pp. 306–317.
70. Marques, P. and Korbonits, M. (2017) ‘Genetic Aspects of Pituitary Adenomas’, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. Elsevier, 46(2), pp. 335–374.
71. Mayson, S. E. and Snyder, P. J. (2014) ‘Silent (clinically nonfunctioning) pituitary adenomas.’, *Journal of neuro-oncology*, 117(3), pp. 429–36.
72. Mehrotra, M., Singh, R. R., Loghavi, S., Duose, D. Y., Barkoh, B. A., Behrens, C., Luthra, R. (2017) ‘Detection of somatic mutations in cell-free DNA in plasma and correlation with overall survival in patients with solid tumors’, *Oncotarget*, 9(12), pp. 10259–10271.
73. Melmed, S. (2011) ‘Pathogenesis of pituitary tumors’, *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 7, pp. 257.
74. Myint, N. N. M., Verma A. M., Fernandez-Garcia D., et al. (2018) ‘Circulating tumor DNA in patients with colorectal adenomas: assessment of detectability and genetic heterogeneity’, *Cell Death Dis.* 9(9), pp. 894.
75. Monson, J. P. (2000) ‘The epidemiology of endocrine tumours’, *Endocrine-Related Cancer*, 7(1), pp. 29–36.
76. Moss, J., Magenheim, J., Neiman, D., Zemmour, H., Loyfer, N., Korach, A., Dor, Y. (2018) ‘Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease’, *Nature communications*, 9(1), pp. 5068.
77. Motameny, S., Wolters, S., Nürnberg, P., Schumacher, B. (2010) ‘Next Generation Sequencing of miRNAs - Strategies, Resources and Methods’, *Genes*, 1(1), pp. 70–84.
78. Mouliere, F., Thierry, A. R. (2012) ‘The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients’, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(1), pp. S209-S215.
79. Mouliere, F., Chandrananda, D., Piskorz, A. M., Moore, E. K., Morris, J., Ahlborn, B., Mair, R., Goranova, T. (2018) ‘Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis’, *Science Translational Medicine*, 466(10).
80. Nussey, S. and Whitehead, S. (2001) ‘Endocrinology: An Integrated Approach’. Oxford: BIOS Scientific Publishers; Chapter 7, The pituitary gland. Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27/>
81. Occhi, G., Trivellin, G., Ceccato, F., De Lazzari, P., Giorgi, G., Dematte, S., Grimaldi, F., Castello, R., Davi, M. V, Arnaldi, G., Salviati, L., Opocher, G., Mantero, F. and Scaroni, C. (2010) ‘Prevalence of AIP mutations in a large series of sporadic Italian acromegalic patients and evaluation of CDKN1B status in acromegalic patients with multiple endocrine neoplasia.’, *European journal of endocrinology*. England, 163(3), pp. 369–376.

82. Onnestam, L., Berinder, K., Burman, P., Dahlqvist, P., Engstrom, B. E., Wahlberg, J. and Nystrom, H. F. (2013) 'National incidence and prevalence of TSH-secreting pituitary adenomas in Sweden.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. United States, 98(2), pp. 626–635.
83. Page, K., Guttery, D. S., Fernandez-Garcia, D., Hills, A., Hastings, R. K., Luo, J., Shaw, J. A. (2016) 'Next Generation Sequencing of Circulating Cell-Free DNA for Evaluating Mutations and Gene Amplification in Metastatic Breast Cancer', *Clinical chemistry*, 63(2), pp. 532–541.
84. Palmirotta, R., Lovero, D., Cafforio, P., Felici, C., Mannavola, F., Pellè, E., Silvestris, F. (2018) 'Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology', *Therapeutic advances in medical oncology*, 10, 1758835918794630.
85. Peculis, R., Balcer, I., Rovite, V., Megnis, K., Valtere, A., Stukens, J., Arnican, L., Nikitina-Zake, L., Lejniaks, A., Pirags, V. and Klovins, J. (2016) 'Polymorphisms in MEN1 and DRD2 genes are associated with the occurrence and characteristics of pituitary adenomas.', *European journal of endocrinology*, 175(2), pp. 145–53.
86. Perakis, S., Speicher, M. R. (2017) 'Emerging concepts in liquid biopsies', *BMC medicine*, 15(1), pp. 75.
87. Pogue, A. I., Clement, C., Hill, J. M., Lukiw, W. J. (2014) 'Evolution of microRNA (miRNA) Structure and Function in Plants and Animals: Relevance to Aging and Disease', *Journal of aging science*, 2(2), pp. 119.
88. Qian, Z. R., Asa, S. L., Siomi, H., Siomi, M. C., Yoshimoto, K., Yamada, S., Wang, E. L., Rahman, M., Inoue, H., Itakura, M., Kudo, E., Sano, T. (2009) 'Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the *let-7* and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas', *Modern Pathology*, 22, pp. 431-441.
89. Rajaratnam, S. (2013) 'Pituitary gland imaging', *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 17(7), p. 100.
90. Reid, T. J., Post, K. D., Bruce, J. N., Kanibir, M. N., Reyes-Vidal, C. M. and Freda, P. U. (2010) 'Features at diagnosis of 324 patients with acromegaly did not change from 1981 to 2006; Acromegaly remains under-recognized and under-diagnosed', *Clinical endocrinology*, 72(2), pp. 203–208.
91. Sahu, M., Mallick, B. (2018) 'Deciphering synergistic regulatory networks of microRNAs in hESCs and fibroblasts', *International Journal of Biological Macromolecules*, 113(1), pp. 1279-1286.
92. Scherthaner-Reiter, M. H., Trivellin, G. and Stratakis, C. A. (2016) 'MEN1, MEN4, and Carney Complex: Pathology and Molecular Genetics', *Neuroendocrinology*, 103(1), pp.

- 18–31.
93. Sharma, S. T., Nieman, L. K. and Feelders, R. A. (2015) ‘Cushing’s syndrome: Epidemiology and developments in disease management’, *Clinical Epidemiology*, 7, pp. 281–293.
94. Shukla, G. C., Singh, J., Barik, S. (2011) ‘MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions’, *Molecular and cellular pharmacology*, 3(3), pp. 83–92.
95. Snyder, P. J. and Sterling, F. H. (1976) ‘Hypersecretion of LH and FSH by a Pituitary Adenoma’, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 42(3), pp. 544–550.
96. Soheli, M. H. (2016) ‘Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges’, *Achievements in the Life Sciences*, 10(2), pp. 175-186.
97. Song, Z. J., Reitman, Z. J., Ma, Z. Y., Chen, J. H., Zhang, Q. L., Shou, X. F., Zhao, Y. (2016) ‘The genome-wide mutational landscape of pituitary adenomas’, *Cell research*, 26(11), pp. 1255–1259.
98. Stasik, S., Schuster, C., Ortlepp, C., Platzbecker, U., Bornhäuser, M., Schetelig, J., Thiede, C. (2018) ‘An optimized targeted Next-Generation Sequencing approach for sensitive detection of single nucleotide variants’, *Biomolecular detection and quantification*, 15, 6–12.
99. Strauss, J. F., Barbieri, R. L., Clifton, D. K. and Steiner, R. A. (2009) *CHAPTER 1 – Neuroendocrinology of Reproduction*. 6th Edition, Yen & Jaffe’s *Reproductive Endocrinology*. 6th Edition. Elsevier.
100. Suhardja, A., Kovacs, K., Rutka, J. (2001) ‘Genetic Basis of Pituitary Adenoma Invasiveness: A Review’, *Journal of Neuro-Oncology*, 52(3), pp. 195-204.
101. Thakker, R. V, Newey, P. J., Walls, G. V, Bilezikian, J., Dralle, H., Ebeling, P. R., Melmed, S., Sakurai, A., Tonelli, F. and Brandi, M. L. (2012) ‘Clinical Practice Guidelines for Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1)’, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(9), pp. 2990–3011.
102. Trivellin, G. and Korbonits, M. (2011) ‘AIP and its interacting partners’, *Journal of Endocrinology*, 210(2), pp. 137–155.
103. Truesdell, S. S., Mortensen, R. D., Seo, M., Schroeder, J. C., Lee, J. H., LeTonqueze, O., Vasudevan, S. (2012) ‘MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP’, *Scientific reports*, 2, pp. 842.
104. Underhill, H. R., Kitzman, J. O., Hellwig, S., Welker, N. C., Daza, R., Baker, D. N., Gligorich, K. M., Rostomily, R. C., Bronner, M. P., Shendure, J. (2016) ‘Fragment Length

- of Circulating Tumor DNA', *Plos Genetics*.
105. Valpione, S., Gremel, G., Mundra, P., Middlehurst, P., Galvani, E., Girotti, M. R., Marais, R. (2018) 'Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients', *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 88, pp. 1–9.
  106. Vergès, B., Boureille, F., Goudet, P., Murat, A., Beckers, A., Sassolas, G., Cougard, P., Chambe, B., Montvernay, C. and Calender, A. (2002) 'Pituitary Disease in MEN Type 1 (MEN1): Data from the France-Belgium MEN1 Multicenter Study', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(2), pp. 457–465.
  107. Verhelst, J. and Abs, R. (2003) 'Hyperprolactinemia: pathophysiology and management.', *Treatments in endocrinology*. New Zealand, 2(1), pp. 23–32.
  108. Volik, S., Alcaide, M., Morin, R. D. and Collins, C. (2016) 'Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies', *Molecular Cancer Research*, 14(10), pp. 898–908.
  109. Wang, W., Kong, P., Ma, G., Li, L., Zhu, J., Xia, T., Wang, S. (2017) 'Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines', *Oncotarget*, 8(26), pp. 43180–43191.
  110. Watson, H., Kiddy, D. S., Hamilton-Fairley, D., Scanlon, M. J., Barnard, C., Collins, W. P., Bonney, R. C. and Franks, S. (1993) 'Hypersecretion of luteinizing hormone and ovarian steroids in women with recurrent early miscarriage', *Human Reproduction*, 8(6), pp. 829–833.
  111. Yataavelli. R.K.R., Bhusal, K. 'Prolactinoma'. (Atjaunināts 2017. gada 1. oktobrī, skatīts 2018. gada 20. februārī). StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459347/>
  112. Yoon, K. A., Park, S., Lee, S. H., Kim, J. H., & Lee, J. S. (2009). 'Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls'. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 11(3), pp.182–185.
  113. Yu, G., Wang, H., Yu, S., Li, C., Bai, J., Gui, S., Zhang, Y., Zhao, P. (2017) 'Study on miRNAs' expression for the invasion of pituitary adenomas', *Turkish Neurosurgery*, 29(3).
  114. Zhang, Z., Florez, S., Gutierrez-Hartmann, A., Martin, J. F., Amendt, B. A. (2010) 'MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression', *The Journal of biological chemistry*, 285(45), pp. 34718–34728
  115. Zhang, Q., Peng, C., Song, J., Zhang, Y., Chen, J., Song, Z., Shou, X., Ma, Z., Peng, H., Jian, X., He, W., Ye, Z., Li, Z., Wang, Y., Ye, H., Zhang, Z., Shen, M., Tang, F., Chen, H.,

Shi, Z., Chen, C., Chen, Z., Shen, Y., Wang, Y., Lu, S., Zhang, J., Li, Y., Li, S., Mao, Y., Zhou, L., Yan, H., Shi, Y., Huang, C. and Zhao, Y. (2017) 'Germline Mutations in CDH23, Encoding Cadherin-Related 23, Are Associated with Both Familial and Sporadic Pituitary Adenomas', *American Journal of Human Genetics*. Elsevier Company., 100(5), pp. 817–823.

116. Zhou, Y., Wang, M., Wu, J., Jie, Z., Chang, S., Shuang, T. (2015) 'The clinicopathological significance of miR-1307 in chemotherapy resistant epithelial ovarian cancer', *Journal of ovarian research*, 8(23).

#### **Interneta datubāzes:**

1. *UCSC In-Silico PCR*, Autors Jim Kent: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>
2. *Basic Local Alignment Search Tool*, Autori: Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134  
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
3. *Ensembl*: <http://www.ensembl.org/index.html>
4. *Primer3plus*: <https://primer3plus.com>

# PIELIKUMS

## 1. pielikums

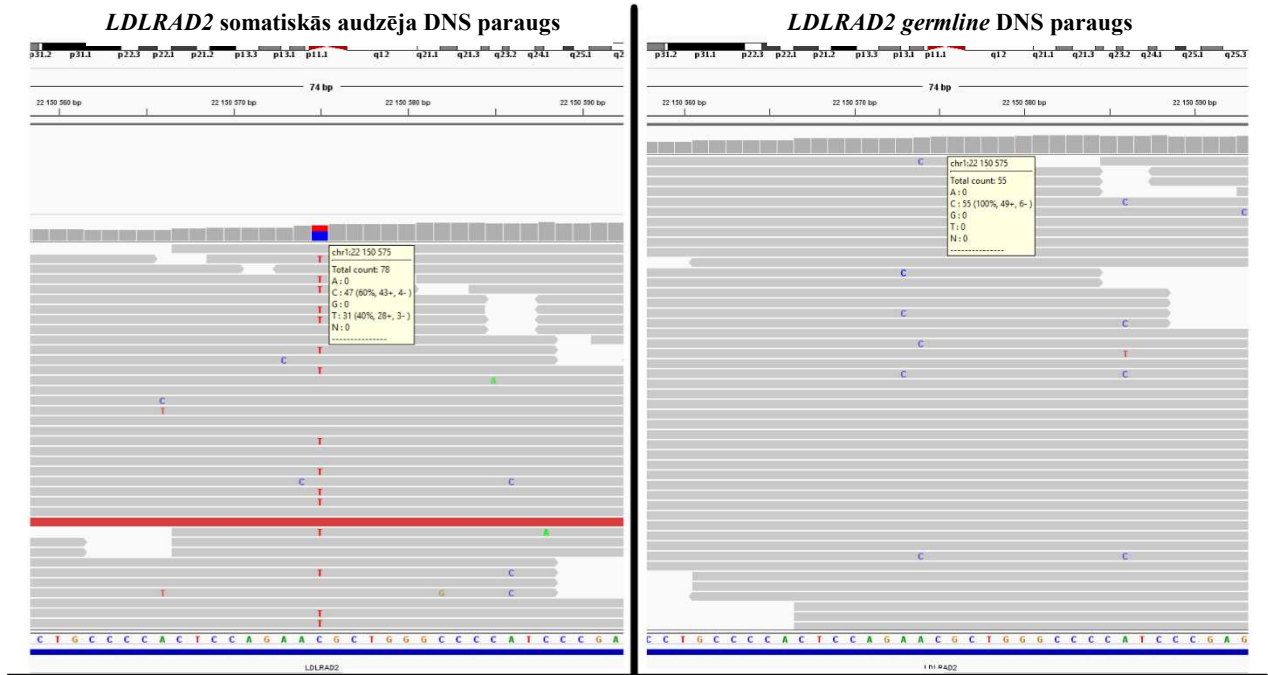
1. pielikums. NGS rezultātu parametri 16 ar Sangera sekvencēšanu validētajām mutācijām.

(+) norāda DNS ķēdes 5' - 3' virzienu, (-) norāda DNS ķēdes 3' – 5' virzienu

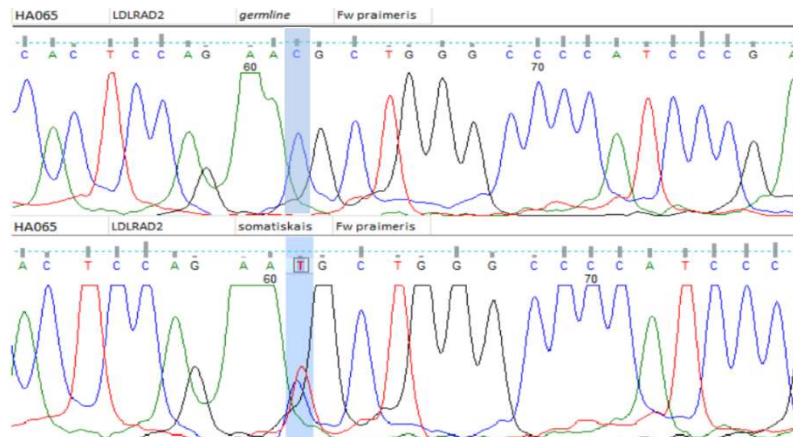
Paraugs	Gēns	Lokuss (hromosoma:bp HG19)	Germline DNS genotips	Germline DNS alēles pārklājums (nolasījumu skaits uz tiešās un apgrieztās ķēdes)	Somatiskās DNS genotips	Somatiskās DNS <i>wild type</i> alēles pārklājums (nolasījumu skaits uz tiešās un apgrieztās ķēdes)	Somatiskās DNS alternatīvās alēles pārklājums (nolasījumu skaits uz tiešās un apgrieztās ķēdes)	Somatiskās DNS alternatīvās alēles īpatsvars
HA065	<i>LDLRAD2</i>	chr1:22150575	C/C	55 (49+, 6-)	C/T	47 (43+, 4-)	31 (28+, 3-)	40%
HA065	<i>VPS13D</i>	chr1:12368563	C/C	141 (87+, 54-)	C/T	90 (60+, 30-)	65 (41+, 24-)	42%
HA065	<i>SPEN</i>	chr1:16256795	A/A	66 (22+, 44-)	A/G	35 (12+, 24-)	34 (9+, 25-)	48%
HA066	<i>GPATCH4</i>	chr1:156565233	C/C	119 (49+, 70-)	C/T	55 (25+, 30-)	47 (23+,24-)	46%
HA066	<i>G6PC2</i>	chr2:169764546	C/C	159 (57+ 102-)	C/G	44 (17+, 27-)	32 (15+, 17-)	42%
HA067	<i>PRPF8</i>	chr17:1563731	A/A	221 (101+, 110-)	A/G	82 (36+, 46-)	63 (25+, 38-)	43%
HA067	<i>SMARCA1</i>	chr4:95174031	A/A	134 (85+, 49-)	A/G	58 (35+, 25-)	30 (15+, 15-)	34%
HA067	<i>CLCNKA</i>	chr1:16358671	C/C	88 (54+, 34-)	C/G	26 (14+, 12-)	30 (19+, 11-)	54%
HA067	<i>MTFMT</i>	chr15:65316064	A/A	99 (43+, 56-)	A/T	45 (21+, 24-)	24 (11+, 13-)	35%
HA067	<i>PDE3A</i>	chr12:20774260	G/G	114 (73+ 41-)	G/A	59 (39+, 20-)	(34+, 11-)	43%
HA070	<i>RYR1</i>	chr19:38964226	G/G	25 (10+, 15-)	G/A	17 (7+, 10-)	13 (8+, 5-)	43%
HA070	<i>FXR1</i>	chr3:180633413	T/T	131 (52+, 79-)	T/A	65 (25+, 45-)	58 (22+, 36-)	47%
HA070	<i>CLEC1B</i>	chr12:10149329	G/G	79 (70+, 9-)	G/A	38 (32+, 6-)	44 (36+, 8-)	54%
HA070	<i>CCDC138</i>	chr2:109473249	G/G	80 (65+, 15-)	G/A	34 (29+, 5-)	34 (28+, 6-)	50%
HA073	<i>MPRIIP</i>	chr17:17068722	C/C	45 (27+, 18-)	C/T	21 (12+, 9-)	8 (6+, 2-)	27%
HA073	<i>ATF4</i>	chr22:39918305	C/C	39 (35+, 4-)	C/A	12 (12+, 0-)	12 (11+, 1-)	50%

## 2. pielikums

2. pielikums. C/T Nomaīņa gēnā *LDLRAD2* atklāta somatiskajā audzēja DNS ar NGS, papildus validēta ar Sangera sekvencēšanu.

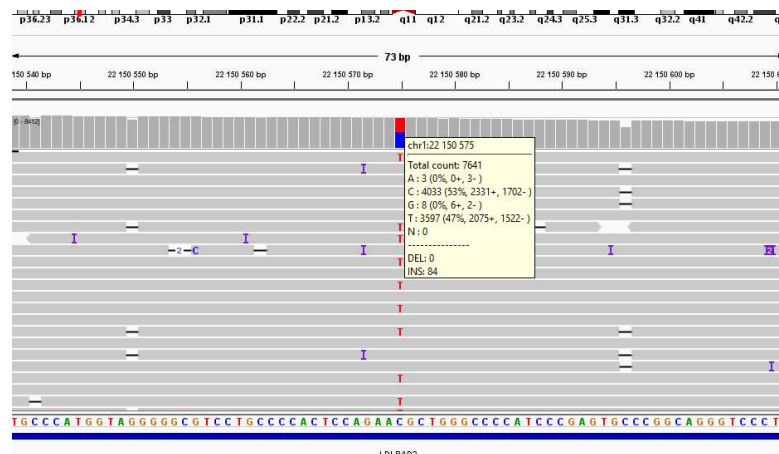


Audzēja DNS atklātā C/T nomaīņa gēnā *LDLRAD2* validēta ar Sangera sekvencēšanu



2.1. pielikums. C/T Nomaīņa gēnā *LDLRAD2* ar alternatīvās alēles īpatsvaru 47%, atklāta cfdDNA. Līdzīgi rezultāti bija arī redzami paraugos *VPS13D*, *SPEN*, *GPATCH4* un *G6PC2*.

cfdDNA atklātā C/T nomaīņa gēnā *LDLRAD2* ar (T) alternatīvās alēlēs īpatsvaru – 47%



Bakalaura darbs “Ārpusšūnu cirkulējošo nukleīnskābju izpēte hipofīzes adenomas pacientos” izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, projekta “Molekulāro marķieru identificēšana hipofīzes adenomu veidošanās, attīstības gaitas un terapijas efektivitātes prognozēšanai” (1.1.1.1/16/A/066) ietvaros.

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

Autors: Helvijs Niedra 30.05.2019.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. biol Raitis Pečulis. 30.05.2019.

Recenzents: Dr. biol. Artūrs Ābols 30.05.2019.

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 27.05.2019.

Lietvede: Diāna Marcinkēviča

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

30.05.2019. prot. Nr:                      Vērtējums:

Komisijas sekretārs: Uģis Kagainis