



LATVIJAS  
UNIVERSITĀTE

Promocijas darba  
kopsavilkums

---

Helvijs Niedra

RNS MOLEKULĀRIE  
FAKTORI HIPOFĪZES UN  
AIZKUŅĀ DZIEDZERA  
NEIROENDOKRĪNAJOS  
AUDZĒJOS

Rīga 2025



**LATVIJAS**  
**UNIVERSITĀTE**

MEDICĪNAS UN DZĪVĪBAS ZINĀTŅU FAKULTĀTE

**Helvijs Niedra**

**RNS MOLEKULĀRIE FAKTORI HIPOFĪZES UN  
AIZKUŅĀ DZIEDZERA  
NEIROENDOKRĪNAJOS AUDZĒJOS**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

doktora grāda (Ph. D.) iegūšanai bioloģijas nozarē

Apakšnozare: molekulārā bioloģija

Rīga 2025

Promocijas darbs tika izstrādāts laika posmā no 2021. gada līdz 2025. gadam Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Molekulārās un funkcionālās genomikas zinātniskajā grupā un Latvijas Universitātes Bioloģijas Fakultātē, Molekulārās bioloģijas katedrā.

Pētījumu atbalstīja ERAF grants “Molekulārie RNS faktori hipofīzes adenomas attīstībā” (projekta Nr. 1.1.1.1/18/A/089), Eiropas Savienības Atvēršanās un noturības mehānisms "Latvijas Organiskās sintēzes institūta un Latvijas Biomedicīnas Petaluma un studiju centra konsolidācija" (projekta Nr. 5.2.1.1.i.0/2/24/1/CFLA/001).

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

Darba vadītāja: *Dr. biol. Vita Rovīte*, vadošā pētniece Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā

Darba recenzenti:

- 1) Prof., *PhD*, **Justo P. Castaño**, Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC)
- 2) Prof, *Dr. biol.*, **Aija Linē**, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Latvijas Universitāte
- 3) *Dr. biol.* **Vadims Parfejevs**, Latvijas Universitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2025. gada 12. Novembrī, pulksten 13:00, Latvijas Universitātes Bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes atklātā sēdē Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju centrā, Rātsupītes ielā 1 k-1.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU Bioloģijas zinātņu nozares promocijas

Padomes priekšsēdētājs \_\_\_\_\_ / Kaspars Tārs /  
(paraksts)

Padomes sekretāre \_\_\_\_\_ / Ilze Elbere /  
(paraksts)

© University of Latvia, 2025  
© Helvijs Niedra, 2025

ISBN 978-9934-36-453-2

ISBN 978-9934-36-454-9 (PDF)

## KOPSAVILKUMS

Hipofīzes (PitNET) un aizkuņģa dziedzera (PanNET) neuroendokrīnie audzēji veidojas no priekšējās hipofīzes un aizkuņģa dziedzera saliņu neuroendokrīnajām šūnām, un tie asociēti ar virkni diagnostikas un ārstēšanas izaicinājumiem. PitNET audzējus ir grūti diagnosticēt to nelielā izmēra un atrašanās vietas dēļ, kas izceļ nepieciešamību atklāt jaunus minimāli invazīvus biomarkierus. PanNET audzēji parasti tiek diagnosticēti vēlīnās stadijās, un šobrīd literatūrā ir ierobežota izpratni par stromas šūnu lomu to attīstībā. Šīs disertācijas mērķis bija veikt šo audzēju molekulāro raksturošanu, izmantojot nākamās paaudzes sekvenčēšanu, lai atkātu potenciālas audzēja asociētās cirkulējošās miRNS PitNET pacientu plazmās, kā arī veikt telpisko transkriptomiku, lai raksturotu PanNET audzēja šūnu un stromas šūnu gēnu ekspresiju.

Veicot sekvenčēšanu ar plazmas paraugiem, kas iegūti *sinus petrosus inferior*, tika identificētas divas miRNS (miR-7-5p un miR-375-3p), kas varētu kalpot kā potenciālie markieri adrenokortikotropā hormona sekretējošu audzēju diagnosticēšanai. Tālāk, veicot validāciju, miR-7-5p tika apstiprināts kā visdaudzsološākais markieris. Cirkulējošo miRNS analīze augšanas hormona sekretējošos audzējos parādīja, ka plazmas līmeņi vairākām miRNS, tostarp miR-625-5p, samazinājās somatostatīna analogu terapijas laikā, kas norāda uz to potenciālu, kā markieri terapijas efektivitātes novērošanai. Savukārt, veicot PanNETs telpiskās transkriptomikas analīzi, tika novērtots, ka  $\alpha$ -SMA ekspresējošas stromas šūnas ir ekspresē gēnus, kas ir saistīti ar audzēja asociētajiem fibroblastiem. Turklāt gēnu ekspresijas izmaiņas, kas saistītas ar audzēja gradācijas pakāpi, tika novērotas gan audzēja, gan stromas šūnās. G3 PanNET gadījumā tika novērots, ka audzēja šūnas no audu reģioniem ar bagātīgu  $\alpha$ -SMA ekspresējošo šūnu klātbūtni pārmērīgi ekspresē *MMP9* gēnu. Visbeidzot, salīdzinot PanNET šūnu gēnu ekspresiju ar aizkuņģa dziedzera saliņu šūnām, tika identificēti atšķirīgi regulēti gēni, kas saistīti ar zināmiem onkogēniem signālceļiem. Šie signālceļi galvenokārt bija fosfoinozīdīdu 3-kināzes (PI3K) un mitogēnu aktivētas proteīnkināzes (MAPK) signālceļi, kuros tika novērota atkārtota audzēja nomācošo gēnu, piemēram, *Early Growth Response Factor 1 (EGRI)* un *RAS P21 Protein Activator 4 (RASA4)* lejupregulācija visās trīs pakāpju grupās.

**Atslēgvārdi:** hipofīzes neuroendokrīnie audzēji, aizkuņģa dziedzera neuroendokrīnie audzēji, nākamās paaudzes sekvenčēšana, cirkulējošās miRNS, telpiskā transkriptomika, audzēja stroma

# SATURS

SAĪSINĀJUMI.....	5
IEVADS .....	6
TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS.....	7
1.1 Neuroendokrīnā sistēma: struktūra un funkcija.....	7
1.2 Neuroendokrīnās šūnas: definīcija un klasifikācija.....	7
1.3 Neuroendokrīnie audzeji .....	7
1.4 Hipofīzes neuroendokrīnie audzēji.....	8
1.5 Aizkuņģa dziedzerā neuroendokrīnie audzēji .....	8
1.6 miRNS un to saistība ar PitNET patogēnēzi .....	9
1.7 Cirkulējošās miRNS PitNET .....	10
1.8 Audzēja mikrovide .....	10
MATERIĀLI UN METODES .....	12
2.1 Pacientu iesaiste .....	12
2.2 Publicētā raksta Nr. 1 dizains .....	12
2.3 Publicētā raksta Nr. 2 dizains .....	13
2.4 Publicētā raksta Nr. 3 dizains .....	13
2.5 PitNET pacientu asins paraugu apstrāde .....	14
2.6 Cirkulējošo EV asociēto miRNS izloššana no plazmas .....	14
2.7 miRNS bibliotēku sagatavošana sekvencēšanai .....	14
2.8 qPCR analīzes .....	14
2.9 PanNET audu sagatavošana priekš telpiskās transkriptomikas... 15	15
2.10 Mazo nekodējošo RNS sekvencēšanas datu apstrāde .....	15
2.11 Statistiskās analīzes publicētajā rakstā Nr. 1 .....	15
2.12 Statistiskās analīzes publicētajā rakstā Nr. 2 .....	16
2.13 Datu apstrāde un statistiskās analīzes publicētajā rakstā Nr. 3.. 16	16
REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	17
3.1 Cirkulējošās miRNS PitNET pacientu plazmā.....	18
3.2 Telpiskās transkriptomikas analīze PanNET .....	21
SECINĀJUMI .....	26
AIZSTĀVĀMĀS TĒZES .....	27
PUBLICĒTO RAKSTU SARAKSTS.....	28
PĒTĪJUMA APROBĀCIJA .....	29
PATEICĪBAS.....	30
LITERĀTŪRAS SARAKSTS .....	31

## SAĪSINĀJUMI

- AKTH – adrenokortikotropais hormons  
AOI – apgaismojuma zona  
BIPSS – bilaterālā *sinus petrosus inferior* katetrizācija  
CAF – audzēja asociētie fibroblasti  
ECM – ārpusšūnu matrikss  
EGR1 – *Early Growth Response Factor 1*  
EV – ārpusšūnu vezikulas  
G1 – pirmā pakāpe  
G2 – otrā pakāpe  
G3 – trešā pakāpe  
GH – augšanas hormons  
IPS – *sinus petrosus inferior*  
MAPK – mitogēnu aktivētā proteīnkināze  
miRNS – mikroribonuklēnskābe  
NEŠ – neuroendokrīnās šūnas  
NET – neuroendokrīnais audzējs  
NF-PitNET – hormonu nesekretējošs hipofīzes neuroendokrīnais audzējs  
NGS – nākamās paaudzes sekvencēšana  
PanNET – aizkuņģa dziedzera neuroendokrīnais audzējs  
PDAC – aizkuņģa dziedzera duktālā adenokarcinoma  
PDGF – trombocītu izcelsmes augšanas faktors  
PDGFR – trombocītu izcelsmes augšanas faktora receptors  
PitNET – hipofīzes neuroendokrīnais audzējs  
qPCR – kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija  
RASA4 – *RAS P21 Protein Activator 4*  
ROI – interesējošais apgabals  
SYP - sinaptofizīns  
TGF-β – transformējošais augšanas faktors beta  
TME – audzēja mikrovide  
α-SMA – alfa gludo muskuļu aktīns

## IEVADS

Neuroendokrīnie audzēji (NET) ir plaša audzēju grupa ar ievērojamu klīnisko un molekulāro heterogenitāti. Šī variabilitāte ir īpaši izteikta starp hipofīzes neuroendokrīniem audzējiem (PitNET) un aizkuņģa dziedzera neuroendokrīniem audzējiem (PanNET). Šie audzēji tiek diagnosticēti pēc divām dažādām klasifikācijas sistēmām un ir saistīti ar atšķirīgām klīniskām pazīmēm un diagnostikas sarežģījumiem. Lai gan PanNET parasti aug lēni, tie var metastazēties. Tur pretīm PitNET reti metastazējas, bet veicina klīniski nozīmīgu saslimstību hormonu sekrēcijas un masas efekta dēļ. Pašreizējās diagnostikas metodes nepietiekami ņem vērā cirkulējošo nukleīnskābju izmantošanu un audzēja mikrovides (TME) ietekmi uz audzēja attīstībā. Divi aspekti, kas varētu ievērojami uzlabot pacientu aprūpi, tomēr tie paliek nepietiekami pētīti NET gadījumos.

Šis promocijas darbs pievēršas diviem galvenajiem izaicinājumiem NET pētniecībā: jaunu minimāli invazīvu biomarkieru trūkums, kas varētu uzlabot PitNET diagnostiku un ārstēšanas atbildes reakcijas uzraudzību, kā arī informācijas trūkums par molekulārajiem mehānismiem, kas regulē NET TME.

Attiecīgi, šī promocijas darba mērķis ir:

- Identificēt cirkulējošās mikroribonukleīnskābes (miRNS), kurām ir potenciāls kalpot kā minimāli invazīviem asins biomarkieriem PitNET diagnosticēšanai.
- Izpētīt gēnus, kas iesaistīti PanNET audzēju attīstībā un audzēja-stromas mijiedarbībā, izmantojot telpisko transkriptomikas pieeju.

Šo mērķu sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- Analizēt ārpusšūnu vezikulu asociētās miRNS PitNET pacientu plazmā, izmantojot mazo nekodējošo RNS sekvencēšanu.
- Validēt kandidātu miRNS neatkarīgās kohortās, izmantojot kvantitatīvo polimerāzes ķēdes reakciju (qPCR).
- Izmantot telpisko transkriptomiku, lai raksturotu gēnu ekspresiju audzēja un stromas šūnās.
- Veikt funkcionālo bagātināšanas analīzi, lai noskaidrotu disregulētos signālceļus un audzēja-stromas mijiedarbības mehānismus.

# TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS

## **1.1 Neuroendokrīnā sistēma: struktūra un funkcija**

Neuroendokrīnā sistēma ir sarežģīts regulējošs tīkls, kas uztur homeostāzi, attīstību un veicina stresa reakcijas mugurkaulniekiem (Molitch 2017). To pamatā veido hipotalāms un hipofīze, kas koordinē piecas galvenās neuroendokrīnās asis: hipotalāma-hipofīzes-vairogdziedzera, hipotalāma-hipofīzes-virsnieru, hipotalāma-hipofīzes-gonādu, hipotalāma-hipofīzes-somatotropā un hipotalāma-hipofīzes-piena dziedzeru (White and Porterfield 2013). Šajā sistēmā tiek savienota nervu un endokrīnā sistēma, kur hipotalāma izdalītie hormoni caur hipofīzes vārtu sistēmu sasniedz priekšējo hipofīzi un regulē tās darbību (Yin and Gore 2010). Tālāk, hipofīzes tropiskie hormoni stimulē perifēros endokrīnos dziedzerus, kamēr atgriezeniskās saites cilpas uztur hormonālo līdzsvaru (White and Porterfield 2013).

## **1.2 Neuroendokrīnās šūnas: definīcija un klasifikācija**

Neuroendokrīnās (NEŠ) ir specializētas epitēlija vai ne-epitēlija šūnas, kurām piemīt gan endokrīno, gan nervu šūnu īpašības, piemēram, hormonu sekrēcija, darbības potenciāls un lielo, blīvo kodolvezikulu klātbūtne citoplazmā (Klöppel 2017; Oronsky et al. 2017). Galvenie NEŠ marķieri ietver hromogranīnu A, sinaptofizīnu (SYP), neironu šūnu adhēzijas molekulu un neironu specifisko enolāzi (Klöppel 2017). NEŠ tiek klasificētas pēc to izcelsmes: epitēlija NEŠ, kas rodas no endodermas; ne-epitēlija NEŠ ar neuroektodermālo izcelsmi (Asa et al. 2021). Abas šūnu grupas var veidot galvenos endokrīnos orgānus vai to kopas, piemēram, hipofīzes priekšējo daivu, vairogdziedzera epitēlijķermenīšus, aizkuņģa dziedzera saliņas un vairogdziedzera epitēlijķermenīši (Klöppel 2017).

## **1.3 Neuroendokrīnie audzeji**

NET ir heterogēna neplazmu grupa, kas rodas no NEŠ visā ķermenī, visbiežāk kuņģa-zarnu traktā, aizkuņģa dziedzerī, plaušās un hipofīzē (Reccia et al. 2023). Tiem ir dažāda klīniskā izpausme — no labdabīgiem līdz izteikti agresīviem audzējiem, un tie tiek klasificēti pēc lokalizācijas, hormonu ražošanas un proliferatīvā indeksa (Dong et al. 2024; Cives and Strosberg 2018). Saskaņā ar Pasaules Veselības organizācijas klasifikācijas sistēmu, klasiskie “karcinoīdā tipa” NET tiek iedalīti gradācijas pakāpēs, balstoties uz mitožu skaitu un/vai antigēna

Kiel-67 (Ki-67) indeksu. Augstāka pakāpe norāda uz lielāku proliferācijas kapacitāti un agresīvāku slimības gaitu (Rindi et al. 2022).

#### **1.4 Hipofīzes neiroendokrīnie audzēji**

PitNET, iepriekš definēti kā hipofīzes adenomas, ir pārsvarā labdabīgi audzēji, taču var radīt ievērojamu morbiditāti, izraisot hormonu hipersekrēciju vai masas efektus (Asa et al. 2022). Atšķirībā no klasiskajiem “karcinoīdā” veida NET, PitNET tiek klasificēti pēc hormonu un hipofīzes šūnu līnijai specifisku transkripcijas faktoru ekspresijas (Asa et al. 2022). Šie hormoni ietver augšanas hormonu (GH), prolaktīnu, vairogdziedzeri stimulējošo hormona beta subvienību, folikulus stimulējošo hormona un luteinizējošo hormona beta subvienības, adrenokortikotropo hormonu (AKTH), kā arī alfa subvienību. Noteiktie šūnu līnijas transkripcijas faktori galvenokārt ir T-boksa transkripcijas faktors 19 (TBX19, pazīstams arī kā TPIT), steroīdais faktors 1 (NR5A1, pazīstams arī kā SF1), un hipofīzes transkripcijas faktors 1 (POU1F1, pazīstams arī kā PIT1) (Asa et al. 2022). Neskatoties uz to, ka PitNET reti metastazē, to diagnosticēšana ir sarežģīta to nelielā izmēra dēļ (50% no tiem ir mazāki par 1 cm), kā arī tie atrodas anatomiski noslēgtā lokalizācijā – *sella turcica* reģionā (Molitch 2017). Klīniskā izpausme ir atkarīga no PitNET tipa un specifiska hormona hipersekrēcijas. GH hipersekrēcija izraisa akromegālija, AKTH hipersekrēcija izraisa Kušinga slimību, PRL hipersekrēcija izraisa hiperprolaktinēmiju. PitNET arī var izraisīt lokālus ar masas efektu saistītus simptomus, piemēram, redzes traucējumus, ko izraisa *chiasma opticum* kompresija (Kasuki and Raverot 2020).

#### **1.5 Aizkuņģa dziedzera neiroendokrīnie audzēji**

PanNET ir gastroenteropankreatiskās sistēmas karcinoīda veida NET, un tie var būt funkcionāli (hormonus sekretējoši) vai nefunkcionāli (hormonus nesekretējoši) (Cives and Strosberg 2018). Funkcionālie PanNET ietver insulinomas, gastrinomas un citus audzējus, kas izpaužas ar specifiskiem hormonu hipersekrēcijas saistītiem sindromiem. Nefunkcionālie audzēji bieži tiek atklāti vēlīni, kad parādās masas efekti vai metastāzes. PanNET veidojas no aizkuņģa dziedzera Langerhansa saliņu šūnām un pēc epigēnētiskajiem marķieriem tos var iedalīt  $\beta$ -šūnām līdzīgos audzējos un  $\alpha$ -šūnām līdzīgos audzējos. PanNET tiek klasificēti pēc mitožu skaita un Ki-67 indeksa; augstāka pakāpe korelē ar sliktāku prognozi (Dong et al. 2024). Atšķirībā no PitNET, PanNET audzējiem ir ievērojami lielāks metastāžu risks. Pašreizējie PanNET molekulārie

markēri ietver transkripcijas faktoros *Aristaless Related Homeobox* (ARX) un *Pancreatic and Duodenal Homeobox 1* (PDX1), kas ļauj diferencēt starp  $\alpha$ -šūnām līdzīgiem un  $\beta$ -šūnām līdzīgiem audzējiem. Papildus tam ir atklāts, ka divi gēni kas ir saistīti ar alternatīvu telomēru garuma regulāciju: hromatīna remodelētājs *ATRAX* un *Death Domain Associated Protein* (*DAXX*), satur mutācijas līdz pat 60% PanNET gadījumam. Šajos audzējos alternatīva telomēru garuma regulācija ir viena no molekulārajām iezīmēm, kas saistīta ar sliktākiem klīniskajiem iznākumiem (Hong et al. 2020; Hackeng et al. 2022).

## **1.6 miRNS un to saistība ar PitNET patoģenēzi**

miRNS ir aptuveni 22 nukleotīdu garas nekodējošās RNS, kas galvenokārt piesaistās mērķa matricas RNS (mRNS) 3' netranslējamā reģiona, kas rezultējas translācijas represijā (Rani and Sengar 2022). Tās var veidoties caur kanoniskajiem un nekanoniskajiem ceļiem, un to nobriešanu koordinē Drosha, DICER vai AGO2 proteīni (Kim, Lee, and Kim 2025). Nobriedusī (mature) miRNS ir daļa no RNS inducētā slāpēšanas kompleksa (miRISC). miRISC kompleksā esošie proteīni represē translāciju un veicina mRNS degradāciju, piesaistot deadenilācijas un dekepsšanas kompleksus (Ambros 2024; Kuzuoğlu-Oztürk et al. 2016).

Pēc atklāšanas, ka miRNS spēlē nozīmīgu lomu gēnu ekspresijas regulācijā, sekoja hipotēzes par to iesaisti vēža attīstībā. Pirmie pētījumi, kas pierādīja miRNS lomu vēža attīstībā bija Calin *et al.* un Cimmino *et al.* publicētie pētījumi, kuros tika parādīts, ka miR-15/16 delēcijas ir saistītas ar hronisku limfocitāri (Calin et al. 2002; Cimmino et al. 2005) Vēlāk miR-15/16 ietekme uz audzēju veidošanos tika apstiprināta arī hipofīzes neuroendokrīnos audzējos (PitNET) (Bottoni et al. 2005). Mūsdienās sekvencēšanas tehnoloģiju attīstība ir ievērojami paplašinājusi datubāzes ar informāciju par cilvēka miRNS, kas mūsdienās ļauj veikt plašākus pētījumus par to lomu arī PitNET attīstībā (Kozomara, Birgaoanu, and Griffiths-Jones 2019; Peculis, Niedra, and Rovite 2021). Jaunākie pētījumi ir identificējuši vairākas miRNS, kas ir saistītas ar PitNET attīstību, hormonu sekrēciju un atbildes reakciju uz ārstēšanu. Piemēram, miR-34a un miR-145 ir saistītas ar *AIP* mutāciju asociētu PitNET agresivitāti un medikamentozās terapijas rezistenci, savukārt miR-185 un miR-93 ir iesaistītas rezistences attīstībā pret somatostatīna analogiem un dopamīna agonistiem (Bogner et al. 2020; Fan et al. 2015; Z. Wu et al. 2018). Šie atklājumi izceļ miRNA potenciālu kā biomarkēri un terapeitiskie mērķi PitNET.

## **1.7 Cirkulējošās miRNS PitNET**

Cirkulējošās nukleīnskābju klātbūtne cilvēka asinīs jau tika novērota 1948. gadā (MANDEL and METAIS 1948). Kopš tā laika šīs cirkulējošās miRNS ir nonākušas pētnieku uzmanības lokā kā daudzsoļi šķidrās biopsijas marķieri, pateicoties to stabilitātei ķermeņa šķidrums un to korelāciju ar onkoloģisko, autoimūno un citu slimību stāvokļiem (Pozniak, Shcharbin, and Bryszewska 2022; Ciechomska et al. 2023). Atšķirībā no cirkulējošās audzēja DNS, miRNS ir pasargātas no degradācijas, jo tās tiek iepakotas ārpusšūnu vezikulās (EV) vai ribonukleoproteīnu kompleksos, kas palielina to pussabrukšanas periodu, attiecīgi palielinot to diagnostisko potenciālu (C. Wang and Liu 2022). Pētījumi liecina, ka EV saistītās miRNS var sniegt augstāku diagnostisko vērtību audzējos, jo to regulētie gēni ir iesaistīti ar audzēju attīstību asociētos signālceļos (Petracci et al. 2024).

Hipofīzes neuroendokrīno audzēju (PitNET) gadījumā šķidrās biopsijas izmantošana sniegtu īpaši vērtīgu pienesumu, jo hipofīzes dziedzeris pats par sevi ir anatomiski noslēgts, kas ierobežo iespējas veikt audu biopsijas (Gossing, Frohme, and Radke 2020). Tomēr pētījumi par cirkulējošajām miRNS šajos audzējos joprojām ir ierobežoti. Pašreizējie pētījumi ir mēģinājuši identificēt atšķirīgi ekspresētas cirkulējošās miRNS PitNET pacientiem dažādos apstākļos. Piemēram, Németh *et al.* izmantoja nākamās paaudzes sekvencēšanu (NGS), lai analizētu EV-izcelsmes miRNS ekspresijas līmeņus plazmā pirms un pēc operācijas. Rezultātā tika identificēts, ka miR-143-3p līmenis plazmā ir ievērojami samazinājies pēc rezekcijas pacientiem ar gonadotropās izcelsmes nefunkcionējošiem PitNET, kas liecina par miR-143-3p potenciālu kā monitoringa biomarķieri pēc operācijas (Németh et al. 2019). Turklāt Valassi *et al.* pētījumā tika atklātas divas cirkulējošās miRNS (103-a-3p and miR-660-5p), kuru ekspresija korelēja ar kaulaudu komplikācijām akromegālijas pacientiem, norādot uz miRNS lietderību, lai raksturotu endokrīno slimību progresiju (Valassi et al. 2019). Šie atklājumi izceļ cirkulējošo miRNS potenciālu kā minimāli invazīvi marķieri, lai uzlabotu PitNET diagnostiku un prognozistiku.

## **1.8 Audzēja mikrovide**

Audzējs ir kompleksa ekosistēma, kurā audzēja šūnas neatrodas vienas pašas, bet veido daļu no TME. Šo mikrovidi arī veido viena cita svarīga komponente, ko dēvē par audzēja stromu. Mūsdienų pētījumi ir atklājuši, ka stromas spēlē nozīmīgu lomu audzēja attīstībā un progresijā (de Visser and Joyce 2023). Stroma sastāvā ietilpst ārpusšūnu matrikss

(ECM), asinsvadu struktūras un audzēju asociētie fibroblasti (CAF), kas veido mijiedarbības ar audzēja šūnām (Xu et al. 2022). Audzēja-stromas attiecība var ietekmēt prognozi dažādos veidos atkarībā no audzēja veida. Piemēram, PanNETs ir parādīts, ka augsta stromas proporcija korelē ar paaugstinātu invazivitāti un metastāzes risku (Ye et al. 2024).

CAFs, galvenokārt veidojas fibroblastiem, kurus "aktīvē" audzēja izdalītie augšanas faktori, piemēram, transformējošais augšanas faktors beta (TGF- $\beta$ ) un trombocītu izcelsmes augšanas faktori (PDGFs). CAFs arī var izcelties no audos esošajām endotēlija, mezenhimālajām cilmes šūnām un pankreasa stelātu šūnām (raksturīgs tikai aizkuņģa ductālai adenokarcinomai) (Glabman, Choyke, and Sato 2022; Ping et al. 2021). CAF šūnas var uzskatīt par audzēja stromas pamata komponenti, un šīs šūnas var identificēt, izmantojot tādas marķierus kā  $\alpha$ -SMA, FAP un PDGFRs. To klātbūtne audzēja stromā bieži ir saistīta ar terapijas rezistenci un agresīvākiem fenotipiem, lai gan, pateicoties CAF izteiktajai heterogenitātei, daži šo šūnu apakštīpi var arī ierobežot audzēja augšanu, piemēram, antigēnu prezentējošie (apCAFs) var aktivēt infiltrējošās T šūnas, veicinot pretaudzēju imunitāti (Mhawech-Fauceglia et al. 2015; Vathiotis et al. 2021).

Citi funkcionāli atšķirīgi CAF apakštīpi, kas piedalās audzēja-stromas mijiedarbībā, ir miofibroblastiem līdzīgie (myCAFs) un iekaisuma veicinošie (iCAFs). Šie apakštīpi bieži tiek saistīti ar sliktākiem klīniskajiem iznākumiem, jo tie rada desmoplastisku vidi, veicot pārmērīgu ECM proteīnu sekrēciju, represē adaptīvo imūno atbildi pret audzēju un izdala citokīnus un augšanas faktorus, kas iedarbojas audzēja šūnām (Baiyao Wang et al. 2023; Zhang et al. 2023). PanNET gadījumā ir zināms, ka  $\alpha$ -SMA ekspresējošie CAF veicina audzēja agresivitāti un metastāzes, izraisot epitēliālo-mezēnhimālo tranzīciju audzēja šūnās, kā to demonstrē līdzšinējie *in vitro* kopkultūru un *in vivo* modeļsistēmu pētījumi (Lai et al. 2024; Ye et al. 2024). Šie atklājumi uzsver CAFs būtisko lomu PanNET audzēja progresijā un izceļ nepieciešamību identificēt potenciālos terapeitiskos mērķus, kas ietekmētu ne tikai audzēja šūnas, bet arī tā mikrovidi.

# MATERIĀLI UN METODEDES

## 2.1 Pacientu iesaiste

Pētījumā pacienti ar PitNET un PanNET tika iesaistīti sadarbībā ar Latvijas Valsts iedzīvotāju genoma datubāzi (Rovite et al. 2018) un lielākajām Latvijas slimnīcām, tostarp Paula Stradiņa Klīnisko Universitātes slimnīcu un Rīgas Austrumu Klīnisko Universitātes slimnīcu. Papildus tam, PanNET paraugi arī tika iegūti sadarbībā ar Ramón y Cajal Universitātes slimnīcu (Madride, Spānija). PitNET pacientu iesaiste un paraugu atlase tika veikta Eiropas Reģionālās attīstības fonda (ERAF) projekta ietvaros “Molekulārie RNS faktori hipofīzes adenomas attīstībā” (projekta Nr. 1.1.1.1/18/A/089). PanNET pacientu atlase tika veikta ERAF projekta ietvaros “Agrīnas diagnostikas un monitoringa algoritma izveide aizkuņģa dziedzera neuroendokrīno audzēju pacientiem (NEXt)” (projekta Nr. 1.1.1.5/ERANET/20/03). Visi dalībnieki sniedza divkāršu informētu piekrišanu (projektam specifisku un biobankai specifisku), un visas procedūras tika apstiprinātas attiecīgajās ētikas komitejās Latvijā un Spānijā, ievērojot Helsinku deklarācijas standartus. PitNET pacientu atlasīti un paraugu izmantošanu apstiprināja Latvijas Centrālā Medicīnas Ētikas komiteja (protokola Nr.: 22.03.07/A7 un 2/18-02-21). PanNET pacientu iesaisti un paraugu izmantošanu apstiprināja Latvijas Centrālā Medicīnas Ētikas komiteja (apstiprinājuma protokola Nr.: 1.1–2/67) un Spānijas Ramón y Cajal slimnīcas Ētikas un Zinātniskā komiteja (protokola Nr.: 196-19).

## 2.2 Publicētā raksta Nr. 1 dizains

Šajā pētījumā tika izmantota NGS analīze, lai veiktu miRNS ekspresijas raksturošanu plazmas paraugos, kas iegūti bilaterālās *sinus petrosus inferior* katetrizācijas (BIPSS). Pētījumā tika iesaistīti 24 gadus veca sieviete ar aizdomām par Kušinga slimību. Asinis tika ņemtas no kreisā un labā *sinus petrosus inferior* (IPS), izmantojot katetrus, kas tika ievietoti caur augšstilba vēnu. Asins paraugu ievākšana norisinājās trīs laika posmos pēc tam, kad tika administrēts kortikotropīna atbrīvojošais hormons. Pēc asins paraugu ievākšanas un plazmas atdalīšanas tika veikta cirkulējošo EV saistīto miRNS izolācija. Izdalītie RNS paraugi tika sagatavoti mazo nekodējošās RNS sekvencēšanai, kam sekoja NGS analīze, lai novērtētu miRNS ekspresijas līmeņus plazmās no abiem IPS. Pēc tam sekoja kandidātu atlase turpmākai validācijai, izmantojot qPCR. Validācijas kohortā tika iekļauti 26 PitNET pacientiem ar perifēro venozo asiņu paraugiem, kuri tika sadalīti sekojošās grupās: pieci pacienti ar

apstiprinātu ACTH sekretējošu PitNET, kuriem bija pieejami plazmas paraugi pirms un pēc audzēja operācija, kā arī pieejami audzēja audi; 12 ACTH sekretējošu PitNET pacienti ar ar plazmas paraugiem tikai pirms operācijas; deviņi hormonus nesekretējošu PitNET (NF-PitNET) pacienti arī ar plazmas paraugiem tikai pirms audzēja operācijas.

### **2.3 Publicētā raksta Nr. 2 dizains**

Šajā pētījumā tika izmantota NGS analīze, lai identificētu atšķirības cirkulējošo miRNS ekspresijas profilos PitNET pacientu plazmā, kas iegūta pirms un pēc operācijas. Sākotnējā kohorta ietvēra šādas grupas: astoņi GH-sekretējošie, 28 NF-PitNET, četri AKTH-sekretējošie un seši prolaktīnu sekretējošie PitNET. Paraugi, kas atbilda kvalitātes kritērijiem, tika izmantoti mazo RNS bibliotēku sagatavošanai un NGS analīzei. Diferenciālās ekspresijas analīzes tika izmantotas, lai salīdzinātu miRNS ekspresijas profilus pēc un pirms operācijas plazmas paraugos katrā audzēja grupā. Pēc tam tika atlasīti miRNS kandidāti turpmākai qPCR validācijai. Kandidātu atlase tika veikta, pamatojoties uz rezultātu pārklāšanos starp diferenciālās ekspresijas analīzi un literatūras datiem. Turpmākajās miRNS ekspresijas analīzes, izmantojot qPCR, tika veikta kandidātu ekspresijas analīze sešos GH-sekretējošos PitNET pacientos, kuriem bija administrēta somatostatīna analogu terapija un ievākti plazmas paraugi secīgos laika posmos. Tam sekoja papildus kandidātu miRNS analīze trijās paraugu grupās, kas sastāvēja no 15 GH-sekretējošo PitNET pacientiem, pieciem NF-PitNET pacientiem un 13 veselīem kontroles grupas dalībniekiem.

### **2.4 Publicētā raksta Nr. 3 dizains**

Šis pētījums bija vērsts uz PanNET audzēju un  $\alpha$ -SMA ekspresējošo stromālo šūnu gēnu ekspresijas profilēšanu ar telpiskās transkriptomikas metodi. Kohorta sastāvēja no astoņiem PanNET pacientiem, kuriem nebija piešķirta iepriekšēja medikamentozā terapija (trīs pacienti ar pirmās pakāpes [G1] audzējiem, četri pacienti ar otrās pakāpes audzējiem [G2], viens pacients ar trešās pakāpes [G3] audzēju). Formalinā fiksēti un parafinā iegūti audu bloki tika analizēti, izmantojot GeoMx® Digital Spatial Profiler (Nanostring). Interesējošie apgabali (ROIs) audos tika atlasīti, izmantojot fluorescējošās antivielas SYP (audzēja šūnas) un  $\alpha$ -SMA (stromālās šūnas), savukārt kodolus iekrāsoja ar SYTO83. Šo marķieru signāli arī tika izmantoti, lai definētu apgaismojuma zonas (AOI) – pozīcijas audos, no kurām tiek ievākti GeoMx® Cancer Transcriptome Atlas (Nanostring) paneļa zonu

bārkodi. Sešiem pacientiem tika arī bija pieejami blakus esošie neaudzēju aizkuņģa dziedzera audi, un tajos gēnu ekspresijas profilēšana tika veikta gan acināro šūnu, gan salīņu šūnu audu apgalbos.

## **2.5 PitNET pacientu asins paraugu apstrāde**

Asins paraugi, neatkarīgi no tā, vai tie tika iegūti no perifērām vēnām vai apakšējiem IPS, tika ievākti EDTA mēģenēs, uzglabāti istabas temperatūrā un centrifugēti divas reizes (2000 apgr./min un 4000 apgr./min, 10 minūtes katru reizi pie 25°C), lai atdalītu plazmu. Plazma tika sadalīta 1 mL alikvotās un uzglabāta -80°C temperatūrā līdz turpmākai analīzei.

## **2.6 Cirkulējošo EV asociēto miRNS izločšana no plazmas**

Abos pētījumos (Nr. 1 un Nr. 2) galvenā uzmanība tika pievērsta ar EV saistītajiem plazmas miRNS. Kopējās RNS, tostarp miRNS, tika izdalītas, izmantojot komplektu exoRNeasy Midi Kit (Qiagen), kas ietver EV izolāciju un sekojošu miRNS izdalīšanu. Lai identificētu paraugus, kas pakļauti hemolīzei asins paraugu ievākšanas laikā, paraugi tika pārbaudīti uz sarkano asins šūnu miRNS piesārņojumu. BIPSS pacienta gadījumā visiem plazmas paraugiem tika pievienoti 52 sintētiskie RNS spike-ins no QIAseq miRNA Library QC Spike-ins komplekta (Qiagen) papildu kvalitātes kontrolei.

## **2.7 miRNS bibliotēku sagatavošana sekvencēšanai**

Mazo nekodējošo RNS bibliotēku sagatavošana tika veikta, izmantojot Small RNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen). Izmantojot BluePippin elektroforēzi (Sage Science), tika veikta fragmentu šķirošana, lai bagātinātu bibliotēku ar Illumina adapteru saturošām miRNS (mērķa fragmentu garums 144–153 bp). Bibliotēku kvalitāte tika novērtēta, izmantojot 2100 Bioanalyzer (Agilent) un Qubit 2.0 fluorometru (Thermo Fisher). Bibliotēkas, kas atbilda kvalitātes kritērijiem, tika sekvencētas uz MiSeq un NextSeq 500 platformām (Illumina), ar mērķi – 3 līdz 5 miljoni sekvencēšanas nolasījumi uz paraugu.

## **2.8 qPCR analīzes**

Kandidātu miRNS validācijai, kā arī hemolīzes kvalitātes kontrolei tika veikta qPCR analīze, izmantojot uz SYBR Green balstītus miRCURY LNA miRNA PCR Assay reaģentu komplektus (Qiagen). cDNS tika sintezēta ar miRCURY LNA RT komplektu (Qiagen), un qPCR tika veikta uz ViiA 7 sistēmas (Thermo Fisher). Hemolīze tika

novērtēta, salīdzinot  $\Delta Ct$  vērtības starp miR-23a un miR-451. Paraugi ar  $\Delta Ct > 5$  tika izslēgti no tālākās NGS analīzes iespējama sarkano asins šūnu miRNS piesārņojuma dēļ.

## **2.9 PanNET audu sagatavošana priekš telpiskās transkriptomikas**

Formālīnā fiksētu, parafīnā ieslēgtu PanNET audu sekcijas (4–6  $\mu\text{m}$ ) tika apstrādātas, lai veiktu antigēnu atjaunošanu, kam sekoja hibridizācija ar GeoMx® Cancer Transcriptome Atlas Panel (Nanostring) zondēm. Preparāti tika bloķēti un iekrāsoti ar fluorescējošām antivielām  $\alpha$ -SMA un SYP, savukārt kodoli tika vizualizēti ar Syto83 krāsvielu. Tam sekoja oligonukleotīdu bārkodu atbrīvošana ar GeoMx® Digital Spatial Profiler (Nanostring) instrumentu. Ar Atbrīvotajiem oligonukleotīdiem tika veikta PCR, izmantojot praimerus ar Illumina indeksiem. Gala bibliotēkas kvalitāte tika pārbaudīta, izmantojot 2100 Bioanalyzer (Agilent) un Qubit 3.0 (Thermo Fisher). Sekvencēšana tika veikta uz NovaSeq 6000 sistēmas (Illumina).

## **2.10 Mazo nekodējošo RNS sekvencēšanas datu apstrāde**

FASTQ formāta faili, kas tika iegūti mazo RNS sekvencēšanas tika apstrādāti, izmantojot CLC Genomics Workbench (v20.0.4). Apstrāde ietvēra 3' adaptera apgriešanu, zemas kvalitātes nolasījumu noņemšanu (Phred vērtējums  $< 20$  vai  $< 30$ ) un garuma apgriešanu (15–55 bāzes). Nobriedušu miRNS kvantificēšana tika veikta, izmantojot miRBase v22 kā referenci, atļaujot neatbilstības līdz divām bāzēm, kā arī izomiR kvantificēšanu divu bāzes robežās. BIPSS pacienta gadījumā spike-ins kvantificēšana tika veikta, izmantojot QIAseq miRNA Library QC Spike-ins datu kopu (pieejams ražotāja vietnē).

## **2.11 Statistiskās analīzes publicētajā rakstā Nr. 1**

Lai salīdzinātu miRNS ekspresiju starp kreiso un labo IPS plazmā, datu normalizēšana tika veikta, izmantojot *trimmed mean of M values* (TMM) metodi. Intensitātes grafiks tika izmantots, lai vizualizētu 50 miRNS ar vislielāko variāciju un vismaz 1000 nolasījumiem. Diferenciālās ekspresijas analīze tika veikta, izmantojot CLC Genomics Workbench rīku (Qiagen), kas ir ekvivalents edgeR pakotnei. Tas balstās uz negatīvā binomiālā modeli, kas ir piemērots salīdzinājumu grupām ar nelielu bioloģisko replikātu skaitu. Attiecīgi šī analīzes metode tika izmantota BIPSS pacienta plazmas paraugu salīdzinājumā. qPCR datu analīzei tika izmantota Līvaka  $\Delta\Delta Ct$  metode. Papildu statistiskās analīzes tika veiktas R vidē (v4.1.2), izmantojot t-testu sapārotām grupām vai

Vilkoksona ranga summas testus, atkarībā no datu normālītātes, kas tika novērtēta ar Šapiro-Vilka testu.

### **2.12 Statistiskās analīzes publicētajā rakstā Nr. 2**

Iegūtās miRNS skaitu matricas no pirms un pēcoperācijas plazmas paraugu sekvecēšanas datiem tika importētas R vidē (v4.0.3) un analizētas ar DESeq2 (v1.30.1) pakotni (Love, Huber un Anders, 2014). Dati priekš galveno komponentu analīzes (PCA) tika transformēti, izmantojot dispersiju stabilizācijas transformācijas algoritmu DESeq2 pakotnē. Ar PCA analīzes palīdzību tika novērtēta paraugu sekvecēšanas partiju ietekme. DESeq2 analīzes modelī tika iekļauti sekojošie mainīgie: paraugu ņemšanas laiks, audzēja tips un sekvecēšanas partija. Diferenciāli ekspresētas miRNS un Log2FoldChange vērtības tika identificētas, izmantojot DESeq2 Valda testu, un p-vērtību rezultāti tika koriģēti, izmantojot *False Discovery Rate* (FDR) metodi.

### **2.13 Datu apstrāde un statistiskās analīzes publicētajā rakstā Nr. 3**

Telpiskās transkriptomikas sekvecēšanas dati tika apstrādāti izmantojot Nanostring izstrādāto GeoMx DSP analīzes darbplūsmu. Gēnu ekspresija tika noteikta, kvantificējot sekvecētos Cancer Transcriptome Atlas paneļa zonu bārkodus, kas tika atbrīvoti no katra definētā AOI. Datu normalizācija un diferenciālās ekspresijas analīze tika veikta, izmantojot Nanostring GeoMx DSP analysis suite programmatūru (Nanostring). Šūnu tipu dekonvolūcijas analīze un reversā dekonvolūcijas analīze tika veikta, izmantojot SpatialDecon paketi (v1.8.0) R vidē (v4.2.2) (Danaher et al. 2022). Funkcionālā bagātināšanas analīze ar diferenciāli ekspresētiem gēniem tika veikta, izmantojot STRING datubāzi (v11.5), un rezultātu vizualizācijai tikai izmantotas (v4.2.2) un Cytoscape (v3.9.1) programmatūras (Szklarczyk et al. 2023).

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

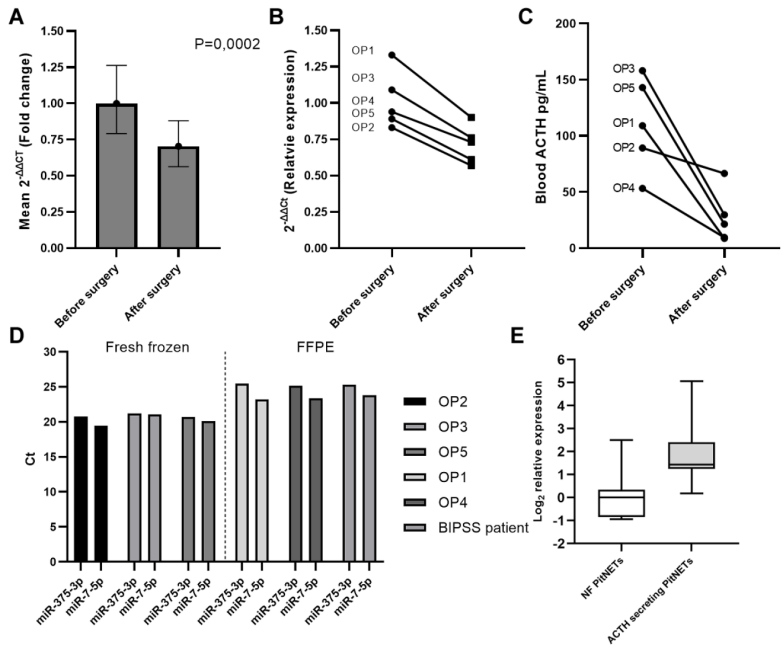
NET ir molekulāri un klīniski heterogēni, un rada nozīmīgus izaicinājumus veselības aprūpē, jo īpaši tāpēc, ka trūkst jaunu molekulāro marķieru minimāli invazīviem testiem (Sultana et al. 2023). Kā arī audzēja mikrovide (TME), kas spēlē nozīmīgu lomu citos vēža veidos, piemēram, aizkuņģa dziedzera adenokarcinomā (PDAC), kuņģa un krūts vēžos, joprojām ir mazizpētīta NET attīstībā (de Visser and Joyce 2023). Lai gan PitNET pārsvarā ir labdabīgi ar izteikti reti metastāzes gadījumiem (0,2%) (Iglesias 2023), tie joprojām ievērojami ietekmē pacientu dzīves kvalitāti un paaugstina mirstības risku, jo spēj izraisīt sindromus, kas saistīti ar hormonu hipersekrēciju un audzēja masas efektu (Toma et al. 2025). Papildus tam, to anatomiskais novietojums apgrūtina diagnostiku, uzsverot nepieciešamību pēc minimāli invazīviem biomarķieriem ar diagnostisku un prognostisku pienesumu (Butz 2022). Aizkuņģa dziedzera neuroendokrīno audzēju (PanNET) gadījumā līdzšinējie molekulārie marķieri, piemēram, ATRX/DAXX, var prediktēt paaugstinātu audzēja agresivitāti (Hackeng et al. 2022). Tomēr stromas šūnu un TME loma, īpaši fibrotiskos PanNET, un to saistība ar audzēja agresivitāti joprojām ir jāizpēta tālāk (Chatterjee et al. 2020; Lai et al. 2024).

Šī promocijas darba mērķis ir risināt šīs nepilnības NET pētniecības sfērā, izmantojot uz NGS balstītas analīzes, lai identificētu potenciālos RNS marķierus, kas varētu tikt izmantoti, lai uzlabotu pacientu diagnostiku un prognostiku. Attiecīgi, tika iegūti vairāki nozīmīgi novērojumi. Pirmajos divos pētījumos par cirkulējošo miRNS profilēšanu PitNET pacientiem tika identificētas potenciālās miRNS, kas spēj atšķirt AKTH sekrējošos un GH sekrējošos PitNET. Trešais pētījums par PanNET audu telpisko RNS profilēšanu atklāja galvenos gēnus, kurus ekspresē  $\alpha$ -SMA pozitīvās stromas šūnas starp kuriem arī bija PDGFR un NOTCH signālceļu saistīti gēni, kas potenciāli mediē audzēja-stromas komunikāciju. Paralēli arī tika novērots, ka G3 audzēju šūnas, kas atrodas tuvu  $\alpha$ -SMA pozitīvām šūnām pārekspresē *MMP9*. Visbeidzot, šis pētījums arī parādīja, ka pārmaiņas gēnu ekspresijā var novērot gan audzēja šūnās, gan  $\alpha$ -SMA eksprimējošās stromas šūnās, progresējot audzēja pakāpēm, kā arī identificēja gēnus, kuri audzēja šūnās bija atšķirīgi ekspresēti salīdzinājumā ar ne-audzēja pankreasa saliņu šūnām.

### **3.1 Cirkulējošās miRNS PitNET pacientu plazmā**

Cirkulējošo miRNS izpēte, kā minimāli invazīvi biomarķieri PitNET, šobrīd ir sākuma stadijā, galvenokārt tāpēc, ka šie audzēji parasti ir labdabīgi un neliela izmēra. Tas rada jautājumus par to vai plazmā ir pietiekami daudz PitNET izcelsmes cirkulējošās nukleīnskābes, lai tās varētu rentabli izmantot kā biomarķierus (Butz 2022). Neskatoties uz to, mūsu pētniecības grupa iepriekš pierādīja, ka somatiskās mutācijas, kas atrodamas PitNET audos, var tikt identificētas arī cirkulējošā šūnu brīvajā DNS (Megnis et al. 2019), apstiprinot iespēju detektēt PitNET izcelsmes šūnu brīvo DNS. Attiecīgi, šī promocijas darba pirmajos divos rakstos (publicētie raksti Nr. 1 un 2) tika mērķtiecīgi pētītas cirkulējošās nukleīnskābes PitNET audzējos, lai identificētu potenciālās cirkulējošās miRNS, kas varētu kalpot kā diagnostikas un monitoringa marķieri funkcionējošiem PitNET audzējiem, konkrēti AKTH un GH sekretējošiem.

Pētījumā Nr. 1 NGS tika veikta plazmas paraugos, kas savākti BIPSS laikā – pašreizējā zelta standarta metode, lai diagnosticētu AKTH sekretējošos PitNET (Zampetti et al. 2016). Salīdzinot sekvencēšanas datus atklāto miRNS skaitu, tika novērots, ka kreisajā IPS ir būtiski lielāks vairāku miRNS skaita pieaugums, pēc stimulācijas ar perifēri ievadītu kortikotropīna atbrīvojošo hormonu. Starp visvairāk augšupregulētajām miRNS bija divas miRNS: miR-375-3p un miR-7-5p. Ir zināms, ka tās ir augsti ekspresētas hipofīzes audos, kā arī funkcionālajos pētījumos ir pierādīts, ka tās ir saistītas ar hormonu eksocitozes molekulārajiem mehānismiem (Gümürdü et al. 2017; Zacharjasz et al. 2024). Veicot tālāku testēšanu ar qPCR, tika parādīts, ka miR-7-5p līmenis plazmā pazeminājās AKTH sekretējošu audzēju pacientiem pēc audzēja rezekcijas (1. attēls, paneļi A-C). Papildus tam, tika arī novērots, ka miR-7-5p stabili ekspresējas AKTH sekretējošajā PitNET audos (1. attēls D), kā arī tās līmenis plazmā bija būtiski vairāk AKTH-sekretējošos PitNET pacientos salīdzinājumā ar NF-PitNET pacientiem (1. attēls E). Šie atklājumi izceļ miR-7-5p potenciālu kā jaunu, minimāli invazīvu biomarķieri AKTH-sekretējošo PitNET diagnozei un pēcooperācijas ārstēšanas uzraudzībai.



**1. attēls.** Kandidātu miRNS validācija, izmantojot qPCR. Paneļi A–C attēlo miR-7-5p analīzi plazmā pieciem AKTH sekretējošiem PitNET pacientiem pirms un pēc audzēja operācijas. A – panelis parāda ekspresijas vērtības, kas tika aprēķinātas, izmantojot  $\Delta\Delta Ct$  metodi, un ir attēlotas kā vidējās izmaiņu reizes starp grupām. Pētījuma paraugu kopā no pieciem pacientiem miR-7-5p bija būtiski leju regulēta plazmā 24 stundas pēc operācijas ( $P = 0,0002$ ). B – panelis reprezentē miR-7-5p relatīvo ekspresiju pirms un pēc operācijas katram pacientam individuāli. P vērtība salīdzinājumam tika aprēķināta, izmantojot sapārotu grupu t-testu ar  $\Delta Ct$  vērtībām. C – panelis attēlo AKTH mērījumus, kas veikti pirms un vienu mēnesi pēc PitNET operācijas. D – panelis apstiprina miR-375-3p un miR-7-5p ekspresiju audzēja audos, ieskaitot BIPSS pacientu. E – panelis parāda ekspresijas atšķirību starp hormonus nesekretējošiem (NF) PitNET un AKTH sekretējošiem PitNET, skaidri norādot, ka miR-7-5p ir pārekspresēts AKTH sekretējošu PitNET pacientu plazmās salīdzinājumā ar NF-PitNET. Attēli ir adaptēti tieši no pētījuma Nr. 1 publicētā raksta ar nelielām izmaiņām C panelī vizuālās skaidrības uzlabošanai.

Publicētajā rakstā Nr. 2 tika veikta plazmas cirkulējošo miRNS analīze ar NGS pirms un pēc operācijas, kura arī tika iesaistīti četri AKTH sekretējošu audzēju pacienti. Starp analizētajām miRNS, miR-141-3p bija būtiski pieaugusi plazmā pēc operācijas. Tomēr šī pieauguma bioloģiskā nozīme joprojām nav skaidr. Lai gan ir iepriekš novērots, ka šī miRNS ir augšup regulēta AKTH sekretējošu audzēju audos, citos pētījumos šīs miRNS daudzums tieši plazmā neuzrādīja būtisku saistību ar AKTH sekretējošiem audzējiem (Belaya et al. 2020; Enguita et al. 2023; Vetrivel et al. 2021). Attiecīgi, pēcoperācijas pieaugums,

visticamāk, ir saistīts ar audzēja šūnu nekrozi (Pozniak, Shcharbin, and Bryszewska 2022), nevis ar aktīvu sekrēciju, kas ierobežo tā lietderību kā biomarķieri ACTH sekretējošo PitNET diagnosticēšanā.

Paralēli, pētījumā Nr. 2 arī tika veikta cirkulējošo miRNS analīze GH sekretējošo PitNET pacientu pirms un pēc operācijas plazmās. Šajā paraugu grupā tika identificētas variākas diferencialekspressētas miRNS starp kurām tika izvirzīti septiņi kandidāti tālākai testēšanai ar qPCR. Turpmākajos validācijas testos ar šiem septiņiem kandidātiem, četras miRNS (miR-625-5p, miR-181a-2-3p, miR-503-3p un miR-130b-3p) uzrādīja būtisku lejupregulāciju pirmajā mēnesī pēc somatostatīna analogu terapijas uzsākšanas. Tālākos mēnešos tikai miR-625-5p bija būtiski lejupregulēta. Šis pastāvīgā lejupregulācija iespējams ir saistīta ar izmaiņām insulīnam līdzīgā augšanas faktora 1 (IGF-1) receptoru signālceļu sistēmā, jo ir zināms, ka miR-625-5p regulē IGF-1 receptora ekspresiju (L. Wu et al. 2022; Al-Samerria and Radovick 2021). Tomēr šādam apgalvojumam ir nepieciešami papildus funkcionālie pētījumi. Papildus tam, tika arī konstatēts, ka miR-625-5p ekspresija plazmā ir būtiski samazināta GH-sekretējošo PitNET pacientu plazmā salīdzinājumā ar nefunkcionējošiem audzējiem un veseliem kontroles paraugiem, kas liecina par šīs miRNS lomu audzēja patoģenēzē un potenciālu kā marķieris, lai identificētu GH sekretējošus audzējus (He et al. 2019).

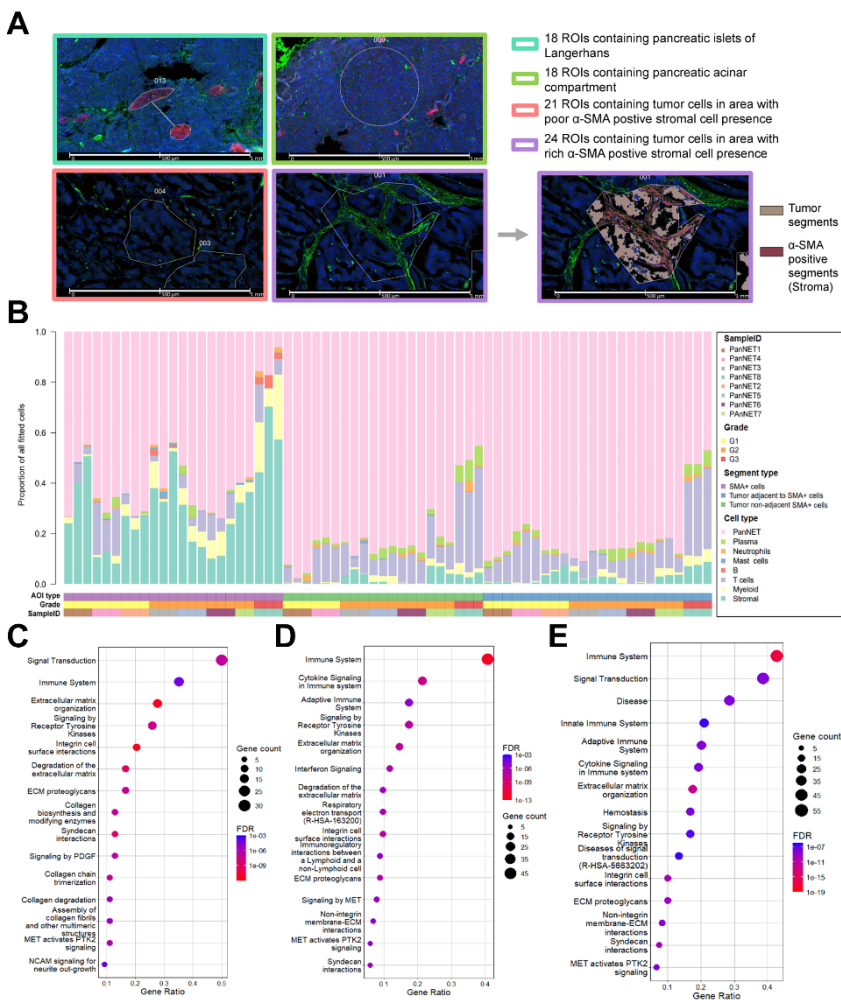
Ņemot vērā iepriekš minēto, šie divi publicētie pētījumi demonstrē cirkulējošo miRNS izmantošanas iespējas un potenciālu kā minimāli invazīvi biomarķieri PitNET audzēju diagnostikai. miR-7-5p un miR-625-5p asociācija ar AKTH- un GH-sekretējošiem audzējiem sniedz jaunus potenciālos marķierus asins analīžu paneļa izstrādei, kas ļautu uzlabot diagnostiku, pacientu stratifikāciju un ārstēšanas efektivitātes uzraudzību. Lai pilnībā izprastu to piemērojamību diagnostikā un izpētītu to lomu PitNET patoģenēzē, nepieciešama tālāka validācija lielākās pacientu grupās un funkcionālie pētījumi.

### **3.2 Telpiskās transkriptomikas analīze PanNET**

Pēdējo gadu pētījumi ir par ļaundabīgajiem audzējiem ir izceļusi, ka audzēja mikrovide var spēlēt nozīmīgu lomu audzēja attīstībā. TMI veido dinamisks tumora un saimnieka šūnu tīkls, kurā norisinās šīs šūnas komunicē savā starpā izmantojot tiešas šūnu-šūnu kontaktu mijiedarbības (integrīni, kadherīni, selektīni, imunoglobulīni) vai parakrīnos signālus (citokīni, augšanas faktori) (de Visser and Joyce 2023). Telpiskās transkriptomikas metožu attīstība ir ievērojami paātrinājuši TMI izpēti audzējos (Elhanani, Ben-Uri, and Keren 2023). Tomēr neuroendokrīno neoplazmu, tostarp PanNET, TMI joprojām ir mazizpētīts, un lielākā daļa zināšanu par TMI šajos audzējos ir iegūtas no imūnhistķīmijas un in vitro kokultūru pētījumiem (Takahashi et al. 2018; Cuny et al. 2022; Z. Chen et al. 2024; Amin et al. 2023). Šī iemesla dēļ šī darba 3. publicēta raksta mērķis bija raksturot tūmora-stromas mijiedarbību mehānismus PanNET audos, izmantojot RNS ekspresijas analīzi astoņos PanNET paraugos (visu trīs gradāciju) ar Nanostring GeoMx® tehnoloģiju, kas nodrošina gēnu ekspresijas analīzes ar telpisko izšķirtspēju (2. A attēls). Kā stromālo šūnu marķieris, tika izvēlēts tieši  $\alpha$ -SMA (alfa gludo muskuļu aktīns), jo iepriekšējos pētījumos ir novērota asociācija ar šī marķiera ekspresiju stromā un pasliktinātu slimības prognozi dažādos audzēju veidos. Papildus tam, šis marķieris arī ir augsti ekspresēts aktivētajos fibroblastos jeb CAF, it īpaši myCAF subtipos (Zhao et al. 2023; Sculthorpe et al. 2025; Muchlińska et al. 2022; Vathiotis et al. 2021).

Pēc gēnu ekspresijas novērtējuma katrā AOI sekoja šūnu tipu dekonvolūcijas analīze (2. attēls B), kas uzrādīja būtisku stromālo šūnu bagātinājumu  $\alpha$ -SMA ekspresējošajos AOI, īpaši G3 audzēja paraugā. Šie rezultāti sakrīt ar Ye *et al.* atklājumiem, kur autori novēroja, ka augstākā stromālo šūnu proporcija korelē ar augstāku audzēja pakāpi un sliktāku prognozi. (Ye et al. 2024). G1 un G2 grupu audzējos  $\alpha$ -SMA AOI datos bija identificēta salīdzinoši augsta proporcija ar audzēja šūnām. Bez audzēja un stromas šūnām,  $\alpha$ -SMA AOI bija arī novērojamas imūnšūnu populāciju (T šūnas un mieloīdas šūnas) infiltrāti. Tā kā GeoMx analīze ROI un AOI atlase lielā mērā balstās uz morfoloģijas marķieriem, tas varētu liecināt, ka  $\alpha$ -SMA izmantošana, bez papildus marķieriem, nav pietiekami efektīva pieeja, lai notvertu ekskluzīvi tikai CAF reprezentējošās šūnas. Attiecīgi,  $\alpha$ -SMA kombinēšana ar papildu CAF marķieriem, piemēram, FAP un PDGFR, varētu uzlabot šo šūnu tipu identificēšanu sekvencēšanas datos, kā arī samazinātu piemaisījumu no citām šūnām, kas nav stromālās šūnas.

Katrā  $\alpha$ -SMA AOI apgabalā bija skaidri novērojama ar CAF saistītu gēnu ekspresija, par spīti tam, ka šajos AOI arī bija nestromālo šūnu piemaisījums. Visās trīs audzēju pakāpju grupās  $\alpha$ -SMA AOI tika novērota kolagēna saimes gēnu (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL6A3*) un citu ar CAF saistītu sekretomu proteīnu (fibronektīna [*FNI*] un TGF- $\beta$  [*TGFB1*]) paaugstinātā ekspresija. Gan fibronektīnu, gan TGF- $\beta$  var izdalīt gan audzēja šūnās, gan CAF šūnās, un ir zināms, ka tie var veicināt tālāku CAF diferenciaciju (Yoon et al. 2021). Tālāk, veicot funkcionālo bagātināšanas analīzi ar gēniem, kas bija diferencialekspresēti  $\alpha$ -SMA AOI apgabalos, tika noskaidrots, ka šie gēni reprezentē ārpusšūnu matriksa (ECM) remodelēšanas, MET, PDGF un ar imūno atbildi saistītus molekulāros signālceļus (2. attēls, C-D paneli). Bija arī novērojama NOTCH signālceļa iesaiste. Lai gan NOTCH signālceļš nebija iekļauts starp 15 visvairāk pārstāvētajiem signālceļiem, ir jāuzsver, ka visās trīs audzēju grupās (G1, G2, G3)  $\alpha$ -SMA šūnās pastiprināti ekspresēja *NOTCH3* receptoru. Dati arī parādīja būtiskas atšķirības gēnu ekspresijā starp  $\alpha$ -SMA AOI no atšķirīgām audzēju pakāpēm. Tomēr, ir jāuzsver, ka audzēja audos var būt dažādi stromālo šūnu veidi, ieskaitot dažādus CAF apakštipus (Zhang et al. 2023). Attiecīgi, būtu nepieciešams veikt detalizētāku pētījumu, lai saprastu vai šī gēnu ekspresijas atšķirība starp audzēju pakāpēm ir saistīta ar to, ka izmainās kādu konkrētu CAF subtipu skaits audos, vai arī šī atšķirība ir saistīta ar gēnu ekspresijas izmaiņām kādā konkrētā CAF subtipā bez imaiņām pašu subpopulāciju skaitos. Šādā pētījumā papildu CAF subtipu identifikāciju varētu veikt, iekļaujot papildu marķierus: interleikīns 6 (IL-6) un PDGFRA iekaisuma CAF marķieri,  $\alpha$ -SMA un PDGFRB miCAF marķieri, un CD74 apCAF marķieris (Zhang et al. 2023).



**2. attēls.** Telpiskās transkriptomikas analīze PanNET. A attēls – pētījuma dizains. ROI – interesējošais apgabals, AOI – apgaismojuma zona. Lai veiktu audzēja audu RNS ekspresijas profilēšanu, tika izvēlēti divu veidu ROI: ROI ar audzēja šūnām, bet ar zemu blakus esošo  $\alpha$ -SMA ekspresējošo šūnu klātbūtni, un ROI ar audzēja šūnām un ar bagātīgu blakus esošo  $\alpha$ -SMA šūnu klātbūtni. B attēls – šūnu tipu dekonvolūcijas analīzes rezultāti, kas definē relatīvas šūnu tipu proporcijas katrā analizētajā AOI. C, D un E attēli – funkcionālās bagātināšanas analīzes rezultāti ar gēniem, kas bija augšregulēti vai lejupregulēti  $\alpha$ -SMA-ekspresējošās šūnās. Grafikos parādīti tikai 15 visvairāk pārstāvētie signāļceļi pēc FDR vērtības. Šeit var novērot, ka starp 15 visvairāk pārstāvētajiem signāļceļiem ir signāļceļi, kas saistīti ar ārpusšūnu matricas organizēšanu, imūno šūnu mijiedarbībām, kā arī PDGF un MET signāļceļiem. Izmantotā signāļceļu datubāze – Reactome. Analīze tika veikta, izmantojot STRING v11.5 tīmekļa lietojumprogrammu. C – analīze G1 audzējos; D – analīze G2 audzējos; E – analīze G3 audzējā.

Nemot vērā, ka CAF var veicināt audzēja progresiju un terapijas rezistenci, izmantojot gan tiešas šūnu kontaktu mijiedarbības, gan parakrīnas signālus (Maneshi et al. 2021), kā piemēram, PDAC gadījumā, kur CAF un audzēja šūnu savstarpējā saziņa var inducēt EMT (epitēlija-mezenhimālā pāreja) signālceļus (Guinn et al. 2025); rodas jautājums, vai līdzīgu CAF efektu uz audzēja šūnām varētu arī novērot PanNET gadījumos. Lai to izpētītu, audzēja šūnu saturoši AOI no reģioniem ar bagātīgu  $\alpha$ -SMA ekspresējošu stromālo šūnu klātbūtni tika salīdzināti ar audzēja šūnu AOI no reģioniem, kur  $\alpha$ -SMA šūnu bija ievērojami mazāk (skatīt 2. attēlu A). Iegūtie rezultāti no šāda salīdzinājuma bija samērā pretēji gaidītajam, jo G1 un G2 audzējos netika novērotas nekādas būtiskas gēnu ekspresijas atšķirības. Šāds rezultāts varētu liecināt par to, ka  $\alpha$ -SMA ekspresējošo šūnu attālumam līdz audzēja šūnām ir minimāla ietekme, tomēr arī pastāv iespēja, ka šāda metodoloģiskā pieeja ir ar nepietiekamu jutību, lai identificētu gēnus audzēja šūnas kuru ekspresiju ietekmētu signāli no tuvu esošajām  $\alpha$ -SMA šūnām. Vienīgās izmaiņas bija novērojamas G3 audzējā, kur tika novērota būtiska MMP9 gēna augšregulācija audzēja šūnās, kas nāca no reģioniem ar izteiktu  $\alpha$ -SMA-ekspresējošu stromālo šūnu klātbūtni. MMP9, jeb matriksa metālproteāze 9, veicina audzēja invāziju un metastāzes, remodelējot ekstracelulāro matriksu un veicinot EMT (Radisky and Radisky 2010; Egeblad and Werb 2002; Wiechec et al. 2021; Shan et al. 2017). MMP9 pārmērīga ekspresija ir saistīta ar passliktinātu prognozi vairākos vēža veidos, kā arī MMP9 inhibitori ir pēdējā laikā ir bijuši pētīti klīniskajos izmēģinājumos, lai gan ar ierobežotiem panākumiem (Shah et al. 2021). Šie rezultāti norāda uz nepieciešamību veikt papildu funkcionālus pētījumus, lai izprastu MMP9 lomu PanNET attīstībā.

Visbeidzot, lai novērtētu gēnu ekspresijas izmaiņas PanNET šūnās, audzēja šūnu saturošās AOI tika salīdzinātas ar pankreasa saliņu šūnu AOI. Visās trīs gradācijas pākāpju grupās izmainītie gēni bija bagātināti ar mitogēnu aktivēto proteīnkināžu (MAPK) signālceļiem. Ir zināms, ka žurku sarkomas vīrusa (RAS) grupas GTPāzes (NRAS, KRAS, HRAS) ir MAPK signālceļa regulatori, un tās bieži ir mutētas ļaundabīgajos audzējos, tai skaitā PDAC (Bahar, Kim, and Kim 2023; Waters and Der 2018). PanNET gadījumos, mutācijas RAS gēnos ir izteikti reti sastopamas (Konukiewicz et al. 2018), bet interesantā kārtā, šajā pētījumā tika konstatēta *RAS P21 Protein Activator 4 (RASA4)* gēna (RAS aktivitātes regulatorproteīna) lejueregulācija. *RASA4* lejueregulācija ir saistīta ar augstāku mirstības risku dzemdes kakla vēzī (J. Chen et al. 2021).

Gēnu ekspresijas izmaiņas audzēja šūnās arī bija novērojamas PI3K signālceļos. Šajā signālceļā bija novērojama ar atkārtota *EGR1* lejupregulācija visās trīs PanNET pakāpju grupās. *EGR1* kodē transkripcijas faktoru, kas regulē fibrozi, traumu reakciju un imūnos procesus (Saha et al. 2021; Bin Wang et al. 2021). Vadoties pēc STRING datubāzes, tas mijiedarbojas ar p53 un MAPK3 proteīniem (Szkłarczyk et al. 2023), un var aktivēt PTEN – audzēja supresors, kas bieži ir lejupregulēts PanNET audzējos (Chang et al. 2022; Virolle et al. 2001; Baron et al. 2006), tai skaitā arī šī pētījuma G2 un G3 audzējos. Tomēr *EGR1* loma audzējos ir atkarīga no konteksta, jo daļā audzēja šis faktors var vecināt metastāžu attīstību, kamēr citos audzējos tas var spēlēt audzēju nomācošu lomu (Saha et al. 2021). Citi, atkārtoti lejupregulētie gēni PanNET šūnās, ietvēra *CD99*, *SPINK1*, *PLA2G1B* un *RBP4*. Vadoties pēc “Cilvēka proteīnu atlants” datubāzes informācijas, šie visi ir pankreasa specifiski gēni un ir saistīti ar pankreasa šūnu normālo funkciju (Thul and Lindskog 2018). To lejupregulācija, visticamāk, atspoguļo audzēja dediferenciāciju. Tomēr jāpiebilst, ka iepriekšējā PanNET imūnhistoķīmiskās analīzes pētījumā bija novērots, ka *CD99* ekspresijas zudums ir novērojams pacientiem ar sliktāku prognozi (Ali et al. 2006; Goto et al. 2004). Savukārt, aknu vēzī *RBP4* gēna lejupregulācija korelē ar sliktu izdzīvošanu (Li et al. 2021).

## SECINĀJUMI

- 1 Cirkulējošās miR-375-3p un miR-7-5p varētu kalpot kā neinvazīvi diagnostikas marķieri Kušinga slimības noteikšanai, potenciāli aizvietojot augsti invazīvo BIPSS procedūru.
- 2 Cirkulējošo miR-375-3p un miR-7-5p ekspresijas palielināšanās asins plazmā pēc CRH ievadīšanas norāda uz to, ka šīs miRNS, iespējams, ir ACTH sekrēcijas molekulāro mehānismu komponentes. Lai apstiprinātu šo hipotēzi, nepieciešami papildu funkcionāli pētījumi.
- 3 miR-625-5p lejupregulācija GH sekretējošu PitNET pacientu plazmā pēc SSA terapijas un tās saistība ar IGF-1 signālceļiem, liecina par tiešu šīs miRNS lomu PitNET patoģenēzē, kā arī izceļ tās potenciālu kā marķieris minimāli invazīva testa izstrādei.
- 4 PanNET gadījumos, agusta klasisko ārpusšūnu matrkksa gēnu (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL6A3* un *FNI*) un ar ECM-modifikāciju, PDGFR, NOTCH un MET saistītu signālceļu pārstāvība  $\alpha$ -SMA ekspresējošās stromālajās šūnās, norāda uz vēža saistīto fibroblastu klātbūtni audzēja audos un liecina par to iesaisti PanNET mikrovides pārveidē.
- 5 CAF attālums līdz audzēja šūnām šķietami ierobežoti ietekmē audzēja šūnu gēnu ekspresiju, izņemot G3 PanNET gadījumā, kur tika konstatēta *MMP9* gēna pāaugstināta ekspresija audzēja šūnās no reģioniem, kas bagāti ar  $\alpha$ -SMA-ekspresējošām šūnām. Tomēr šis novērojums ir balstīts tikai uz vienu G3 audzēja gadījumu.
- 6 PanNET progresējot uz augstāku pakāpi, izmaiņas gēnu ekspresijā būs atrodamas gan audzēja šūnās, gan arī apkārtējās  $\alpha$ -SMA-ekspresējošās stromālajās šūnās.
- 7 Disregulētie gēni audzēja šūnās, salīdzinot ar pankreasa saliņu šūnām, ir saistīti ar PI3K un MAPK signālceļiem, kā arī vairāki gēni bija atkartoti lejupregulēti visās audzēja pakāpēs, tostarp *EGRI* un *RASA4*, kuriem piemīt audzēju nomācošas īpašības.

## AIZSTĀVĀMĀS TĒZES

- 1 miR-7-5p var izmantot, lai atšķirtu ACTH sekretējošos pacientus no nefunkcionējošiem PitNET pacientiem un veseliem kontroles subjektiem; tādēļ tas ir vērtīgs kandidāts cirkulējošo miRNS balstītai testu izstrādei, lai diagnosticētu ACTH sekretējošos PitNET.
- 2 miR-625-5p varētu kalpot kā asins biomarķieris tālākai testēšanai lielākās GH sekretējošu PitNET pacientu kohortās.
- 3 Augšupregulētie gēni  $\alpha$ -SMA šūnās norāda uz CAF klātbūtni, un to mijiedarbība ar audzēja šūnām, iespējams, tiek mediēta caur PDGF, NOTCH un MET signālceļiem.
- 4 G3 PanNET audzēja šūnas, kas atrodas tuvumā  $\alpha$ -SMA ekspresējošām šūnām, paaugstināti ekspresē *MMP9* ekspresija.
- 5 PanNET audzējiem progresējot pakāpēs, gēnu ekspresijas izmaiņas notiek ne tikai audzēja šūnās, bet arī  $\alpha$ -SMA stromālajās šūnās.

## PUBLICĒTO RAKSTU SARAKSTS

**Publicētais raksts Nr. 1** – Niedra H, Peculis R, Konrade I, Balcere I, Romanovs M, Steina L, Stukens J, Sokolovska J, Klovins J, Rovite V. Case Report: Micro-RNAs in Plasma From Bilateral Inferior Petrosal Sinus Sampling and Peripheral Blood From Corticotroph Pituitary Neuroendocrine Tumors. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Apr 22;13:748152. doi: 10.3389/fendo.2022.748152.

**Publicētais raksts Nr. 2** – Niedra H, Peculis R, Litvina HD, Megnis K, Mandrika I, Balcere I, Romanovs M, Steina L, Stukens J, Breiksa A, Nazarovs J, Sokolovska J, Liutkeviciene R, Vilkeviciute A, Konrade I, Rovite V. Genome wide analysis of circulating miRNAs in growth hormone secreting pituitary neuroendocrine tumor patients' plasma. *Front Oncol*. 2022 Sep 9;12:894317. doi: 10.3389/fonc.2022.894317.

**Publicētais raksts Nr. 3** – Niedra H, Peculis R, Saksis R, Mandrika I, Vilisova S, Nazarovs J, Breiksa A, Gerina A, Earl J, Ruz-Caracuel I, Rosas MG, Pukitis A, Senterjakova N, Rovite V. Tumor and  $\alpha$ -SMA-expressing stromal cells in pancreatic neuroendocrine tumors have a distinct RNA profile depending on tumor grade. *Mol Oncol*. 2025 Mar;19(3):659-681. doi: 10.1002/1878-0261.13727. Epub 2024 Sep 8.

## PĒTĪJUMA APROBĀCIJA

- 1 **Niedra H**, Peculis R, Breiksa A, Gerina A, Vilisova S, Earl J, Ruz-Caracuel I, Rovite V. Spatially resolved transcriptomics analysis of cancer associated fibroblasts in pancreatic neuroendocrine tumors. 2023 July 8. 47<sup>th</sup> FEBS Congress. Stenda referāts.
- 2 **Niedra H**, Peculis R, Breiksa A, Gerina A, Vilisova S, Earl J, Ruz-Caracuel I, Rovite V. Digital Spatial Profiling of RNA in Tumor Cells and  $\alpha$ -SMA-Positive Stromal Cells of Pancreatic Neuroendocrine Tumors. 2024 October 10. PMNET forum 2024. Stenda referāts.
- 3 **Niedra H**, Peculis R, Litvina H D, Megnis K, Balcere I, Romanovs M, Steina L, Stukens J, Breiksa A, Nazarovs J, Sokolovska J, Liutkeviciene R, Vilkeviciute A, Konrade I, Rovite V. Genome wide analysis of circulating miRNAs in growth hormone secreting pituitary neuroendocrine tumor patients' plasma. 2022 July 15. FEBS3+ conference. Stenda referāts.
- 4 **Niedra H**, Peculis R, Konrade I, Balcere I, Romanovs M, Steina L, Stukens J, Sokolovska J, Klovinis J, Rovite V. Discovery of novel miRNA markers for pituitary neuroendocrine tumour. 2022 June 11, ESHG 2022 Congress. Stenda referāts (prezentēja Rovite V.)
- 5 **Niedra H**, Peculis R, Litvina H D, Megnis K, Balcere I, Romanovs M, Steina L, Stukens J, Breiksa A, Nazarovs J, Sokolovska J, Liutkeviciene R, Vilkeviciute A, Konrade I, Rovite V. Genome wide analysis of circulating miRNAs in growth hormone secreting pituitary neuroendocrine tumor patients' plasma. 2022 February 18. Latvijas Bioķīmisku Biedrība conference. Mutiska prezentācija.
- 6 **Niedra H**, Peculis R, Konrade I, Balcere I, Romanovs M, Steina L, Stukens J, Sokolovska J, Klovinis J, Rovite V. Landscape of circulating miRNAs in plasma from bilateral inferior petrosal sinus sampling of corticotroph pituitary neuroendocrine tumor. 2021 March 22. RSU Research Week 2021. Mutiska prezentācija.

## PATEICĪBAS

Pētījuma darbs tika veikts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Molekulārās un funkcionālās genomikas nodaļā no 2021. līdz 2025. gadam. Pētījumu finansēja ERAF grants “Molekulārie RNS faktori hipofīzes adenomas attīstībā” (projekta Nr. 1.1.1.1/18/A/089), Eiropas Savienības Atveseļošanas un noturības mehānisma fonda projekts "Latvijas Organiskās sintēzes institūta un Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra konsolidācija" (projekta Nr. 5.2.1.1.i.0/2/24/I/CFLA/001).

Es izsaku sirsnīgu pateicību Latvijas iedzīvotāju genoma datu bāzei par līdzdalību dalībnieku iesaistē un bioloģisko paraugu uzglabāšanu.

Vislielākā pateicība un cieņa tiek izteikta Latvijas Universitātes fondam par finansiālo atbalstu visā studiju laikā no 2017. līdz 2024. gadam, kā arī par brīnišķīgo Latvijas studentu atbalstu.

Īpaši silta pateicība tiek izteikta manai vadītājai Dr. biol. Vitai Rovītei par disertācijas vadīšanu un sniegtajiem padomiem tās izstrādes laikā.

Paldies maniem kolēģiem Raitim Pečulim, Ilonai Mandrikai un Rihardam Saksim no Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra Molekulārās un funkcionālās genomikas grupas par palīdzību, padomiem un sadarbību.

Visbeidzot, es vēlos izteikt visdziļāko pateicību savai partnerei Olesjai Rogozai, kā arī saviem draugiem un ģimenei par viņu nenovērtējamo atbalstu, iedrošinājumu un apbrīnojami toleranto attieksmi pret maniem daudzajiem pārmetumiem par ikdienas studiju problēmām.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Al-Samerria, Sarmed, and Sally Radovick. 2021. "The Role of Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) in the Control of Neuroendocrine Regulation of Growth." *Cells* 10 (10). <https://doi.org/10.3390/cells10102664>.
2. Ali, Abdullah, Stefano Serra, Sylvia L Asa, and Runjan Chetty. 2006. "The Predictive Value of CK19 and CD99 in Pancreatic Endocrine Tumors." *The American Journal of Surgical Pathology* 30 (12): 1588–94. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213309.51553.01>.
3. Ambros, Victor. 2024. "MicroRNA-Mediated Gene Regulation and the Resilience of Multicellular Animals." *Postepy Biochemii* 70 (1): 62–70. [https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_515](https://doi.org/10.18388/pb.2021_515).
4. Amin, Tania, Fabrice Viol, Jenny Krause, Martina Fahl, Corinna Eggers, Fayez Awwad, Benjamin Schmidt, et al. 2023. "Cancer-Associated Fibroblasts Induce Proliferation and Therapeutic Resistance to Everolimus in Neuroendocrine Tumors through STAT3 Activation." *Neuroendocrinology* 113 (5): 501–18. <https://doi.org/10.1159/000528539>.
5. Asa, Sylvia L., Ozgur Mete, Michael D. Cusimano, Ian E. McCutcheon, Arie Perry, Shozo Yamada, Hiroshi Nishioka, et al. 2021. "Pituitary Neuroendocrine Tumors: A Model for Neuroendocrine Tumor Classification." *Modern Pathology* 34 (9): 1634–50. <https://doi.org/10.1038/s41379-021-00820-y>.
6. Asa, Sylvia L, Ozgur Mete, Arie Perry, and Robert Y Osamura. 2022. "Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumors." *Endocrine Pathology* 33 (1): 6–26. <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09703-7>.
7. Bahar, Md Entaz, Hyun Joon Kim, and Deok Ryong Kim. 2023. "Targeting the RAS/RAF/MAPK Pathway for Cancer Therapy: From Mechanism to Clinical Studies." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (1): 455. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01705-z>.
8. Baron, V, E D Adamson, A Calogero, G Ragona, and D Mercola. 2006. "The Transcription Factor Egr1 Is a Direct Regulator of Multiple Tumor Suppressors Including TGFbeta1, PTEN, P53, and Fibronectin." *Cancer Gene Therapy* 13 (2): 115–24. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700896>.
9. Belaya, Zhanna, Patimat Khandaeva, Larisa Nonn, Alexey Nikitin, Alexander Solodovnikov, Ivan Sitkin, Andrey Grigoriev, et al. 2020. "Circulating Plasma MicroRNA to Differentiate Cushing's Disease From Ectopic ACTH Syndrome." *Frontiers in Endocrinology* 11:331. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00331>.
10. Bogner, Eva-Maria, Adrian F Daly, Sebastian Gulde, Auli Karhu, Martin Irmeler, Johannes Beckers, Hermine Mohr, Albert Beckers, and Natalia S Pellegata. 2020. "MiR-34a Is Upregulated in AIP-Mutated Somatotropinomas and Promotes Octreotide Resistance." *International Journal of Cancer* 147 (12): 3523–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.33268>.

11. Bottoni, Arianna, Daniela Piccin, Federico Tagliati, Andrea Luchin, Maria Chiara Zatelli, and Ettore C degli Uberti. 2005. "MiR-15a and MiR-16-1 down-Regulation in Pituitary Adenomas." *Journal of Cellular Physiology* 204 (1): 280–85. <https://doi.org/10.1002/jcp.20282>.
12. Butz, Henriett. 2022. "Circulating Noncoding RNAs in Pituitary Neuroendocrine Tumors—Two Sides of the Same Coin." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms23095122>.
13. Calin, George Adrian, Calin Dan Dumitru, Masayoshi Shimizu, Roberta Bichi, Simona Zupo, Evan Noch, Hansjuerg Aldler, et al. 2002. "Frequent Deletions and Down-Regulation of Micro- RNA Genes MiR15 and MiR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24): 15524–29. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>.
14. Chang, Tsung-Ming, Pei-Yi Chu, Hui-You Lin, Kuo-Wei Huang, Wen-Chun Hung, Yan-Shen Shan, Li-Tzong Chen, and Hui-Jen Tsai. 2022. "PTEN Regulates Invasiveness in Pancreatic Neuroendocrine Tumors through DUSP19-Mediated VEGFR3 Dephosphorylation." *Journal of Biomedical Science* 29 (1): 92. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00875-2>.
15. Chatterjee, Deyali, Nikolaos A Trikalinos, Greg A Williams, Jingxia Liu, William G Hawkins, and Chet Hammill. 2020. "Intratumoral Fibrosis and Tumor Growth Pattern as Prognostic Factors in Optimally Resected Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms: An Analysis of 168 Cases." *Pancreas* 49 (2): 255–60. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001478>.
16. Chen, Junying, Jinbing Huang, Qiaoqiao Huang, Ji Li, Erling Chen, and Wensheng Xu. 2021. "RASA4 Inhibits the HIF $\alpha$  Signaling Pathway to Suppress Proliferation of Cervical Cancer Cells." *Bioengineered* 12 (2): 10723–33. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2002499>.
17. Chen, Zhijiang, Shizhao Lin, Feihong Liang, Zelin Hou, Yuanyuan Yang, Huguang Huang, and Yu Pan. 2024. "The Prognostic and Therapeutic Value of the Tumor Microenvironment and Immune Checkpoints in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms." *Scientific Reports* 14 (1): 24669. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75882-4>.
18. Ciechomska, Marzena, Leszek Roszkowski, Tomasz Burakowski, Magdalena Massalska, Anna Felis-Giemza, and Adria-Jaume Roura. 2023. "Circulating MiRNA-19b as a Biomarker of Disease Progression and Treatment Response to Baricitinib in Rheumatoid Arthritis Patients through MiRNA Profiling of Monocytes." *Frontiers in Immunology* 14:980247. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.980247>.
19. Cimmino, Amelia, George Adrian Calin, Muller Fabbri, Marilena V Iorio, Manuela Ferracin, Masayoshi Shimizu, Sylwia E Wojcik, et al. 2005. "MiR-15 and MiR-16 Induce Apoptosis by Targeting BCL2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (39): 13944–49. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506654102>.
20. Cives, Mauro, and Jonathan R Strosberg. 2018. "Gastroenteropancreatic

- Neuroendocrine Tumors.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 471–87. <https://doi.org/10.3322/caac.21493>.
21. Cuny, Thomas, Peter M van Koetsveld, Grégoire Mondielli, Fadime Dogan, Wouter W de Herder, Anne Barlier, and Leo J Hofland. 2022. “Reciprocal Interactions between Fibroblast and Pancreatic Neuroendocrine Tumor Cells: Putative Impact of the Tumor Microenvironment.” *Cancers* 14 (14). <https://doi.org/10.3390/cancers14143481>.
  22. Danaher, Patrick, Youngmi Kim, Brenn Nelson, Maddy Griswold, Zhi Yang, Erin Piazza, and Joseph M Beechem. 2022. “Advances in Mixed Cell Deconvolution Enable Quantification of Cell Types in Spatial Transcriptomic Data.” *Nature Communications* 13 (1): 385. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28020-5>.
  23. Dong, Song Chen, Qi Yun Tang, Lu Wang, Fang Fang, Dou Sheng Bai, Sheng Jie Jin, Bao Huan Zhou, and Guo Qing Jiang. 2024. “Characteristics and Risk Differences of Different Tumor Sizes on Distant Metastases of Pancreatic Neuroendocrine Tumors: A Retrospective Study in the SEER Database.” *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International* 24 (2): 188–96. <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2024.07.001>.
  24. Egeblad, Mikala, and Zena Werb. 2002. “New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression.” *Nature Reviews. Cancer* 2 (3): 161–74. <https://doi.org/10.1038/nrc745>.
  25. Elhanani, Ofer, Raz Ben-Uri, and Leeat Keren. 2023. “Spatial Profiling Technologies Illuminate the Tumor Microenvironment.” *Cancer Cell* 41 (3): 404–20. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.01.010>.
  26. Enguita, Jose María, Ignacio Díaz, Diego García, Tamara Cubiella, María-Dolores Chiara, and Nuria Valdés. 2023. “Visual Analytics Identifies Key MiRNAs for Differentiating Peripancreatic Paraganglioma and Pancreatic Neuroendocrine Tumors.” *Frontiers in Endocrinology* 14:1162725. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1162725>.
  27. Fan, X, Z Mao, D He, C Liao, X Jiang, N Lei, B Hu, et al. 2015. “Expression of Somatostatin Receptor Subtype 2 in Growth Hormone-Secreting Pituitary Adenoma and the Regulation of MiR-185.” *Journal of Endocrinological Investigation* 38 (10): 1117–28. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0306-7>.
  28. Glabman, Raisa A, Peter L Choyke, and Noriko Sato. 2022. “Cancer-Associated Fibroblasts: Tumorigenicity and Targeting for Cancer Therapy.” *Cancers* 14 (16). <https://doi.org/10.3390/cancers14163906>.
  29. Gossing, Wilhelm, Marcus Frohme, and Lars Radke. 2020. “Biomarkers for Liquid Biopsies of Pituitary Neuroendocrine Tumors.” *Biomedicines* 8 (6). <https://doi.org/10.3390/biomedicines8060148>.
  30. Goto, A, T Niki, Y Terado, J Fukushima, and M Fukayama. 2004. “Prevalence of CD99 Protein Expression in Pancreatic Endocrine Tumours (PETs).” *Histopathology* 45 (4): 384–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01967.x>.
  31. Guinn, Samantha, Brayán Pérez, Joseph A Tandurella, Mili Ramani, Jae W

- Lee, Daniel J Zabransky, Emma Kartalia, et al. 2025. "Cancer Associated Fibroblasts Drive Epithelial to Mesenchymal Transition and Classical to Basal Change in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells with Loss of IL-8 Expression." *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*, January. <https://doi.org/10.1101/2025.01.07.631784>.
32. Gümürdü, Alican, Ramazan Yildiz, Erden Eren, Gökhan Karakulah, Turgay Ünver, Şermin GENÇ, and Yongsoo Park. 2017. "MicroRNA Exocytosis by Large Dense-Core Vesicle Fusion." *Scientific Reports* 7 (1): 45661. <https://doi.org/10.1038/srep45661>.
33. Hackeng, Wenzel M, Lodewijk A A Brosens, Joo Young Kim, Roderick O'Sullivan, You-Na Sung, Ta-Chiang Liu, Dengfeng Cao, et al. 2022. "Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumours: ATRX/DAXX and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) Are Prognostically Independent from ARX/PDX1 Expression and Tumour Size." *Gut* 71 (5): 961–73. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322595>.
34. He, Zongze, Longyi Chen, Xiao Hu, Jian Tang, Linfu He, Junting Hu, Fan Fei, and Qi Wang. 2019. "Next-Generation Sequencing of MicroRNAs Reveals a Unique Expression Pattern in Different Types of Pituitary Adenomas." *Endocrine Journal* 66 (8): 709–22. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ18-0487>.
35. Hong, Xiafei, Sitan Qiao, Fuqiang Li, Wenzhe Wang, Rui Jiang, Huanwen Wu, Hao Chen, et al. 2020. "Whole-Genome Sequencing Reveals Distinct Genetic Bases for Insulinomas and Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumours: Leading to a New Classification System." *Gut* 69 (5): 877–87. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317233>.
36. Iglesias, Pedro. 2023. "Aggressive and Metastatic Pituitary Neuroendocrine Tumors: Therapeutic Management and Off-Label Drug Use." *Journal of Clinical Medicine* 13 (1). <https://doi.org/10.3390/jcm13010116>.
37. Kasuki, Leandro, and Gérald Raverot. 2020. "Definition and Diagnosis of Aggressive Pituitary Tumors." *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 21 (2): 203–8. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09531-x>.
38. Kim, Haedong, Young-Yoon Lee, and V Narry Kim. 2025. "The Biogenesis and Regulation of Animal MicroRNAs." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 26 (4): 276–96. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00805-0>.
39. Klöppel, Günter. 2017. "Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications." *Visceral Medicine* 33 (5): 324–30. <https://doi.org/10.1159/000481390>.
40. Konukiewicz, Björn, Moritz Jesinghaus, Katja Steiger, Anna Melissa Schlitter, Atsuko Kasajima, Bence Sipos, Giuseppe Zamboni, Wilko Weichert, Nicole Pfarr, and Günter Klöppel. 2018. "Pancreatic Neuroendocrine Carcinomas Reveal a Closer Relationship to Ductal Adenocarcinomas than to Neuroendocrine Tumors G3." *Human Pathology* 77 (July):70–79. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.03.018>.
41. Kozomara, Ana, Maria Birgaoanu, and Sam Griffiths-Jones. 2019. "MiRBase:

- From MicroRNA Sequences to Function.” *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D155–62. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
42. Kuzuoğlu-Öztürk, Duygu, Dipankar Bhandari, Eric Huntzinger, Maria Fauser, Sigrun Helms, and Elisa Izaurrealde. 2016. “MiRISC and the CCR4-NOT Complex Silence MRNA Targets Independently of 43S Ribosomal Scanning.” *The EMBO Journal* 35 (11): 1186–1203. <https://doi.org/10.15252/embj.201592901>.
43. Lai, Ting-Yu, Tsai-Chen Chiang, Chih-Yuan Lee, Ting-Chun Kuo, Chien-Hui Wu, Yi-Ing Chen, Chun-Mei Hu, et al. 2024. “Unraveling the Impact of Cancer-Associated Fibroblasts on Hypovascular Pancreatic Neuroendocrine Tumors.” *British Journal of Cancer* 130 (7): 1096–1108. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02565-8>.
44. Li, Mingxing, Zihui Wang, Lixu Zhu, Yifang Shui, Shuijun Zhang, and Wenzhi Guo. 2021. “Down-Regulation of RBP4 Indicates a Poor Prognosis and Correlates with Immune Cell Infiltration in Hepatocellular Carcinoma.” *Bioscience Reports* 41 (4). <https://doi.org/10.1042/BSR20210328>.
45. Love, Michael I, Wolfgang Huber, and Simon Anders. 2014. “Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2.” *Genome Biology* 15 (12): 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
46. MANDEL, P, and P METAIS. 1948. “[Nuclear Acids In Human Blood Plasma].” *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales* 142 (3–4): 241–43.
47. Maneshi, Parniyan, James Mason, Mitesh Dongre, and Daniel Öhlund. 2021. “Targeting Tumor-Stromal Interactions in Pancreatic Cancer: Impact of Collagens and Mechanical Traits.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9:787485. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.787485>.
48. Megnis, Kaspars, Raitis Peculis, Vita Rovite, Pola Laksa, Helvijs Niedra, Inga Balcere, Olivija Caune, et al. 2019. “Evaluation of the Possibility to Detect Circulating Tumor DNA From Pituitary Adenoma.” *Frontiers in Endocrinology* 10:615. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00615>.
49. Mhaweche-Fauceglia, Paulette, Li Yan, Maryam Sharifian, Xing Ren, Song Liu, Grace Kim, Simon A Gayther, Tanja Pejovic, and Kate Lawrenson. 2015. “Stromal Expression of Fibroblast Activation Protein Alpha (FAP) Predicts Platinum Resistance and Shorter Recurrence in Patients with Epithelial Ovarian Cancer.” *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society* 8 (1): 23–31. <https://doi.org/10.1007/s12307-014-0153-7>.
50. Molitch, Mark E. 2017. “Diagnosis and Treatment of Pituitary Adenomas: A Review.” *JAMA* 317 (5): 516–24. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.19699>.
51. Muchlińska, Anna, Anna Nagel, Marta Popęda, Jolanta Szade, Magdalena Niemira, Jacek Zieliński, Jarosław Skokowski, Natalia Bednarz-Knoll, and Anna J Żaczek. 2022. “Alpha-Smooth Muscle Actin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Secreting Osteopontin Promote Growth of Luminal Breast Cancer.” *Cellular & Molecular Biology Letters*. England.

- <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00351-7>.
52. Németh, Kinga, Ottó Darvasi, István Likó, Nikolette Szücs, Sándor Czirják, Lilla Reiniger, Borbála Szabó, et al. 2019. “Comprehensive Analysis of Circulating MiRNAs in the Plasma of Patients With Pituitary Adenomas.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 104 (9): 4151–68. <https://doi.org/10.1210/je.2018-02479>.
  53. Oronsky, Bryan, Patrick C. Ma, Daniel Morgensztern, and Corey A. Carter. 2017. “Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas.” *Neoplasia (United States)*. Neoplasia Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.09.002>.
  54. Peculis, Raitis, Helvijs Niedra, and Vita Rovite. 2021. “Large Scale Molecular Studies of Pituitary Neuroendocrine Tumors: Novel Markers, Mechanisms and Translational Perspectives.” *Cancers* 13 (6). <https://doi.org/10.3390/cancers13061395>.
  55. Petracci, Elisabetta, Luigi Pasini, Milena Urbini, Enriqueta Felip, Franco Stella, Fabio Davoli, Maurizio Salvi, et al. 2024. “Circulating Cell-Free and Extracellular Vesicles-Derived MicroRNA as Prognostic Biomarkers in Patients with Early-Stage NSCLC: Results from RESTING Study.” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 43 (1): 241. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-03156-y>.
  56. Ping, Qinrong, Ruping Yan, Xin Cheng, Wenju Wang, Yiming Zhong, Zongliu Hou, Yunqiang Shi, Chunhui Wang, and Ruhong Li. 2021. “Cancer-Associated Fibroblasts: Overview, Progress, Challenges, and Directions.” *Cancer Gene Therapy* 28 (9): 984–99. <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00318-4>.
  57. Pozniak, Tetiana, Dzmitry Shcharbin, and Maria Bryszewska. 2022. “Circulating MicroRNAs in Medicine.” *International Journal of Molecular Sciences* 23 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073996>.
  58. Radisky, Evette S, and Derek C Radisky. 2010. “Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer.” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15 (2): 201–12. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9177-x>.
  59. Rani, Varsha, and Rakesh Singh Sengar. 2022. “Biogenesis and Mechanisms of MicroRNA-Mediated Gene Regulation.” *Biotechnology and Bioengineering* 119 (3): 685–92. <https://doi.org/10.1002/bit.28029>.
  60. Reccia, Isabella, Madhava Pai, Jayant Kumar, Duncan Spalding, and Andrea Frilling. 2023. “Tumour Heterogeneity and the Consequent Practical Challenges in the Management of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms.” *Cancers* 15 (6). <https://doi.org/10.3390/cancers15061861>.
  61. Rindi, Guido, Ozgur Mete, Silvia Uccella, Olca Basturk, Stefano La Rosa, Lodewijk A A Brosens, Shereen Ezzat, et al. 2022. “Overview of the 2022 WHO Classification of Neuroendocrine Neoplasms.” *Endocrine Pathology* 33 (1): 115–54. <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09708-2>.
  62. Rovite, Vita, Yael Wolff-Sagi, Linda Zaharenko, Liene Nikitina-Zake, Elmars

- Grens, and Janis Klovinš. 2018. “Genome Database of the Latvian Population (LGDB): Design, Goals, and Primary Results.” *Journal of Epidemiology* 28 (8): 353–60. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20170079>.
63. Saha, Subbroto Kumar, S M Riazul Islam, Tripti Saha, Afsana Nishat, Polash Kumar Biswas, Minchan Gil, Lewis Nkenyereye, Shaker El-Sappagh, Md Saiful Islam, and Ssang-Goo Cho. 2021. “Prognostic Role of EGFR in Breast Cancer: A Systematic Review.” *BMB Reports* 54 (10): 497–504. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.10.087>.
64. Sculthorpe, Declan J, Amy Denton, Wakkas Fadhil, Dewi Rusnita, Mohammad Ilyas, and Abhik Mukherjee. 2025. “High  $\alpha$ -SMA Expression in the Tumor Stroma Is Associated with Adverse Clinical Parameters in Mismatch Repair-Proficient Colorectal Cancers Only.” *American Journal of Clinical Pathology* 163 (3): 464–72. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqae145>.
65. Shah, Manish A, Gyorgy Bodoky, Alexander Starodub, David Cunningham, Desmond Yip, Zev A Wainberg, Johanna Bendell, et al. 2021. “Phase III Study to Evaluate Efficacy and Safety of Andecaliximab With MFOLFOX6 as First-Line Treatment in Patients With Advanced Gastric or GEJ Adenocarcinoma (GAMMA-1).” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 39 (9): 990–1000. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02755>.
66. Shan, Tao, Shuo Chen, Xi Chen, Wan Run Lin, Wei Li, Jiancang Ma, Tao Wu, et al. 2017. “Cancer-Associated Fibroblasts Enhance Pancreatic Cancer Cell Invasion by Remodeling the Metabolic Conversion Mechanism.” *Oncology Reports* 37 (4): 1971–79. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5479>.
67. Stejskal, Pavel, Hani Goodarzi, Josef Srovnal, Marián Hajdúch, Laura J van 't Veer, and Mark Jesus M Magbanua. 2023. “Circulating Tumor Nucleic Acids: Biology, Release Mechanisms, and Clinical Relevance.” *Molecular Cancer* 22 (1): 15. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01710-w>.
68. Sultana, Qamar, Jill Kar, Amogh Verma, Shreya Sanghvi, Nirja Kaka, Neil Patel, Yashendra Sethi, Hitesh Chopra, Mohammad Amjad Kamal, and Nigel H Greig. 2023. “A Comprehensive Review on Neuroendocrine Neoplasms: Presentation, Pathophysiology and Management.” *Journal of Clinical Medicine* 12 (15). <https://doi.org/10.3390/jcm12155138>.
69. Szklarczyk, Damian, Rebecca Kirsch, Mikaela Koutrouli, Katerina Nastou, Farrokh Mehryary, Radja Hachilif, Annika L Gable, et al. 2023. “The STRING Database in 2023: Protein-Protein Association Networks and Functional Enrichment Analyses for Any Sequenced Genome of Interest.” *Nucleic Acids Research* 51 (D1): D638–46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>.
70. Takahashi, Daigoro, Motohiro Kojima, Toshihiro Suzuki, Motokazu Sugimoto, Shin Kobayashi, Shinichiro Takahashi, Masaru Konishi, et al. 2018. “Profiling the Tumour Immune Microenvironment in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms with Multispectral Imaging Indicates Distinct Subpopulation Characteristics Concordant with WHO 2017 Classification.” *Scientific Reports* 8 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31383-9>.

71. Thul, Peter J, and Cecilia Lindskog. 2018. "The Human Protein Atlas: A Spatial Map of the Human Proteome." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 27 (1): 233–44. <https://doi.org/10.1002/pro.3307>.
72. Toma, Justin Daniel, Dan Alexandru Niculescu, Simona Andreea Găloiu, Raluca Alexandra Trifănescu, and Cătălina Poiană. 2025. "Comparative Mortality in Pituitary Adenomas Subtypes: A Tertiary Referral Center Study." *Endocrine* 87 (2): 782–87. <https://doi.org/10.1007/s12020-024-04073-y>.
73. Valassi, Elena, Natalia García-Giralt, Jorge Malouf, Iris Crespo, Jaume Llauger, Adolfo Díez-Pérez, and Susan M Webb. 2019. "Circulating MiR-103a-3p and MiR-660-5p Are Associated with Bone Parameters in Patients with Controlled Acromegaly." *Endocrine Connections* 8 (1): 39–49. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0482>.
74. Vathiotis, Ioannis A, Myrto K Moutafi, Prajan Divakar, Thazin Nwe Aung, Tao Qing, Aileen Fernandez, Vesal Yaghoobi, et al. 2021. "Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in the Stroma Predicts Resistance to Trastuzumab in Patients with Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 27 (22): 6156–63. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2103>.
75. Vetrivel, Sharmilee, Ru Zhang, Mareen Engel, Barbara Altieri, Leah Braun, Andrea Osswald, Martin Bidlingmaier, et al. 2021. "Circulating MicroRNA Expression in Cushing's Syndrome." *Frontiers in Endocrinology* 12:620012. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.620012>.
76. Virolle, T, E D Adamson, V Baron, D Birle, D Mercola, T Mustelin, and I de Belle. 2001. "The Egr-1 Transcription Factor Directly Activates PTEN during Irradiation-Induced Signalling." *Nature Cell Biology* 3 (12): 1124–28. <https://doi.org/10.1038/ncb1201-1124>.
77. Visser, Karin E de, and Johanna A Joyce. 2023. "The Evolving Tumor Microenvironment: From Cancer Initiation to Metastatic Outgrowth." *Cancer Cell* 41 (3): 374–403. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>.
78. Wang, Baiyao, Wei Liu, Chunshan Liu, Kunpeng Du, Zhaoze Guo, Guoqian Zhang, Zhong Huang, et al. 2023. "Cancer-Associated Fibroblasts Promote Radioresistance of Breast Cancer Cells via the HGF/c-Met Signaling Pathway." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 116 (3): 640–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2022.12.029>.
79. Wang, Bin, Hanfei Guo, Hongquan Yu, Yong Chen, Haiyang Xu, and Gang Zhao. 2021. "The Role of the Transcription Factor EGR1 in Cancer." *Frontiers in Oncology* 11:642547. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.642547>.
80. Wang, Chong, and Hui Liu. 2022. "Factors Influencing Degradation Kinetics of MRNAs and Half-Lives of MicroRNAs, CircRNAs, LncRNAs in Blood in Vitro Using Quantitative PCR." *Scientific Reports* 12 (1): 7259. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11339-w>.
81. Waters, Andrew M, and Channing J Der. 2018. "KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer." *Cold Spring Harbor*

- Perspectives in Medicine* 8 (9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031435>.
82. White, Bruce A, and Susan P B T - Endocrine and Reproductive Physiology (Fourth Edition) Porterfield, eds. 2013. "5 - Hypothalamus-Pituitary Complex." In , 99-e2. Philadelphia: Mosby. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08704-9.00005-1>.
  83. Wiechec, Emilia, Mustafa Magan, Natasa Matic, Anna Ansell-Schultz, Matti Kankainen, Outi Monni, Ann-Charlotte Johansson, and Karin Roberg. 2021. "Cancer-Associated Fibroblasts Modulate Transcriptional Signatures Involved in Proliferation, Differentiation and Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." *Cancers* 13 (13). <https://doi.org/10.3390/cancers13133361>.
  84. Wu, Lijun, Ke Li, Wei Lin, Jianjiang Liu, Qiang Qi, Guoliang Shen, Weixin Chen, and Wenjun He. 2022. "Long Noncoding RNA LINC01291 Promotes the Aggressive Properties of Melanoma by Functioning as a Competing Endogenous RNA for MicroRNA-625-5p and Subsequently Increasing IGF-1R Expression." *Cancer Gene Therapy* 29 (3–4): 341–57. <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00313-9>.
  85. Wu, Zerui, Lin Cai, Jianglong Lu, Cheng De Wang, Jiaqing Guan, Xianbin Chen, Jinsen Wu, et al. 2018. "MicroRNA-93 Mediates Cabergoline-Resistance by Targeting ATG7 in Prolactinoma." *The Journal of Endocrinology*, September. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0203>.
  86. Xu, Maosen, Tao Zhang, Ruolan Xia, Yuquan Wei, and Xiawei Wei. 2022. "Targeting the Tumor Stroma for Cancer Therapy." *Molecular Cancer* 21 (1): 208. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01670-1>.
  87. Ye, Zeng, Qiang Li, Yuheng Hu, Haifeng Hu, Junfeng Xu, Muzi Guo, Wuhu Zhang, et al. 2024. "The Stromal Microenvironment Endows Pancreatic Neuroendocrine Tumors with Spatially Specific Invasive and Metastatic Phenotypes." *Cancer Letters* 588 (April):216769. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216769>.
  88. Yin, Weiling, and Andrea C Gore. 2010. "The Hypothalamic Median Eminence and Its Role in Reproductive Aging." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1204 (August):113–22. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05518.x>.
  89. Yoon, Hyunho, Chih Min Tang, Sudeep Banerjee, Antonio L. Delgado, Mayra Yebra, Jacob Davis, and Jason K. Sicklick. 2021. "TGF-B1-Mediated Transition of Resident Fibroblasts to Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Cancer Metastasis in Gastrointestinal Stromal Tumor." *Oncogenesis* 10 (2). <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00302-5>.
  90. Zacharjasz, Julian, Marta Sztachera, Michał Smuszkiewicz, and Monika Piwecka. 2024. "Micromanaging the Neuroendocrine System - A Review on MiR-7 and the Other Physiologically Relevant MiRNAs in the Hypothalamic-Pituitary Axis." *FEBS Letters* 598 (13): 1557–75. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14948>.
  91. Zampetti, Benedetta, Erika Grossrubatscher, Paolo Dalino Ciaramella, Edoardo Boccardi, and Paola Loli. 2016. "Bilateral Inferior Petrosal Sinus

Sampling.” *Endocrine Connections* 5 (4): R12-25. <https://doi.org/10.1530/EC-16-0029>.

92. Zhang, Hao, Xinghai Yue, Zhe Chen, Chao Liu, Wantao Wu, Nan Zhang, Zaoqu Liu, et al. 2023. “Define Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) in the Tumor Microenvironment: New Opportunities in Cancer Immunotherapy and Advances in Clinical Trials.” *Molecular Cancer* 22 (1): 159. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01860-5>.
93. Zhao, Zehua, Tianming Li, Yuan Yuan, and Yanmei Zhu. 2023. “What Is New in Cancer-Associated Fibroblast Biomarkers?” *Cell Communication and Signaling : CCS* 21 (1): 96. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01125-0>.