



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

DALIA JURKĖNAITĖ

**Epigenetinių biožymenų ankstyvai neinvazinei inkstų navikų diagnostikai ir
stebėsenai tyrimas**

Magistro baigiamasis darbas

Genetikos studijų programa

Darbas atliktas VU GMC
Biomokslų institute
Žmogaus genomo tyrimų grupėje

Darbo vadovas:

dr. Raimonda Kubiliūtė

Vilnius 2023

Turinys

Santrumpų sąrašas	4
SANTRAUKA	5
SUMMARY	6
ĮVADAS.....	7
Darbo tikslas	8
Darbo uždaviniai.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1 Inkstų ląstelių karcinoma (RCC)	9
1.1.1 RCC etiologija	10
1.1.2 Gretutinės ligos	12
1.1.2 RCC potipiai	14
1.2 DNR metilinimo pokyčiai inkstų vėžio kancerogenezeje	17
1.3 Inkstų vėžio diagnostika	17
1.4 Inkstų vėžio klasifikacija	18
1.4.1 TNM klasifikacija inkstų vėžio atveju	18
1.4.2 Fuhrman ir WHO/ISUP klasifikacija inkstų vėžio atveju.....	18
1.4.3 Inkstų maži navikai	19
1.5 SRM gydymas	20
1.5.1 Aktyvus SRM chirurginis gydymas.....	20
1.5.2 Aktyvi inkstų mažų navikų stebėsena.....	21
1.6 Skysčių biopsijos	23
1.7 Neinvaziniai inkstų ląstelių karcinomos biožymenys	24
1.7.1 DNR metilinimo biožymenys	24
1.7.2 miRNR biožymenys.....	26
1.7.3 lncRNR biožymenys	26
1.7.4 Kiti biožymenys	27
1.8 Tirtų genų charakteristikos	27
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	29
2.1 Tyrimo objektas	29
2.2 DNR skyrimas iš šlapimo nuosėdų.....	31
2.3 DNR modifikacija natrio bisulfitu	31
2.4 Genų metilinimo analizė kiekybiniu metilimumui jautrios PGR metodu	32
2.5 Statistinė analizė	33
3. REZULTATAI.....	35
3.1 Biožymenų diagnostinės vertės analizė	35

3.2 Tirtų biožymenų sąsaja su naviko augimo dinamika.....	39
3.2.1 Naviko rodikliai skirtinguose tyrimo etapuose	39
3.2.2 Tirtų biožymenų sąsaja su naviko dydžiu	42
3.3 Tirtų genų metilinimo lygio sąsajos su demografiniais ir klinikiniais-patologiniais pacientų rodikliais	46
3.3.1 Genų metilinimo lygio sąsaja su demografiniais rodikliais	46
3.3.2 Genų metilinimo lygio sąsaja su klinikiniais-patologiniais rodikliais	48
4. REZULTATŲ APTARIMAS	55
Išvados.....	59
Asmeninio indėlio aprašymas	60
Padėka	61
Literatūros sąrašas	62
Priedai.....	76

Santrumpų sąrašas

- AS – aktyvi stebėseną (angl. *active surveillance*);
- CCI – Charlson'o gretutinių ligų indeksas (angl. *Charlson's comorbidity index*);
- ccRCC – šviesių ląstelių RCC (angl. *clear cell RCC*);
- cfDNR – neląstelinė DNR (angl. *cell-free DNA (cfDNA)*);
- chRCC – chromofobinė RCC (angl. *chromophobic RCC*);
- CTC – cirkuliuojančios naviko ląstelės (angl. *circulating tumour cells*);
- ctDNR – cirkuliuojanti naviko DNR (angl. *circulating tumour DNA (ctDNA)*);
- HIF – hipoksijos indukuojami faktoriai (angl. *hypoxia-inducible factors*);
- LIL – lėtinė inkstų liga;
- NVNU – nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo;
- PN – dalinė nefrektomija (angl. *partial nephrectomy*);
- pRCC – papiliarinė RCC (angl. *papillary RCC*);
- PSO – Pasaulio Sveikatos Organizacija (angl. *World Health Organization (WHO)*).
- RCC – inkstų ląstelių karcinoma (angl. *renal cell carcinoma*);
- RN – radikali nefrektomija (angl. *radical nephrectomy*);
- SRM – inkstų maži navikai (angl. *small renal mass*);
- TA – terminė abliacija (angl. *thermal ablation*);

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ ISTITUTAS

Dalia Jurkėnaitė

**Epigenetinių biožymenų ankstyvai neinvazinei inkstų navikų diagnostikai ir stebėsenai
tyrimas**

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Inkstų maži navikai (SRM) – pT1a stadijos ≤ 4 cm navikai, sudarantys didžiąją dalį inkstų vėžio atvejų. SRM aptikimas yra sudėtingas dėl nedidelio jų dydžio ir mažo diagnostikoje naudojamų metodų jautrumo. Šie metodai taip pat neatskiria piktybinių navikų nuo gerybinių ir dėl to pasitaiko perdėto gydymo atvejų kuomet dėl pavojaus nekeliančio naviko pašalinamas inkstas ar jo dalis. Aktyvi SRM stebėseną leidžia atidėti ar išvengti radikalaus gydymo, tačiau SRM atveju nėra prieinamų neinvazinių biožymenų testų diagnostikai ar prognostikai. Šio darbo tikslas yra nustatyti genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* metilinimo lygį inkstų mažus navikus turinčių asmenų šlapimo nuosėdose bei įvertinti šių biožymenų pritaikomumą ankstyvai diagnostikai ir ligos eigos stebėsenai. Į tyrimą buvo įtraukti 54 pacientai, kuriems buvo diagnozuotas SRM ir atlikta perkutaninė biopsija inkstų vėžiui patvirtinti. Diagnozavus SRM, pacientai buvo aktyviai stebimi ir buvo periodiškai paimami šlapimo mėginiai, kartu su įvairiais klinikiniais bei demografiniais rodikliais. Iš šlapimo nuosėdų išskirtai DNR buvo atlikta bisulfitinė modifikacija ir nustatytas metilinimo lygis kiekybinės metilinimui jautrios PGR metodu. Pagal gautus metilinimo lygius buvo vertinama biožymenų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* diagnostinė ir prognostinė vertė. Geriausia diagnostine verte pasižymėjo genas *TAC1* (AUC = 0,69, jautrumas – 72,22 %, specifiškumas – 61,96 %) bei genų *ZNF677*, *PCDH8*, *TAC1* ir *FLRT2* kombinacija (AUC = 0,74, jautrumas – 90,74 %, specifiškumas – 50 %). *PCDH8* geno metilinimo lygis teigiamai koreliavo su naviko dydžiu, bei neigiamai koreliavo su glomerulių filtracijos greičiu, taigi šis biožymuo galėtų būti naudojamas prognostikoje, siekiant įvertinti naviko augimą. Apibendrinant, gauti rezultatai rodo tirtų epigenetinių biožymenų potencialą būti pritaikytiems ypač ankstyvai SRM diagnostikai, bei ligos eigos stebėsenai.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
BIOSCIENCES INSTITUTE

Dalia Jurkėnaitė

Study of Epigenetic Biomarkers for Early Non–Invasive Renal Cancer Detection and Surveillance

Master thesis

SUMMARY

Small renal masses (SRMs) are stage pT1a tumours <4 cm that make up the majority of kidney cancers. Detection of SRMs is difficult due to their small size and low sensitivity of currently used diagnostic methods. These methods also are not able to distinguish malignant tumours from benign ones, and as a result, there are cases of overtreatment when a kidney (or part of it) is removed due to a harmless tumour. Active surveillance of SRMs can delay or avoid radical treatment, but in the case of SRMs, there are no available biomarker tests for diagnostic or prognostic purposes. The aim of this thesis is to determine the level of methylation of genes *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* and *FLRT2* in the urine sediments of individuals with SRMs and to evaluate the applicability of these biomarkers for early diagnosis and monitoring of the course of the disease. The study included 54 patients who were diagnosed with SRM and underwent percutaneous biopsy to confirm renal cell carcinoma. After a diagnosis of SRM, patients were actively surveilled and periodic urine samples were collected, along with various clinical and demographic variables. The DNA extracted from the urine sediment was subjected to bisulfite modification and the methylation level was determined by quantitative methylation-specific PCR. The diagnostic and prognostic value of the biomarkers *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* and *FLRT2* was evaluated according to the obtained methylation levels of the genes. The gene *TAC1* (AUC = 0.69, sensitivity – 72.22 %, specificity – 61.96 %) and the combination of genes *ZNF677*, *PCDH8*, *TAC1* and *FLRT2* (AUC = 0.74, sensitivity – 90.74 %, specificity – 50 %) had the best diagnostic value. *PCDH8* gene methylation level positively correlated with tumour size and negatively correlated with glomerular filtration rate, so this biomarker could be used in prognostics to evaluate tumour growth. In summary, the obtained results show the potential of the studied epigenetic biomarkers to be used for early diagnosis of SRM and for monitoring the course of the disease.

IVADAS

Pagal Tarptautinę vėžio tyrimų agentūrą 2020 metais Lietuvoje sergamumas inkstų vėžiu buvo didžiausias pasaulyje, ir užėmė penktą vietą pagal mirtingumą (*Cancer today, The International Agency for Research on Cancer*). Inkstų vėžiui taip pat būdingas didžiausias mirtingumas tarp visų urogenitalinės srities navikų (Kabaria et al., 2016). Inkstų ląstelių karcinoma (angl. *renal cell carcinoma (RCC)*) yra labiausiai paplitęs inkstų vėžio tipas, sudarantis maždaug 90 % visų inkstų vėžio atvejų. Ši vėžio forma yra dažnai aptinkama atsitiktinai, nes simptomai pasireiškia retai, ypač ankstyvose stadijose. Jeigu simptomai yra pastebimi – jie retai kada specifiniai inkstų vėžiui ir gali būti klaidingai palaikyti kitos ligos simptomais – kaip skausmas apatinėje nugaros dalyje ar šone, hematurija – kraujas šlapime ir apčiuopiamas darinys nugaroje (Vasudev et al., 2020). Per paskutinius du dešimtmečius sergamumas RCC stipriai padidėjo – kiekvienais metais po ~2 % Europoje, tačiau padidėjęs RCC dažnis daugiausiai susijęs su padažnėjusiu pilvo ertmės tomografijos ar ultragarso tyrimų naudojimu esant su RCC nesusijusiems simptomams (Ferlay et al., 2018). Šiuo metu daugiau nei 50 % RCC atvejų yra diagnozuojami atsitiktinai (Chenam & Lau, 2018). Ankstyvas vėžio aptikimas yra labai reikšmingas sėkmingam gydymui. Šiam tikslui reikalingi nauji ligos diagnozei bei eigai prognozuoti naudojami biožymenys. Neišplitusio vėžio atveju dažniausiai taikomas gydymas – chirurginis naviko pašalinimas, atliekant dalinę ar radikalią nefrektomiją dažniausiai be biopsijos, dėl ko pasitaiko perdėto gydymo atvejų, kai dėl gerybinio, pavojaus nekeliančio naviko pašalinamas inkstas, kas ženkliai sutrikdo paciento tolimesnio gyvenimo kokybę (Chenam & Lau, 2018).

Didžiąją dalį inkstų vėžio atvejų sudaro inkstų maži navikai (angl. *small renal mass (SRM)*) (Rebez & Mir, 2022). Dabartinės SRM diagnozės strategijos apima tyrimą ultragarsu, kompiuterinę tomografiją ir magnetinio rezonanso tomografiją. Pagrindinis šių metodų apribojimas yra nedidelis jų jautrumas – mažo dydžio navikai sunkiai aptinkami ir stebimi, metodai nesugeba atskirti piktybinių nuo gerybinių navikų ar jų klasifikuoti. Inkstų vėžys dažnai aptinkamas vyresnio amžiaus žmonėms – dažniausiai diagnozės metu pasitaikantis amžius – nuo 70 iki 74 metų, vyrams ir moterims (*Kidney Cancer Incidence Statistics, 2015*). Šiems žmonėms viso inksto ar inksto dalies pašalinimo operacija sukelia ypatingai daug komplikacijų, dėl to biožymenys ypatingai praverstų stebint ligos eigą, kad operuojama būtų tik esant būtinybei. Nors DNR metiliniu paremti kiti diagnostiniai urogenitalinių takų (prostatos bei šlapimo pūslės) vėžio testai yra prieinami jau ilgą laiką, inkstų vėžio atveju, nepaisant didelio poreikio, nei vienas biožymenų testas dar nėra komerciškai prieinamas (Kubiliute & Jarmalaite, 2021).

Beveik visuose vėžio tipuose, įskaitant ir inkstų vėžį, stebimas CpG salų hipermetilinimas (Locke ir kt., 2019). Naviko supresijos genų promotoriaus regionuose esančių CpG salų

hipermetilinimas yra svarbus šių genų transkripcijos aktyvumui slopinti. DNR metilinimo pokyčiai vėžiniuose audiniuose vyksta anksti bei kaupiasi kancerogenezės metu (Arai & Kanai, 2010). Todėl DNR metilinimo biožymenys potencialiai galėtų būti naudojami diagnozuoti vėžį ankstyvoje stadijoje, parinkti tinkamą gydymą bei papildyti dabartines ligos raidos ir gydymo atsako stebėjimo strategijas. DNR metilinimas yra plačiai ištirtas epigenetinis reiškinys, dalyvaujantis genų raiškos reguliacijoje ir todėl siejamas su įvairias procesais, vykstančiais kancerogenezės metu bei darančiais įtaką naviko vystymosi eigai (Locke et al., 2019). Be to metilinimo pokyčiai inkstų vėžio atveju yra kur kas dažnesni lyginant su genetiniais pokyčiais ir lengvai aptinkami naviko kilmės DNR, išskirtoje iš pacientų šlapimo mėginių. Šlapimo mėginio paėmimas – neinvazyvus, paprastas, pigus bei pacientui nepavojingas procesas, jį tiriant atsižvelgiama į naviko heterogeniškumą. Šlapimo, kaip tiriamosios medžiagos naudojimas sudaro galimybę pakartotiniam mėginių paėmimui, kas parodo metodo tinkamumą paciento ligos progresijos ir atsako į gydymą stebėjimui. Tačiau norint naujus biožymenis pritaikyti klinikoje reikalingas didelis ištirtų pacientų kiekis, validavimo etapai bei aukštos diagnostinės ir prognostinės žymenų vertės.

Darbo tikslas

Šio darbo tikslas yra nustatyti genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* metilinimo lygį inkstų mažus navikus turinčių asmenų šlapimo nuosėdose bei įvertinti šių biožymenų pritaikomumą ankstyvai diagnostikai ir ligos eigos stebėsenai.

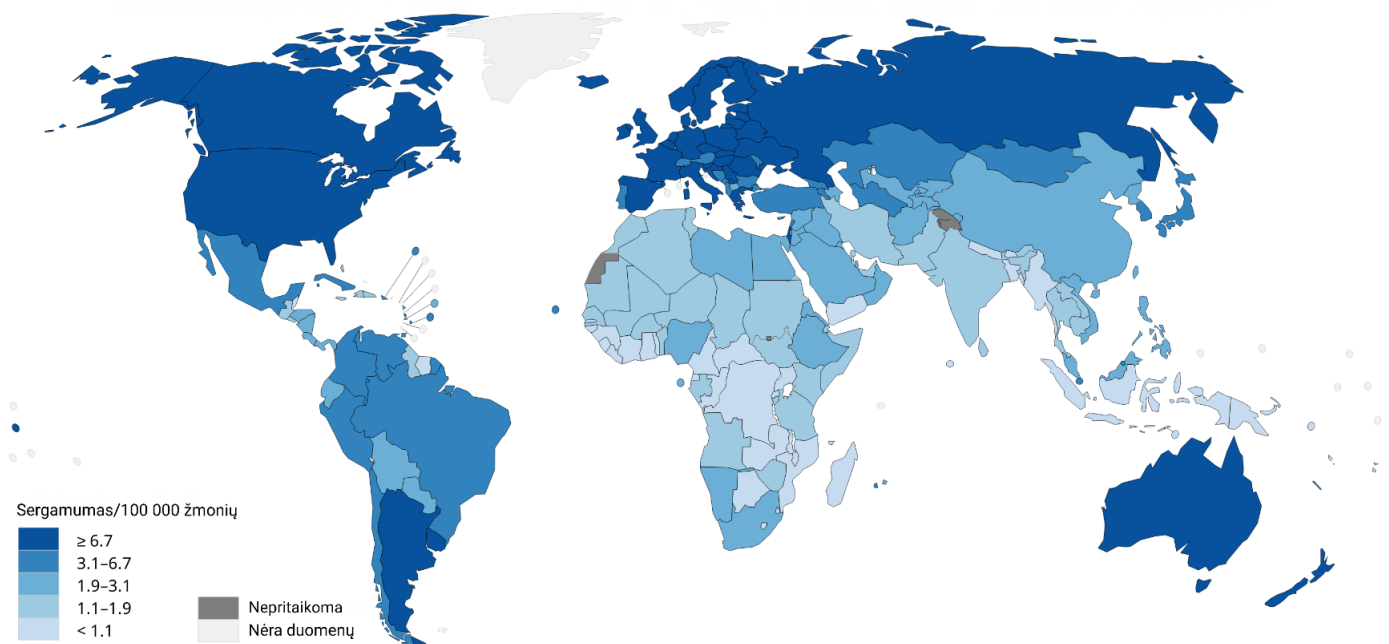
Darbo uždaviniai

1. Ištirti genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* reguliacinių regionų DNR metilinimo lygį ligonių, kuriems diagnozuoti maži inkstų navikai, šlapimo mėginiuose, kiekybiniu metilnimui jautrios PGR (QMSP) metodu.
2. Įvertinti genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* reguliacinių regionų DNR metilinimo pokyčių reikšmę ankstyvai neinvazinei inkstų mažų navikų diagnostikai.
3. Įvertinti genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* reguliacinių regionų DNR metilinimo pokyčių sąsają su inkstų mažų navikų augimo dinamika.
4. Įvertinti genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* reguliacinių regionų DNR metilinimo sąsajas su tirtų pacientų demografiniais bei klinikiniais–patologiniais rodikliais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Inkstų ląstelių karcinoma (RCC)

Dažniausiai pasitaikantis inkstų vėžio tipas – inkstų ląstelių karcinoma (angl. *renal cell carcinoma (RCC)*), kuri sudaro apie 3 % visų vėžio atvejų ir pasižymi didžiausiu sergamumu Vakarų šalyse (1.1 pav.) (Ferlay et al., 2018). Visose amžiaus grupėse abiejų lyčių atveju RCC dažnis yra 4,4/100 000, o bendra rizika (0–74 metų amžiaus) yra 0,51%, tačiau šie skaičiai labai skiriasi priklausomai nuo šalies. Visame pasaulyje didžiausias sergamumas matomas Šiaurės Amerikoje (11,7/100 000), po to seka Vakarų Europa (9,8) ir Australija/Naujoji Zelandija (9,2) (Capitiano et al., 2019). Manoma, kad Europoje ir Šiaurės Amerikoje esantis didesnis sergamumas inkstų vėžiu yra dėl didesnio inkstų mažų navikų (angl. *small renal mass (SRM)*) dažnio, nes jie dažniausiai aptinkami pilvo ertmės vaizdavimo metodais, kurių naudojimas paplitęs šiuose regionuose (Bukavina et al., 2022). Europoje didžiausias sergamumas pastebimas Vakarų šalyse, tačiau nestipriai skiriasi tarp šio ir kitų Europos regionų. Lietuvoje 2020 m. buvo matomas didžiausias bendras RCC dažnis (14,5/100 000), o antroje vietoje buvo Čekija (14,42/100 000). Kalbant apie mirtingumą, didžiausias buvo užfiksuotas Lietuvoje (4,9/100 000), Čekijoje (4,8), Latvijoje (4,7) ir Estijoje (4,6) (Capitiano et al., 2019). Nors mirtingumas pastaruoju metu sumažėjo Skandinavijos šalyse, Prancūzijoje, Vokietijoje, Austrijoje, Nyderlanduose ir Italijoje, kai kuriose Europos šalyse (Airijoje, Kroatijoje, Graikijoje, Estijoje ir Slovakijoje), mirtingumas tik auga.



1.1 pav. Sergamumas inkstų vėžiu pasaulyje 2020 metais (*Cancer today, The International Agency for Research on Cancer*).

1.1.1 RCC etiologija

RCC yra daugiafaktorinė liga, turinti daugybę rizikos faktorių. Rizikos faktoriai apima gyvenimo būdą, gretutines ligas, vartojamus vaistus bei aplinkos veiksnius. Tačiau svarbu paminėti, kad atsitiktinis RCC aptikimas ultragarsu bei kompiuterine tomografija ar magnetiniu rezonansu dėl kitų, su RCC nesusijusių priežasčių, galėjo sukurti netikrą asociaciją tarp kai kurių faktorių ir RCC (Capitanio & Montorsi, 2016).

Amžius ir lytis yra stipriai susiję su rizika sirgti RCC. Sergamumas didėja vyresnių asmenų tarpe. Amžiui standartizuota norma/10 000 žmonių jaunesnių nei 40 metų amžiaus grupėje yra 0,5 ir palaipsniui didėja iki 35 vyresniems nei 75 metai (Capitanio et al., 2019). Didžiausias sergamumas aptinkamas 60–70 metų grupėje. Sergamumas taip pat skiriasi tarp lyčių santykiu 1,5:1 – vyrų tarpe jis yra didesnis visose amžiaus grupėse, o didžiausias skirtumas tarp lyčių aptinkamas vyresnių žmonių grupėse.

Kitas RCC rizikos faktorius – aukštas kūno masės indeksas (KMI). Nutukimas yra siejamas ne tik su daugybe įvairių ligų bet ir su keliais vėžio tipais, įskaitant ir RCC (Bergström et al., 2001). KMI padidėjus 5 kg/m² RCC rizika didėja 25 % vyruose ir 35 % moteryse, turinčiuose viršsvorio (Gild et al., 2017). Be padidėjusios rizikos sirgti RCC, nutukusių pacientų prognozė taip pat yra prastesnė, pasireiškia blogesnis atsakas į chirurginį naviko pašalinimą bei padidėja operacijos komplikacijų rizika (Gluba-Brzózka et al., 2022). Viena iš piktybinių navikų savybių – nekontroliuojamas ląstelių augimas, invazija bei plitimas į kitas kūno vietas. Vėžio atsiradimas ir vystymasis yra susijęs su ląstelių metabolizmo disreguliacija, kadangi piktybinės ląstelės proliferacijai yra reikalingi dideli kiekiai energijos (Gluba-Brzózka et al., 2022). Taigi pertekliniai energijos ir maistinių medžiagų kiekiai yra palankūs vėžio vystymuisi. Svorio padidėjimas ankstyvame (18–35 m.) ir vidutiniame (35–50 m.) amžiaus tarpsnyje koreliuoja su didesne rizika sirgti RCC, tuo tarpu svorio padidėjimas po vidutinio amžiaus (>50 m.) stiprios sąsajos su rizika sirgti RCC neparodė (Adams et al., 2008). Didesnis visceralinio riebalinio audinio kiekis taip pat koreliuoja su aukštesniu Fuhrman laipsniu, kuris pagal ląstelių požymius įvertina naviko ląstelių netaisyklumą lyginant su normaliomis, nevėžinėmis ląstelėmis (Gluba-Brzózka et al., 2022). Riebalinio audinio kaupimasis yra gana gerai žinomas RCC rizikos veiksnys, tačiau tikslūs mechanizmai, atsakingi už šį reiškinį, nėra išaiškinti. Manoma, kad tokie hormonai kaip insulino tipo augimo veiksniai bei adipokinai dalyvauja šiame procese (Liao et al., 2017). Didelis kiekis laisvųjų riebalų rūgščių, gautų iš hipertrofinių adipocitų, gali būti transportuojamas į insulinui jautrius organus, įskaitant kepenis bei kasą, todėl sumažėja jautrumas insulinui (Gluba-Brzózka et al., 2022). Kiti galimi mechanizmai yra susiję su lytinių hormonų disreguliacija ir lėtiniu uždegimu, kurį skatina trigliceridų kaupimasis adipocituose (Gild et al., 2017). Be to RCC kancerogenezę gali

paskatinti medžiagų apykaitos pokyčiai, atsirandantys dėl mutacijų genuose, kurių produktai yra susiję su metabolizmo reguliavimu (Qi et al., 2021). Kai kurių tyrimų rezultatai parodė, kad vieno iš RCC potipių – šviesių ląstelių RCC – naviko ląstelėse yra didesnis cholesterolio, cholesterolio esterių ir trigliceridų kiekis, palyginti su normaliais audiniais (Saito et al., 2016). Tačiau kai kurie tyrimai parodė teigiamą ryšį tarp nutukimo ir geresnio išgyvenamumo sergant RCC (Turco et al., 2021), nors atsakingi mechanizmai taip pat nėra gerai suprantami. Taip galėjo nutikti dėl kacheksijos – riebalinio ir raumeninio audinio praradimo, kuris ypatingai dažnai pasireiškia vėžio pacientams ir nuspėja prastesnę ligos prognozę (Gu et al., 2017). Viršsvorį turintiems žmonėms kacheksija kelia mažiau pavojaus, taigi viršsvoris galbūt turi apsauginį poveikį nuo RCC. Fizinė veikla taip pat galimai sumažina RCC riziką, nes sumažina kūno svorį, kraujo spaudimą, atsparumą insulinui bei lipidų peroksidaciją (Capitaniao et al., 2019).

Rūkymas jau ilgą laiką siejamas su padidėjusia rizika sirgti daugeliu dažnai pasitaikančių vėžio formų, įskaitant ir RCC. Tabako dūmuose yra kancerogenų, kurie dalyvauja inkstų vėžio vystymesi, įskaitant N–nitrozaminus bei arilaminus (Capitaniao et al., 2019). Rūkymo intensyvumas yra reikšmingai susijęs su didesne rizika išsivystyti RCC ir prastesne prognoze (Lotan et al., 2016). Be to, sergamumo rizika yra tiesiogiai susijusi su rūkymo trukme ir mažėja didėjant laiko tarpui nuo metimo.

Kai kuriuose tyrimuose pastebėta, kad saikingas alkoholio vartojimas turi apsauginį efektą nuo RCC, lyginant su abstinencija (Karami et al., 2015; Lew et al., 2011; Xu et al., 2015). Lew ir kt. (2011) išanalizavo NIH–AARP (*National Institutes of Health – The American Association of Retired Persons*) dietos ir sveikatos tyrimo dalyvius (n = 492 187, 1814 RCC atvejų), ir nustatė atvirkštinį ryšį tarp alkoholio vartojimo ir RCC rizikos. Vyrų tarpe tokia asociacija buvo pastebėta vartojant alų, o moterų – vartojant vyną ir stipriuosius alkoholinius gėrimus, bet ne alų. Tačiau, nors ir buvo pastebėta tokia sąsaja, alkoholio vartojimas gali padidinti tikimybę sirgti kitų formų vėžiu ar kitais psichinės bei fizinės sveikatos sutrikimais. Kai kuriuose kituose tyrimuose toks ryšys tarp alkoholio vartojimo ir rizikos sirgti RCC užfiksuotas visai nebuvo (Macleod et al., 2013).

Analgetikai – vieni populiariausių vaistinėje parduodamų vaistų, skirtų malšinti skausmui. Cho ir kt. (2011) parodė, kad aspirinas bei acetaminofenas rizikos susirgti RCC nepadidino, tačiau reguliariai vartojant nesteroidinius vaistus nuo uždegimo (NVNU) galimai padidėja RCC rizika. Kitame tyrime buvo pastebėta, kad acetaminofenas ir NVNU buvo siejami su RCC rizika, tačiau aspirinas – ne, o didesnė suvartojamų analgetikų dozė atitiko didesnę riziką sirgti RCC (Choueiri et al., 2014).

Dar buvo pastebėta, kad moteryse RCC rizika padidėja 15 % su kiekvienu pagimdytu vaiku (Lambe et al., 2002) tačiau reikalingi tolimesni tyrimai, patvirtinantys tokią asociaciją. Taip pat žinoma, kad kai kurios industrinės medžiagos, kaip benzenas, herbicidai ir vinilas padidina RCC riziką (Ballard & Guzman, 2022).

Rizikai susirgti RCC įtaką daro ne vienas demografinis ir klinikinis faktorius, kurie tarpusavyje taip pat yra dažnai susiję. Nors kai kurie iš šių faktorių nėra priklausomi nuo gyvenimo būdo – kaip lytis ar amžius, kiti yra susiję su bendrai nesveiku gyvenimo būdu, kuris taip pat sukelia kitas gretutines ligas, o šios savaime didina riziką sirgti RCC bei prisideda prie prastos ligos prognozės.

1.1.2 Gretutinės ligos

SRM sergantys vyresnio amžiaus žmonės, kuriems SRM dažniausiai ir diagnozuojami, dažnai serga gretutinėmis ligomis, ir dėl komplikacijų rizikos sumažėja galimų gydymo metodų pasirinkimas. Charlson'o gretutinių ligų indeksas (angl. *Charlson's comorbidity index (CCI/CI)*) – tai indeksas, skirtas įvertinti paciento 10–ies metų išgyvenamumą, atsižvelgiant į gretutinių ligų skaičių ir sunkumą. Šis indeksas yra sudaromas kiekvienai iš į indeksą įtrauktų ligų suteikiant 1–6 balų vertę, pagal jų potencialą paveikti paciento 1–erių metų mirtingumą ir susumuojant šias vertes (Charlson et al., 2022). Į indeksą itrauktos ligos apima širdies ir kraujagyslių, endokrininius, plaučių, neurologinius, inkstų, kepenų, virškinimo trakto ir vėžinius susirgimus. CCI yra siejamas su išgyvenamumu inkstų vėžio atveju – Ather ir Nazim (2010) aprašė, kad RCC pacientų, kuriems buvo atlikta radikali ar dalinė nefrektomija, ir kurių CCI buvo ≥ 5 , bendras išgyvenamumas buvo mažesnis, lyginant su RCC pacientais su $CCI \leq 2$ ar 3–4 reikšme. Kitame tyrime buvo tiriamas pagal amžių koreguotas Charlson'o indeksas (angl. *age-adjusted Charlson's comorbidity index (AACI)*) ir jo sąsaja su šviesių ląstelių RCC potipio pacientų išgyvenamumu (Kang et al., 2020). Čia buvo aptikta, kad aukšta AACI reikšmė taip pat koreliavo su pažengusia naviko stadija, o $AACI \geq 6$ buvo susieta su trumpesniu vėžiui specifiniu ir bendru išgyvenamumu.

Hipertenzija – vienas iš nepriklausomų rizikos faktorių, kalbant apie RCC. Aštuoniolikos tyrimų metaanalizė patvirtino teigiamą ryšį tarp hipertenzijos ir RCC rizikos – hipertenzija buvo susijusi su 67 % padidėjusia RCC rizika, o kiekvienas 10 mmHg kraujospūdžio padidėjimas buvo susijęs su 10–22 % padidėjusia RCC rizika (Hidayat et al., 2017). Biologinis mechanizmas, nuo kurio priklauso tokia asociacija nėra aiškus, tačiau mokslininkai mano, kad jame dalyvauja lėtinė inkstų hipoksija ir lipidų peroksidacija bei besiformuojančios reaktyvios deguonies formos (Capitanio et al., 2019). Hipertenzija yra viena pagrindinių lėtinės inkstų ligos (LIL) priežasčių, ir abiejų ligų atveju hipoksija yra vienas iš mechanizmų, atsakingų už žalą inkstų parenchimai (Prujnm

et al., 2013). Hipoksiją skatinantys faktoriai, kurių transkripcija tokiomis sąlygomis aktyvėja, prisideda prie naviko ląstelių proliferacijos ir angiogenezės (Sharifi & Farrar, 2006). Tačiau svarbu paminėti, kad hipertenziją patiriantiems žmonėms dažniau atliekami pilvo ertmės ultragarso tyrimai bei kompiuterinės ir magnetinio rezonanso tomografijos, o tai gali prisidėti prie padidėjusio atsitiktinai aptiktų inkstų navikų skaičiaus ir sukurti klaidingą ryšį tarp šių ligų.

Antro tipo cukrinis diabetas yra siejamas su padidėjusia rizika sirgti kelių tipų vėžiu, įskaitant kepenų, kasos bei šlapimo pūslės vėžį (Pearson-Stuttard et al., 2018). Tačiau ar tokia pati asociacija egzistuoja RCC atveju nėra aišku. Macleod ir kt. (2013) neužfiksavo ryšio tarp diabeto ir RCC, tačiau Joh ir bendraautorių tyrime (2011), remiantis 330 patologiškai patvirtintų RCC atvejų tarp ~120 000 moterų, 2 tipo cukrinis diabetas buvo reikšmingai susijęs su padidėjusia RCC rizika. Joh ir kt. tyrime taip pat rasta, kad rizika sirgti RCC augo didėjant gretutinių ligų skaičiui, įskaitant nutukimą, hipertenziją ir 2 tipo diabetą.

Metabolinis sindromas (MS) – cukrinio diabeto, hipertenzijos ir nutukimo kombinacija, sukianti širdies ir kraujagyslių ligas. Šio sindromo požymiai apima aukštą ($\geq 140/90$ mmHg) kraujospūdį, atsparumą insulinui, aukštą trigliceridų kiekį kraujyje bei viršsvorį juosmens srityje (Saklayen, 2018). MS yra siejamas su kepenų, kasos, skrandžio, storosios žarnos, šlapimo pūslės, prostatos, gimdos kaklelio ir krūties vėžiu (Zhang et al., 2014). Kaip anksčiau minėta, daugybė tyrimų parodo ryšį tarp RCC ir pagrindinių metabolinio sindromo komponentų – nutukimo bei hipertenzijos, o MS taip pat laikomas nepriklausomu RCC rizikos faktoriumi. Zhang ir bendraautoriai (2022) pademonstravo MS sąsają su aukštesniu naviko laipsniu bei stadija šviesių ląstelių RCC pacientuose, ir įvardino MS kaip nepriklausomą rizikos faktorių šviesių ląstelių RCC potipiui.

Inkstų akmenligė taip pat yra siejama su RCC. Viename tyrime pranešta, kad inkstų akmenligė buvo reikšmingai susijusi su padidėjusia RCC rizika vyrams, bet ne moterims (Cheungpasitporn et al., 2015). Dar vienas rizikos faktorius – lėtinė inkstų liga (LIL) – 10–52 % pacientų su RCC serga LIL diagnozės metu (Sanchez ir kt., 2018). RCC pacientams, sergantiems LIL arba proteinurija (baltymų atsiradimas šlapime), sumažėja bendras išgyvenamumas ir padidėja rizika, kad po gydymo palaiapsniui mažės inkstų funkcija (Lane et al., 2015).

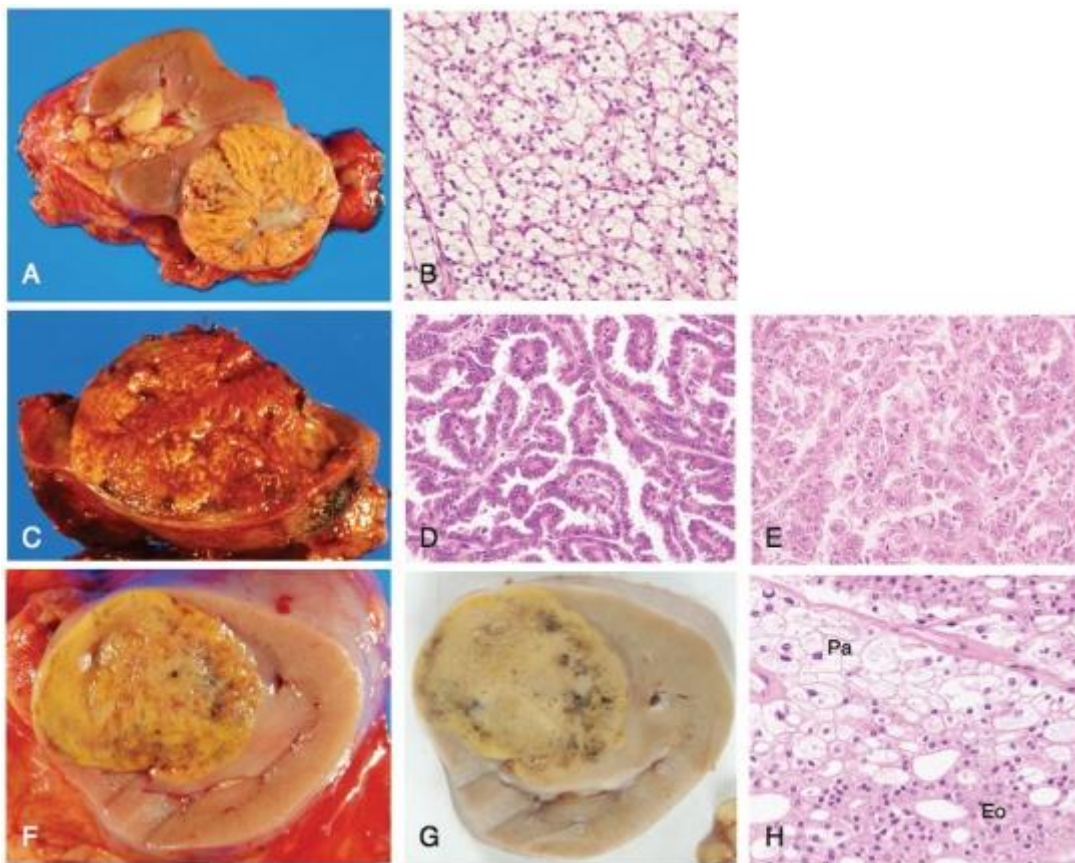
Gretutinės ligos ne tik apsunkina RCC ligonių gyvenimą tačiau ir nulemia gydymo būdą bei paveikia RCC ligos eigą. Su RCC sergamumu bei prastesne prognoze yra siejama hipertenzija, antro tipo cukrinis diabetas, metabolinis sindromas bei kai kurios inkstų ligos. Šių ligų buvimas ar nebuvimas yra svarbus norint įvertinti RCC ligonių būseną ir nuspręsti dėl gydymo.

1.1.2 RCC potipiai

RCC apima kelis histologiškai skirtingus potipius, kurie skiriasi patofiziologija, ligos eiga, atsaku į gydymą bei prognoze. Pagrindiniai RCC potipiai yra šviesių ląstelių RCC (angl. *clear cell RCC (ccRCC)*), papiliarinė RCC (angl. *papillary RCC (pRCC)*) ir chromofobinė RCC (angl. *chromophobic RCC (chRCC)*) (Linehan & Ricketts, 2019). ccRCC ir pRCC potipiai yra kilę iš proksimalinio nefrono kanalėlio, o chRCC kilmė – distalinis kanalėlis (Arai & Kanai, 2010). Kai kurie paveldimi sindromai, kaip Von Hippel–Lindau (VHL) liga, paveldima papiliarinė RCC ir Birt–Hogg–Dube (BHD) sindromas, padidina riziką susirgti ccRCC, pRCC ir chRCC atitinkamai (Rosner et al., 2009). Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) (angl. *World Health Organization (WHO)*) klasifikacija išskiria ir daugiau retesnių histologinių RCC potipių (kaip šviesių ląstelių papiliarinė RCC) (Büttner et al., 2022), o inkstų navikai taip pat gali būti heterogeniški ir turėti kelių histopatologinių potipių ląsteles (Moch et al., 2016). RCC potipio identifikacija yra labai svarbi, nes padeda teisingai pasirinkti gydymo būdą bei nuspėti ligos eigą ir gydymo pasekmes.

Šviesių ląstelių RCC yra dažniausias histologinis potipis RCC pacientų tarpe ir apima ~70 % visų atvejų (Cimadamore et al., 2021). ccRCC navikai dažnai išsikiša iš inksto žievės, jų paviršius – geltonos spalvos, taip pat matomas kraujavimas ir nekrozės paveiktos sritys (1.2 pav., A). Šio potipio navikų ląstelės pasižymi peršviečiama ląstelių citoplazma, kuri užpildyta lipidais ir glikogenu, ryškia plazmine membrana ir apvaliu branduoliu (1.2 pav., B) (Arai & Kanai, 2010). ccRCC išsiskiria nuo kitų potipių 3p chromosomos praradimu, lemiančiu heterozigotiškumo praradimą šiame regione esančiuose keturiuose naviko supresijos genuose: *VHL*, *PBRM1*, *SETD2* ir *BAP1* (Turajlic et al., 2018). Didžiojoje dalyje ccRCC aptinkamas *VHL* naviko supresijos geno praradimas dėl mutacijų, kopijų delecijų ar promotoriaus hipermetilinimo (Cimadamore et al., 2021). Pacientai, sergantys Von Hippel–Lindau sindromu paveldi vieną inaktyvią *VHL* geno kopiją ir juose dažnai išsivysto kiti navikai, kaip hemangioblastomos, feochromocitomos, kasos cistos ir kt. (Ricketts et al., 2018). *VHL* geno produktas – 30 kDa baltymas, turintis daugybę funkcijų, iš kurių geriausiai žinoma – jo, kaip E3–ubikvitino ligazės komplekso komponento, substrato atpažinimo funkcija (Arai & Kanai, 2010). Šis kompleksas pažymi HIF (angl. *hypoxia-inducible factors*) poliubikvitilinimui ir proteosominiam skaidymui (Mandriota et al., 2002). Hipoksijos sąlygomis (arba kuomet neegzistuoja funkcionalus *VHL*) kaupiasi HIF–1 α ir HIF–2 α , formuoja heterodimerus su HIF–1 β ir persikelia į branduolį, kur skatina daugelio genų transkripciją. Tokie genai apima kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus (*VEGF*) geną, kuris skatina angiogenezę, eritropoetino (*EPO*) geną, skatinantį eritrocitų gamybą, epidermio augimo veiksnio receptoriaus (*EGFR*) geną, skatinantį ląstelių proliferaciją, ir daugiau genų, prisidedančių prie naviko vystymosi (Gossage & Eisen, 2010). Be to, *VHL* baltymas atlieka funkcijas, kurios nepriklauso nuo HIF–1 α ir

HIF-2 α ir, manoma, yra svarbios jo naviką supresuojančiam poveikiui (Arai & Kanai, 2010). *PBRM1* geno inaktyvacija randama 40 % ccRCC navikų, ir, kadangi genome šis genas yra arti *VHL* geno, jų delecija dažnai įvyksta vienu metu (D'Avella et al., 2020). *PBRM1* genas koduoja BAF180 – SWI/SNF (angl. *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) chromatino remodeliavimo komplekso komponentą, kuris suriša DNR ir taip padaro ją mažiau prieinamą transkripcijos faktoriams bei RNR polimerazei (Akhtar et al., 2018). Kol kas *PBRM1* praradimo reikšmė naviko progresijai nėra pilnai suprantama, tačiau panašu, kad jis yra susijęs su ląstelių judrumu ir proliferacija. *BAP1* (angl. *BRCA1-associated protein-1*) mutacijos randamos 10–15 % ccRCC. BAP1 baltymas sąveikauja su HCF-1 (angl. *host cell factor 1*), kuris dalyvauja transkripcijos reguliacijoje ir kurį BAP1 deubikvitilina (D'Avella et al., 2020). *SETD2* geno vaidmuo ccRCC vystymesi nėra išaiškintas, tačiau manoma, kad jis svarbus transkripcijos reguliacijai, kartu su kitais veiksniais vėžio vystymosi metu.



1.2 pav. RCC potipiai. Vaizduojama skirtingų RCC potipių navikų (A, C, F, G) ir ląstelių (B, D, E, H) morfologija. A ir B – šviesių ląstelių RCC, C, D ir E – papiliarinė RCC, F, G ir H – chromofobinė RCC (Arai & Kanai, 2010).

Papiliarinė RCC apima 15–20 % visų inkstų vėžio atvejų ir yra skirstoma į dvi grupes: pirmo tipo pRCC, kuri sudaryta iš papilių, padengtų viengubu ar dvigubu mažų ląstelių su menka citoplazma sluoksniu (1.2 pav., D), ir antro tipo pRCC, sudaryta iš papilių, padengtų didelėmis, netaisyklingai išsidėsčiusiomis eozinofilinėmis ląstelėmis (1.2 pav., E) (Arai & Kanai, 2010). Pirmo tipo pRCC pacientuose dažniausiai randamos mutacijos *MET* gene, kartu su mutacijomis *TERT*, *CKDN2A/B*, ir *EGFR* genuose (D’Avella et al., 2020). *MET* genas – proto-onkogenas, koduojantis transmembraninių receptorių tirozino kinazę, kurios ligandas yra hepatocitų augimo faktorius (HGF) (Yang et al., 2022). *MET* aktyvacija ligandu apima kelias intraląstelines kaskadas, kurios skatina įvairius ląstelės procesus, tokius kaip proliferacija ir migracija, taip skatinant greitą vėžio vystymąsi ir plitimą (Arai & Kanai, 2010). Antro tipo pRCC atveju būdingos mutacijos *CDKN2A/B*, *TERT*, *NF2*, ir *FH* genuose (D’Avella et al., 2020). *FH* geno koduojama fumarazė aktyvuoja HPH (angl. *HIF prolyl hidroxylase*), kuri atlieka HIF hidroksilinimą, kad šį atpažintų VHL. *FH* geno mutacija skatina kancerogenezę, nes dėl neveiklios HPH kaupiasi HIF baltymai (Arai & Kanai, 2010). Antras pRCC tipas dažniausiai siejamas su prastesne prognoze, lyginant su pirmu pRCC tipu (Wong et al., 2019). Genas *CDKN2A/2B* (angl. *cyclin dependent kinase inhibitor 2A/B*), kurio mutacijos aptinkamos abiejuose pRCC tipuose – naviko supresoriaus genas, jo mutacijos randamos ir daugelyje kitų vėžio tipų (Chan et al., 2021). *TERT* (angl. *telomerase reverse transcriptase*) geno mutacijos taip pat aptinkamos įvairiuose piktybiniuose navikuose, kadangi šis genas yra svarbus reguliuojant telomerazės aktyvumą vėžinėse ląstelėse (Colebatch et al., 2019).

Chromofobinė RCC (chRCC) apima apie 5–7 % visų suaugusiųjų inkstų navikų. Šie navikai turi aiškiai apibrėžtą ribą, ir pasižymi šviesiai rudos spalvos paviršiumi (1.2 pav., F ir G). Juos sudaro ląstelės, pasižyminčios ryškiomis membranomis, susitraukusiais netaisyklingos formos branduoliais bei aplink branduolį esančia aureole, kuri atsiranda branduoliui susitraukiant (1.2 pav., H) (Cimadamore et al., 2021). chRCC pasižymi daugybiniais chromosomų praradimais (chromosomų Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17.21), sumažėjusia *CYCLOPS* genų ekspresija ir *TP53* ir *PTEN* genų mutacijomis (Ohashi et al., 2019). *CYCLOPS* (angl. *Copy-number alterations Yielding Cancer Liabilities Owing to Partial losS*) genai – tai genai, esantys šalia naviko supresijos genų ir viena jų kopija yra dažnai prarandama vėžinėse ląstelėse, todėl likusi kopija tampa ypatingai svarbi ir gali būti naudojama kaip chemoterapijos taikiny (Ohashi et al., 2019). *CYCLOPS* apima 124 genus, ir chromosomose, kurių praradimai yra dažni chRCC atveju, yra apie trečdalis šių genų. Chromofobinės RCC atveju taip pat dažnai pasitaiko per didelė *KIT* geno ekspresija, kartu su kitomis šio geno mutacijomis (Arai & Kanai, 2010). *KIT* yra III tipo receptoriaus tirozino kinazė, kurios aktyvinimas sukelia fosforilinimo kaskadą, ir taip aktyvuojami įvairūs transkripcijos faktoriai, kurie reguliuoja apoptozę, ląstelės diferenciaciją, proliferaciją, chemotaksį ir ląstelės adheziją – visi šie procesai yra svarbūs vėžio vystymosi ir plitimo metu.

Tikslesnis RCC navikų potipio identifikavimas ne tik svarbus pacientų gydymo procese, bet ir gali turėti įtakos jų šeimos sveikatai, su genetiniais sindromais susijusių RCC atveju. RCC tipai skiriasi histologija bei agresyvumu, be to skirtingų RCC potipių atveju egzistuoja metilinimo skirtumai, kurie gali būti potencialiai panaudojami diagnozei bei klasifikacijai.

1.2 DNR metilinimo pokyčiai inkstų vėžio kancerogenezėje

Vėžinės ląstelės pasižymi ne tik genetiniais, bet ir epigenetiniais pokyčiais. DNR metilinimas – tai kovalentinė cheminė modifikacija, kurios metu CpG dinukleotiduose citozino žiedo 5 anglies pozicijoje prijungiama metilo grupė (Jin et al., 2011). DNR metiltransferazės perkelia metilo grupes nuo S–adenozilmetionino ant citozinų. DNR metilinimas yra stabili modifikacija, perduodama dukterinėms ląstelėms iš motininių joms dalijantis ir yra labai svarbus procesas X chromosomos inaktyvacijai, genomiam imprintingui, transpozonų nutildymui ir genų ekspresijos reguliacijai (Mohn & Schübeler, 2009). Kancerogenezės metu ląstelėje vyksta metilinimo pokyčiai, kurių rezultatas dažniausiai būna globaliai hipometilintas genomai ir daugelio CpG salų hipermetilinimas, paprastai apimantis genų promotorius ir pirmus egzonus (Locke ir kt., 2019). Geno reguliacinių sričių hipermetilinimas ir globalus hipometilinimas skirtingai paveikia kancerogenezę. Hipometilinimas daugiausiai vyksta pasikartojančiuose genomo regionuose ir skatina genominių nestabilumą, taip sukeldamas neteisingą chromosomų segregaciją ląstelei dalijantis ir transpozabilių elementų aktyvinimą. Šie procesai toliau sukelia genetinę žalą (Ehrlich, 2009). Židininis hipermetilinimas gali sukelti naviko supresijos genų ar reguliatorinių genomo regionų, svarbių normaliam ląstelės funkcionavimui nutildymą (Stone et al., 2015). Metilinimo pokyčiai inkstų kancerogenezėje vyksta vieni pirmųjų, o DNR metilinimo kaupimasis taip pat buvo susietas su prastesne prognoze RCC pacientuose (Arai & Kanai, 2010). Epigenetiniai ir genetiniai pokyčiai nėra išimtinai vienas kito atžvilgiu vykstant inkstų kancerogenezei ir DNR metilinimo pokyčiai veikia kartu su genų mutacijomis ir yra svarbus įvykis inkstų vėžiui vystantis.

1.3 Inkstų vėžio diagnostika

Pastaruoju metu sergamumas RCC stipriai padidėjo – JAV 1975 metais sergamumas buvo 7,09/100 000 žmonių, o 2012 m. šis skaičius išaugo iki 15,91/100 000 žmonių (Chenam & Lau, 2018). Kai kurie mokslininkai siūlo, kad padidėjęs RCC ir kitų inkstų navikų dažnis gali būti siejamas su padidėjusiu hipertenzijos ir nutukimo dažniu (Sanfilippo et al., 2014), tačiau šis padidėjimas labiausiai susijęs su padažnėjusiu pilvo ertmės tomografijos ar ultragarso tyrimų naudojimu esant su RCC nesusijusiems simptomams (Chenam & Lau, 2018). Inkstų vėžio simptomai apima hematuriją, skausmą šone bei apčiuopiamą masę ties inkstu, tačiau, dėl padažnėjusio vaizdinimo metodų naudojimo, inkstų navikai dažniausiai aptinkami šiems

simptomams pasireikšti nespėjus (Ballard & Guzman, 2022). Didesnis atsitiktinai aptiktų inkstų navikų dažnis stebimas visose klinikinėse stadijose, tačiau dažniausiai pasitaikantys yra inkstų maži navikai (angl. *small renal mass (SRM)*), (smulkiau aptarti vėliau) kurie apima T1a (<4 cm skersmens) stadijos navikus. SRM proporcija tarp 1993 ir 2004 metų padidėjo nuo 43,0 % iki 57,1 % (Marra et al., 2017). 1 ir 2 stadijos RCC sergančių žmonių 5 metų išgyvenamumas yra didesnis nei 90 %, lyginant su aukštesnės stadijos liga, kurios atveju ši reikšmė sumažėja iki 15 % (Ballard & Guzman, 2022). Taigi ankstyva tiksli diagnozė labai svarbi, norint pagerinti pacientų gyvenimo kokybę bei užtikrinti tinkamą gydymą ir prognozę.

1.4 Inkstų vėžio klasifikacija

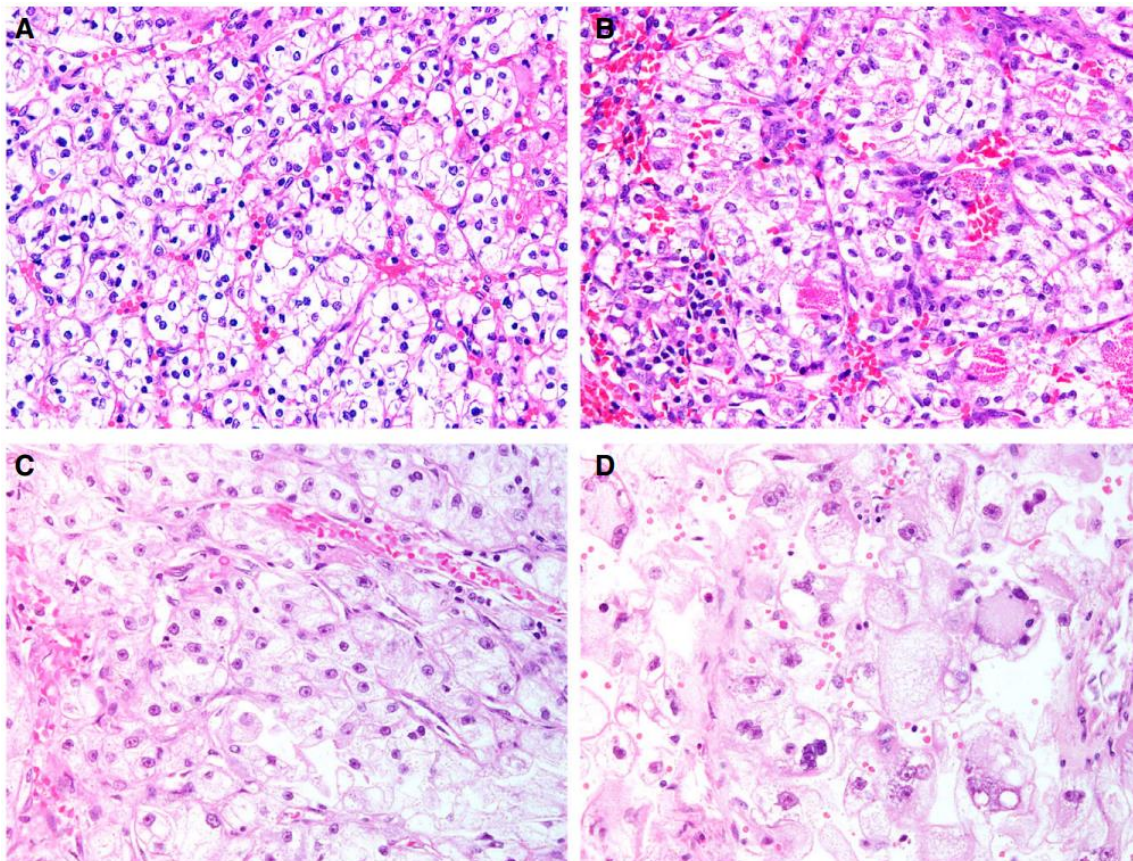
1.4.1 TNM klasifikacija inkstų vėžio atveju

Inkstų vėžiui apibūdinti galima pasitelgti įvairius prognostinius faktorius, kai kurie iš jų – naviko stadija, histologinis laipsnis ir paciento amžius. Naviko stadija yra vienas svarbiausių tokių faktorių ir RCC atveju gali būti nustatyta naudojant įvairias sistemas, tačiau plačiausiai naudojama TNM sistema, kurią pasiūlė UICC (angl. *Union for International Cancer Control*) ir AJCC (angl. *American Joint Committee on Cancer*) organizacijos (Swami et al., 2019). TNM (angl. *Tumour, Node, Metastasis*) sistema klasifikuoja piktybinius navikus pagal pirminio naviko dydį (T), jo plitimą į limfmazgius (N) bei metastazes (M) (Amin et al., 2016). Tokia sistema reikalinga norint prognozuoti ligos eigą, daryti sprendimus renkantis gydymą bei standartizuoja vėžio nomenklatūrą, taip palengvinandama vėžio tyrimus skirtinguose regionuose. Yra 4 T stadijos, kurios apibūdina naviko dydį – T1, T2, T3 ir T4, o didėjanti stadija atspindi didesnę naviko dydį ir išplitimą (Amin et al., 2016). T stadijos dar gali būti smulkiau išskirstomos itin detaliai naviko apibūdinimui – T1 stadija, kuri apima navikus, neišplitusius už inksto ribų, skirstoma į T1a (<4 cm skersmens) ir T1b (4–7 cm skersmens). N stadija, apibūdinanti naviko išplitimą į netoliese esančius limfmazgius, skirstoma į 3 stadijas – NX, kuomet limfmazgiai negali būti ištiriami, N0 – limfmazgiuose vėžinių ląstelių nerandama ir N1 – viename ar daugiau limfmazgių egzistuoja vėžinės ląstelės. M stadija skirstoma į M0, kuri nurodo metastazių nebuvimą ir M1, nurodančią metastazių buvimą (Amin et al., 2016).

1.4.2 Fuhrman ir WHO/ISUP klasifikacija inkstų vėžio atveju

Histologinis naviko laipsnis – svarbus prognostinis faktorius inkstų vėžio atveju. Viena populiariausių ir plačiausiai naudojamų RCC klasifikavimo sistemų – 1982 m. Fuhrman ir kt. aprašyta sistema, kuri įvertina branduolio dydį, formą ir branduolėlių ryškumą (Delahunt et al., 2019). Šis naviko laipsnio įvertinimo būdas susilaukė daug kritikos dėl jo pritaikomumo, atkuriamumo bei tikslumo, tačiau net ir atsižvelgus į įvairias problemas, Fuhrman sistema ilgą laiką

buvo plačiai naudojama, ypač JAV (Delahunt et al., 2016). Be Fuhrman klasifikavimo sistemos, nuo 1978 iki 2002 m. buvo pasiūlytos dar 8 branduolio požymių vertinimu pagrįstos RCC klasifikavimo sistemos, tačiau šiuo metu naudojama WHO/ISUP sistema (Delahunt et al., 2019). 2012 m. ISUP (angl. *International Society of Urologic Pathologists*) pasiūlė naują ccRCC ir pRCC tipų klasifikavimo sistemą, kurią įgyvendino PSO (Delahunt et al., 2016). WHO/ISUP sistemoje naviko laipsnio įvertinimas pagrįstas branduolėlio ryškumu (1–3 laipsniai), o 4 laipsnio navikai pasižymi branduolio anaplazija, milžiniškomis ląstelėmis ir rabdoidiniais ir/arba sarkomatoidiniais požymiais (1.3 pav.) (Browning et al., 2021). Ši sistema yra pagrįsta tuo, kad ccRCC ir pRCC pacientų ligos eiga ir baigtis yra susiję su naviko ląstelių branduolėlių ryškumu. Remiantis Fuhrman ar WHO/ISUP klasifikavimo sistema, chRCC atveju tyrimai neparodė koreliacijos tarp histologinio laipsnio ir ligos eigos bei baigties, todėl šie navikai nėra klasifikuojami (Delahunt et al., 2019).



1.3 pav. WHO/ISUP laipsniai ccRCC histologijai klasifikuoti. A paveikslėlyje matomas 1 laipsnis, B – 2, C – 3 ir D – 4 laipsnis, kurio atveju matomos atipiškos milžiniškos ląstelės ir branduolinis pleomorfizmas – branduolio dydžio, formos ir/ar kitų požymių nepastovumas (Delahunt ir kt., 2019).

1.4.3 Inkstų maži navikai

Inkstų maži navikai (angl. *Small renal mass (SRM)*) – tai mažesni nei 4 cm skersmens, T1a stadijos inkstų navikai (Sanchez ir kt., 2018). SRM sudaro 48–66 % visų RCC diagnozių ir apima platų spektrą navikų, kurie pasižymi įvairiu metastatiniu bei augimo potencialu (nors augimo greitis

ir metastazavimo dažnis dažniausiai yra labai žemas), ir apima gerybinius, neprogresuojančius bei agresyvius navikus (Burrini et al., 2016). Tam tikrais atvejais kompiuterinė ar magnetinio rezonanso tomografija gali aptikti makroskopinius riebalus esančius navike, kurie parodo angiomiolipomą (AML) – gerybinį naviką, tačiau, nors per pastaruosius dešimtmečius vaizdavimo metodai stipriai patobulėjo, naudojant vien tik vaizdavimo metodus galutinė diagnozė, apsprendžianti naviko piktybiškumą, nėra įmanoma, taigi naviko histologijai įvertinti pasitelkiamos inkstų naviko biopsijos (Chenam & Lau, 2018).

1.5 SRM gydymas

RCC gydymas priklauso nuo daug faktorių, įskaitant paciento klininkines charakteristikas, naviko dydį, formą bei naviko patologiją. Gydymo būdai apima aktyvią stebėseną (angl. *active surveillance (AS)*), dalinę nefrektomiją (angl. *partial nephrectomy (PN)*), radikalią nefrektomiją (angl. *radical nephrectomy (RN)*), terminę abliaciją (angl. *Thermal ablation (TA)*) bei taikinių terapiją (angl. *Targeted therapy*) (Ballard & Guzman, 2022), tačiau taikinių terapija yra rekomenduojama tik esant metastazavusiam inkstų vėžiui (Kim et al., 2016).

1.5.1 Aktyvus SRM chirurginis gydymas

Nefrektomija – tai operacija, kurios metu pašalinamas pažeistas inkstas (radikali nefrektomija) ar inksto dalis (dalinė nefrektomija) (Sun et al., 2017). Pirmenybė teikiama PN, nes šiuo atveju išsaugoma dalis inksto ir kartu inkstų funkcijos, kas ypatingai svarbu pacientams, sergantiems LIL ar turintiems kitų gretutinių ligų (Campbell et al., 2017). Radikalios nefrektomijos metu pašalinus visą inkstą stipriai sumažėja inkstų funkcija, taigi, nors praeityje RN buvo laikoma auksiniu standartu, dabar ją pakeitė PN (Young et al., 2019). Terminė abliacija yra mažiau invazyvus procesas nei nefrektomija, tačiau turi didesnę vėžio atsinaujinimo riziką (Ballard & Guzman, 2022). Šios procedūros metu navikas sunaikinamas įvairiais metodais pasiekiamu lokaliu temperatūros pokyčiu, kuris sukelia ląstelių mirtį (Regier & Chun, 2015). Terminė abliacija paprastai siūloma ligoniams, kuriems nefrektomija dėl įvairių priežasčių netinkama – esant gretutinėms ligoms ar sumažėjusiai inkstų funkcijai.

Gydymo poveikį inkstų funkcijai veikia daug faktorių, įskaitant pašalintos/abliuotos inkstų parenchimos kiekį, paciento amžių bei gretutinių ligų ir anksčiau diagnozuotos LIL buvimą ar nebuvimą (Sanchez ir kt., 2018). Nors RCC pacientų prognozė vis gerėja, greičiausiai dėl ankstesnio vėžio aptikimo, 4–iems iš 10–ies pacientų inkstų vėžys po nefrektomijos atsinaujina pakartotinai (Sun et al., 2017). Po atliktos TA atsinaujinus vėžiui, gali būti vykdoma PN arba pakartotinė TA, tačiau po prieš tai atliktos TA PN gali būti techniškai sudėtinga atlikti, dėl to didėja komplikacijų rizika (Sanchez ir kt., 2018). TA atveju taip pat matomas didesnis mirtingumo dažnis,

tačiau mažesnis komplikacijų (ypatingai kraujo netekimo ir perpylimo) dažnis bei trumpesnis laikas, praleistas ligoninėje, lyginant su PN ar RN (Rivero et al., 2018). Nė vienas iš šių trijų gydymo metodų (TA, PN ir RN) nėra susijęs su aukštesniu lokalaus vėžio atsinaujinimo dažniu (Sanchez et al., 2018).

Didelė dalis SRM yra diagnozuojami vyresnio amžiaus pacientams, ar pacientams, sergantiems gretutinėmis ligomis, kuriems chirurginis inksto ar jo dalies pašalinimas smarkiai sumažina gyvenimo kokybę. Po nefrektomijos, kuomet navikas yra pašalinamas, ištyrus jo histologiją randama, kad 20–30 % SRM yra gerybiniai (Chenam & Lau, 2018). Perdėtas gydymas – pašalinimas gerybinio ar neprogresuojančio naviko, kuris niekada neprogresuotų ar progresuotų taip lėtai, kad pacientui iki mirties nepasireikštų vėžio simptomai (Welch & Black, 2010). Daugiau nei 60 % visų naujų inkstų navikų diagnozių – SRM, kurie dažnai būna asimptomatiniai ir neprogresuojantys (Marra et al., 2017). Didžiausia rizika, kuria sukuria perdėtinis SRM gydymas yra chirurginės operacijos komplikacijos – kraujo perpylimas (5 % minimaliai invazyvių laparoskopinių operacijų metu, iki 20 % atvirų operacijų metu), pakartotinė operacija (2–5 %), užsitęsios kvėpavimo komplikacijos (1–7 %) ar netgi mirtis (Liu et al., 2014). Atsižvelgiant į didėjančią perdėto gydymo atvejų dažnį, per pastarąjį dešimtmetį aktyvi stebėseną vis dažniau vertinama kaip tinkama SRM gydymo strategija (Chenam & Lau, 2018).

1.5.2 Aktyvi inkstų mažų navikų stebėseną

Aktyvi stebėseną – AS – tai naviko dydžio stebėjimas su atidėta intervencija naviko progresijos atveju (Chenam & Lau, 2018). Nors AS yra saugus metodas, kol kas nėra plačiai naudojamas klinikoje – tik apie 10 % naujai diagnozuotų SRM ligonių renkasi AS (Ueno et al., 2018). Nepaisant to, kad Amerikos urologų asociacija pritaria šiam gydymo būdui (Campbell et al., 2017), kadangi nėra neinvazyvių metodų nustatyti naviko piktybiškumui ir stebėti jo progresijai, šis gydymo būdas kol kas nėra labai plačiai taikomas. AS su galima atidėta intervencija taip pat turi mažiausias bendras išlaidas vienam pacientui, palyginti su iš karto atliekama PN, RN ar TA (Su et al., 2022).

Nors paskutiniu metu padidėjęs diagnozuojamų SRM dažnis padidino nefrektomijų dažnį, mirtingumas nuo RCC nesumažėjo, o netgi padidėjo (Marra et al., 2017). Nuo 1993 iki 2004 metų, T1a atvejų proporcija padidėjo nuo 43,0% iki 57,1%, ir tuo pačiu metu taip pat buvo matomas retesnis didesnių navikų (>4 cm) aptikimas – diagnozės metu vidutinis naviko dydis sumažėjo ~1 cm (Kane et al., 2008). Tačiau, nors ir nefrektomijų skaičius inkstų navikams ir ypatingai SRM išaugo (nuo 0,9 iki 3,6 procedūrų per 100 000 JAV populiacijoje nuo 1983 iki 2002 metų), bendras mirtingumas taip pat padidėjo (Hollingsworth et al., 2006). Tai galima būtų paaiškinti tuo, kad

didžioji dalis tokių navikų yra diagnozuojami vyresnio amžiaus žmonėms (>65 metų), kuriems dažniau atliekami įvairaus pobūdžio tyrimai dėl aukštesnio gretutinių ligų dažnio. Toks atitrūkimas parodo, kad dabartinis SRM gydymas nėra optimalus ir reikalinga apsvarstyti kitas prieinamas alternatyvas. Vienas iš galimų būdų išspręsti šią problemą – platesnis aktyvios stebėsenos pritaikymas, nes ši turi daug pranašumų lyginant su kai kuriais kitais RCC gydymo būdais ir ypatingai tinka inkstų mažiems navikams dėl žemiau pateikiamų priežasčių.

Apie 20 % SRM yra gerybiniai, o didžioji dalis piktybinių SRM pasižymi labai lėtu naviko augimu arba jo dydis apskritai nekinta (Gontero et al., 2013). Mėginiai, gauti nefrektomijos ar biopsijos metu, parodo gerybinių navikų dažnį nuo 19,5 % iki 31,7 % (Marra et al., 2017). Tarp naviko dydžio ir naviko piktybiškumo egzistuoja koreliacija – piktybiškumo tikimybė padidėja 17 % su kiekvienu 1 cm naviko dydžio padidėjimu. Viename tyrime buvo rasta, kad 46,3 % navikų, mažesnių nei 1 cm buvo gerybiniai, palyginus su 6,3 % navikų, didesnių nei 7 cm (Frank et al., 2003). Kitame, ištyrus 2650 RCC pacientų, kuriems buvo atlikta dalinė ar radikali nefrektomija, pastebėta, kad didėjant naviko dydžiui didėjo ir piktybiškumo bei agresyvios histologijos tikimybė. 2 cm dydžio navikai pasižymėjo 84 % piktybiškumo ir 18 % agresyvios histologijos tikimybe, o 4 cm dydžio navikų atveju piktybiškumo bei agresyvios histologijos tikimybė buvo 88 % ir 29% atitinkamai (Bhindi et al., 2018). ccRCC atveju naviko laipsnis taip pat koreliuoja su naviko dydžiu (Marra et al., 2017).

SRM augimo greitis yra žemas (svyruoja tarp 0,11–0,71 cm per metus), lyginant su >4 cm navikais, o 20–40 % SRM išlieka stabilūs ir neprogresuoja (Marra et al., 2017). Dar viename tyrime buvo stebimi SRM ligoniai, pasirinkę AS, ir apskaičiuotas vidutinis augimo greitis buvo 0,2 cm/metus (0–1,9 cm/metus), ir tik 16,2 % navikų progresavo (Park et al., 2017). SRM pasižymi ne tik lėtu augimu, bet ir reta progresija į metastazinę ligos formą AS metu, vidutinis dažnis – apie 1 %, o kai kurie tyrimai tokios progresijos neaptiko (Marra et al., 2017). Viename tyrime autoriai pranešė, kad naviko metastazavimas buvo dažnesnis po nefrektomijos, nei po AS (Patel et al., 2012). Tačiau taip greičiausiai yra dėl to, kad navikai, kuriems taikoma AS, yra tie, kurių metastazavimo tikimybė yra mažiausia.

Jeigu aktyvios stebėsenos metu yra stebima naviko progresija, norint iš anksto užkirsti kelią tolimesniam ligos vystymuisi ir plitimui, ligoniui gali būti taikomi aktyvaus gydymo metodai – nefrektomija ar abliacija. Aktyvios stebėsenos laikotarpis netrukdo aktyvaus gydymo procesui, o galimybė atlikti nefrektomiją ar abliaciją paprastai nesumažėja aktyvų gydymą atidėjus (Pierorazio et al., 2015). Tačiau kai kuriais atvejais dėl išaugusio naviko dydžio nebebuvo manoma atlikti PN ir vienintelis pasirinkimas liko RN (Marra et al., 2017). Žemiausias intervencijos dažnis AS metu

buvo vyresnio amžiaus pacientuose (Lughezzani et al., 2009), o tai parodo, kad vyresnio amžiaus žmonių grupėje AS dažniausiai bus naudingiausias gydymo metodas.

SRM dažnai diagnozuojami vyresnio amžiaus pacientams, kuriems dažniau pasireiškia įvairios gretutinės ligos, ir visa tai apsunkina tradicinius gydymo būdus, kurie galbūt turėtų daugiau žalos nei naudos šioje pacientų grupėje. 5 metų mirties nuo T1 RCC rizika yra mažesnė nei mirties nuo kitų priežasčių rizika (Marra et al., 2017). Viena pagrindinių mirties priežasčių vyresnio amžiaus žmonių grupėje išlieka širdies ir kraujagyslių ligos, kuriomis sirgti tikimybė žymiai padidėtų atlikus nefrektomiją, kurios trumpalaikės komplikacijos apima kraujavimą bei infekciją, o ilgalaikės – hipertenziją ir sumažėjusią inkstų funkciją (Marra et al., 2017). Didelėje dalyje tyrimų, kuriuose pacientams skiriama AS, tiriamieji paprastai yra vyresnio amžiaus ir turi daugiau gretutinių ligų, nes tokiems pacientams yra svarbiausia išsaugoti inkstų funkciją (Vartolomei et al., 2022). Dėl šitos priežasties AS pacientai savo gyvenimo kokybę yra linkę įvertinti prasčiau, nes jų sveikatos būseną dėl su vėžiu nesusijusių priežasčių (gretutinių ligų ar senyvo amžiaus) dažnai yra prastesnė nei pacientuose, pasirenkančiuose nefrektomiją ar abliaciją (Alam et al., 2019; Vartolomei et al., 2022). Taip pat AS pacientuose matomas aukštesnis psichologinio streso lygis, nors tokiems rezultatams patvirtinti yra reikalingi papildomi tyrimai (Vartolomei et al., 2022).

1.6 Skysčių biopsijos

Vėžio biožymenų analizė gali būti atliekama naudojant audinius ar įvairius biologinius skysčius – tai paprastai vadinama skysčių biopsija. Skysčių biopsijos metu analizuojami naviko komponentai, cirkuliuojantys įvairiuose kūno skysčiuose. Šiuose skysčiuose egzistuoja įvairios molekulės, kurios yra susijusios su naviko vystymusi, augimu, imuniteto atsaku į vėžį, ląstelės mirtį, taip pat cirkuliuojančios naviko ląstelės (angl. *circulating tumour cells (CTC)*), neląstelinė DNR (angl. *cell-free DNA (cfDNA)*), cirkuliuojanti naviko DNR (angl. *circulating tumour DNA (ctDNA)*) ar mikropūslelės (J. Wang et al., 2017). cfDNR yra DNR fragmentai, išskiriami į plazmą, kai ląstelės įvykdo apoptozę lizės būdu (Locke ir kt., 2019). ctDNR yra cfDNR dalis, gauta iš navikų, metastazių ar cirkuliuojančių naviko ląstelių (Zhao et al., 2021).

Didžiausias skysčių biopsijų pranašumas – nedidelis jų invazyvumas, nesukeliantis pacientui didelio nepatogumo ir leidžiantis mėginius imti kelis kartus ir dažnai per trumpą laiko tarpą, todėl šis metodas ypatingai pravartus norint stebėti ligos progresiją bei atsaką į gydymą (Nikanjam et al., 2022). Skysčių biopsijos taip pat yra daug pigesnės lyginant su dauguma kitų mėginių paėmimo būdų, be to naudojami metodai jau yra plačiai taikomi ir nereikalaujant papildomų išteklių (Locke ir kt., 2019). Tiriami skysčiai cirkuliuoja po visą kūną, ir į juos CTC, cfDNR ar ctDNR gali patekti iš bet kurios naviko vietos, taigi įmanoma aptikti kai kurias genetinius ar epigenetinius pakitimus,

kurie būtų praleisti tiriant mėginius iš lokalizuotos audinių biopsijos, kuri neretai neatsižvelgia į naviko heterogeniškumą (Dagogo-Jack & Shaw, 2018). Skysčių biopsijos taip pat labai tinkamos, kuomet navikas yra sunkiai pasiekiamoje vietoje ar nedidelis jo dydis trukdo paaimti tinkamą mėginį (Locke ir kt., 2019).

Skysčių biopsijos testai gali būti kombinuojami su tyrimais ultragarsu ar kompiuterinės/magnetinio rezonanso tomografijos vaizdavimo testais, taip padidinant jų tikslumą. Nors skysčių biopsijos testai pasižymi daugeliu privalumų, jie negali nurodyti tikslios naviko vietos, dėl to reikalingi vaizdavimo metodai, ypač prieš operaciją ar metastazuojančio vėžio atveju (Locke ir kt., 2019). Pasiiekus pakankamą tokių testų specifiškumą ir jautrumą, biožymenų testai galėtų pakeisti rizikingesnes audinių biopsijos procedūras.

RCC atveju šlapimas yra idealus tyrimo objektas dėl kelių priežasčių. Šlapimą gauti yra daug lengviau ir pigiau nei kraują, todėl esant ribotiems ištekliams šlapimo tyrimai yra tinkamesni (Locke ir kt., 2019). Taip pat manoma, kad ankstyvam urogenitalinių takų vėžio nustatymui arba ligos progresijai stebėti šlapimas yra tinkamesnė biologinė medžiaga, dėl didelio jautrumo šių vėžio tipų atveju (Lin et al., 2017).

1.7 Neinvaziniai inkstų ląstelių karcinomos biožymenys

Keli serumo ir šlapimo biožymenys buvo pasiūlyti kaip potencialūs įrankiai RCC diagnozei bei prognostikai. Šių skysčių paėmimas – pigus, neinvazyvus/minimaliai invazyvus bei plačiai naudojamas metodas, dėl to jie yra patrauklūs tiriant prognostinius biožymenis, kurie būtų tiriami sąlyginai dažnai. Pastaruoju metu epigenetinių RCC biožymenų tyrimų populiarumas didėja, ypač DNR metilinimo, mikroRNR (miRNR) ir ilgų nekoduojančių RNR (lncRNR) biožymenų tyrimai.

1.7.1 DNR metilinimo biožymenys

Kaip minėta anksčiau, DNR metilinimo pokyčiai įvyksta anksti kancerogenezės metu ir jie taip pat yra specifiškai skirtingiems RCC tipams. DNR metilinimo ties CpG salomis kaupimasis koreliuoja su aukštesniu histologiniu naviko laipsniu bei augimo greičiu (Arai & Kanai, 2010). Dėl šių priežasčių DNR metilinimo biožymenys yra tinkami ankstyvai vėžio detekcijai bei ligos progresijos stebėjimui, o taip pat gali būti panaudojami vėžio klasifikacijoje, atsako į gydymą stebėjimui ir vėžio atsinaujinimo po gydymo aptikimui. DNR metilinimo biožymenys inkstų vėžio atveju tiriami jau gana ilgą laiką, tačiau komerciškai jie kol kas nėra prieinami.

Didžiojoje dalyje DNR metilinimo biožymenų tyrimų, biožymenys buvo pasirinkti remiantis anksčiau publikuotais straipsniais, kurie tyrė gerai žinomus naviko supresijos genus, kurių

metilinimas pastebimas ir kituose vėžio tipuose, tačiau buvo ir tokių, kurie rėmėsi RCC mikrogardalių bei genų raiškos informacija, su tikslu identifikuoti RCC specifiskus biožymenis (Lommen et al., 2021). Pastaruosiuose tyrimuose buvo dažniau pranešama apie aukštesnį biožymenų jautrumą (61–100%), lyginant su publikacijomis, tyrusiomis genus, kurie buvo nespecifiniai RCC.

Biožymenų analizei skysčių biopsijose yra teikiama pirmenybė dėl nedidelio metodo invazyvumo, tačiau dauguma RCC DNR metilinimo biožymenų buvo tiriami audinio mėginiuose, nesiekiant pratęsti tyrimus naudojant skysčių biopsijas (Lommen et al., 2021). Audinio mėginiais pagrįstas biožymenų testas neturi didelės vertės, kadangi tiriant audinius šiuo metu galima kitais metodais diagnozuoti ir klasifikuoti RCC. Taip pat didelė dalis tyrimų apėmė įvairių dydžių ir stadijų navikus, ir, nors svarbu, kad diagnostiniai biožymenis būtų tiriami kiekvieno vėžio etapo metu, per didelis į tyrimą įtrauktų aukštos stadijos/laisnio navikų skaičius gali iškreipti rezultatus. Taip pat ne visų publikacijų atveju autoriai pranešė apie tyrime analizuotus RCC potipius, nors šie potipiai, kaip minėta anksčiau, turi skirtingą biologinę kilmę ir pasižymi savita ligos eiga, histologija, prognoze bei atsaku į gydymą.

Keli tyrimai susiejo cirkuliuojančios DNR metilinimo biožymenis su kai kuriais klinikiniais rodikliais. Dauguma tokių tyrimų nagrinėjo metilinimo dažnį ar lygį skirtinguose ligos eigos etapuose ir susiejo ankstesnį rodiklį su tokiais kintamaisiais kaip naviko laipsnis, stadija, metastazių į netoliese esančius limfmazgius buvimas/nebuvimas, išgyvenamumas bei mirties rizika (Kubiliute & Jarmalaite, 2021). Tokia biožymenų analizė suteikia reikalingos įžvalgos kuriant biožymenų testus su tikslu juos pritaikyti ligos klasifikacijai ar progresijos stebėjimui.

Tik keli individualūs DNR metilinimo biožymenis ir biožymenų kombinacijos pasiekė >70 % jautrumą, o DNR metilinimo biožymenų kombinacijos pasižymėjo geresniais rezultatais, nes kombinacijos geriau atspindėjo naviko heterogeniškumą (Kubiliute & Jarmalaite, 2021; Lommen et al., 2021). 6-ių biožymenų kombinacija (*VHL*, *P16*, *P14*, *APC*, *RASSF1A* ir *TIMP3*) pasižymėjo aukščiausiu jautrumu ir specifiškumu (90% ir 100% atitinkamai) šlapimo mėginiuose (Kubiliute & Jarmalaite, 2021). Tačiau apibendrinus, nors rezultatai yra daug žadantys, daugumos publikacijų atveju yra reikalingi išsamūs papildomi tyrimai, apimantys didesnes tiriamųjų grupes, ir nė vienas biožymuo nepasiekė tokios stadijos, kurioje galėtų būti naudojami klinikoje. SRM atveju neinvazyvių DNR metilinimo biožymenų, kurie galėtų padėti laiku aptikti SRM ir tiksliai numatyti SRM progresavimą kol kas nėra.

1.7.2 miRNR biožymenys

miRNR (angl. *microRNA (miRNA)*) – tai nedidelės RNR molekulės (19–25 nukleotidų ilgio), reguliuojančios genų ekspresiją po transkripcijos juos nutildant, nes prisijungia prie tikslinio geno mRNR 3'UTR ir taip inhibuoja jo translacią (T. X. Lu & Rothenberg, 2018). Įvairiuose kūno skysčiuose cirkuliuojančios miRNR yra gana stabilios ir apsisaugo nuo endogeninių RNazių prisijungdamos prie baltymų, lipoproteinų, ar pasinaudojant mikropūslelėmis ir egzosomomis (Kubiliute & Jarmalaite, 2021). Didelė įvairovė miRNR buvo tiriamos kaip biožymenys RCC diagnozei ar prognostikai pagelbėti, kaip miR-122-5p ir miR-206, kurių padidėjęs lygis serume buvo tiesiogiai susijęs su aukštesne naviko stadija, laipsniu bei trumpesniu bendru išgyvenamumu ir išgyvenamumu be ligos progresijos (Heinemann et al., 2018). Tačiau plačiausiai ištirtas miRNR biožymuo RCC atveju yra miR-210, kurios lygis RCC pacientuose buvo padidėjęs, lyginant su sveika kontrole (Makino et al., 2022). miR-210 ekspresuojama reaguojant į hipoksiją, daugiausia per HIF-1 α , kuris, kaip minėta anksčiau, dalyvauja inkstų kancerogenezeje. Tačiau miR-210 padidėjimas taip pat buvo nustatytas esant ir kitų tipų vėžiui (Lu et al., 2015). SRM atveju miRNR kaip potencialius biožymenis tyrė tik vienas tyrimas, kuris identifikavo 9 miRNR ankstyvai ccRCC SRM diagnozei (Di Meo et al., 2020). Di Meo ir kt. aptiko, kad miR-328-3p ekspresija buvo žymiai sumažėjusi progresuojančių ccRCC SRM, lyginant su neprogresuojančiais ccRCC SRM, o aukštesni šios miRNR ekspresijos lygiai buvo susiję su ilgesniu išgyvenamumu, rodant šios miRNR prognostinį potencialą.

1.7.3 lncRNR biožymenys

lncRNR (angl. *long non-coding RNA (lncRNA)*) – tai baltymų nekoduojančios RNR, ilgesnės nei 200 nukleotidų ir dalyvaujančios genų ekspresijos reguliavime (Bridges et al., 2021). lncRNR dalyvauja įvairiuose procesuose, susijusiuose su vėžio vystymusi ir progresija – ląstelės ciklo reguliacijoje, proliferacijoje, apoptozėje, ląstelių senėjime, migracijoje ir invazijoje (Kubiliute & Jarmalaite, 2021). ccRCC pacientų serume stebima sumažėjusi šių lncRNR – LET, PVT1, PANDAR, PTENP1, ir LINC00963 ekspresija, lyginant su kontrole, be to šie biožymenys atskyrė ccRCC nuo gerybinių navikų (Y. Wu et al., 2016). RCC pacientų serume taip pat buvo rasti reikšmingai padidėję GIHCG (He et al., 2018) ir LINC00887 (Xie et al., 2020) lygiai palyginus su kontrole, kas taip pat buvo susieta su aukštesniu naviko laipsniu bei trumpesniu išgyvenamumu. Šios lncRNR yra susijusios su RCC ląstelių proliferacija ir migracija *in vitro* (Makino et al., 2022). Vienas iš lncRNR biožymenų, kuris potencialiai galėtų būti naudojamas kaip ankstyvas trumpo išgyvenamumo prediktorius RCC pacientams – aukšta MALAT1 ekspresija, kuri indikuoja limfmazgių metastazes (J. Wang et al., 2016). Su prasta prognoze taip pat asocijuojamos TCL6, NBAT-1, SPRY4-IT1, RCCRT1, GAS5, ir CADM1-AS1 lncRNR (Makino et al., 2022).

1.7.4 Kiti biožymenys

RCC diagnozės bei prognozės metodikoms palengvinti yra siūlomi ne tik epigenetiniai biožymenys. Vienais iš perspektyviausių šlapimo biožymenų yra laikomi AQP1 ir PLIN2 baltymai ankstyvai ccRCC ar pRCC detekcijai (Morrissey et al., 2010). Kitas RCC biožymuo, kuris atspindi įvairias inkstų pažeidas, ne tik vėžį – KIM1 (angl. *kidney injury molecule-1*) baltymas, kuris, manoma, dalyvauja inkstų kanalėlio epitelio atstatyme (Makino et al., 2022). Metabolomikos tyrimai tiria įvairius metabolitus kaip potencialius RCC biožymenis, vienas iš tokių – p-krezolio gliukuronidas, skirtas RCC diagnozei (Oto et al., 2020). Oto ir kt. tyrime taip pat buvo identifikuoti izobutiril-L-karnitinas ir L-prolino betainas kurie turi potencialo kaip prognostiniai žymenys, ir visi trys metabolitai buvo siejami su inkstų ligomis. Biožymenų tyrimuose taip pat pasižymi proteomikos ir lipidomikos tyrimai bei aminorūgščių profilio analizė. Tiriant serumo aminorūgščių profilį pagal tam tikrų aminorūgščių koncentracijas galima atskirti RCC sergančius žmones nuo kontrolių (Makino et al., 2022). Toks modelis taip pat turi ir prognostinių savybių.

Nors šiuo metu biožymenys inkstų vėžiui nėra komerciškai prieinami, įvairių tipų biožymenys RCC diagnostikai ir prognostikai yra gana aktyviai tiriami. Tačiau SRM atveju tokių tyrimų yra atlikta labai mažai, nors SRM apima didesnę dalį šiuo metu diagnozuojamų inkstų vėžio atvejų.

1.8 Tirtų genų charakteristikos

Ankstesniuose tyrimuose atlikus viso genomo metilintos DNR audiniuose analizę buvo atrinkti genai, kurių reguliacinių sričių metilinimo lygis buvo aukštesnis, lyginant su normaliais, nevėžiniais inkstų audiniais, ir šių genų hipermetilinimas toliau buvo analizuojamas šlapimo mėginiuose (Kubiliūtė et al., 2022). Toliau trumpai aprašoma atrinktų genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* biologinė funkcija ir ankstesni tyrimai, susiję su inkstų vėžiu ar kitomis vėžio formomis. *ZNF677* (angl. *Zinc finger protein 677*) genas koduoja transkripcijos faktorių ir greičiausiai veikia kaip naviko supresijos genas, kurio padidėjusi raiška slopina ląstelių proliferaciją, migraciją, invaziją bei apoptozę (Li et al., 2018). Padidėjęs *ZNF677* metilinimo lygis, metilinimo dažnis ir raiškos praradimas buvo aptiktas tiriant daugelį vėžio formų, įskaitant storosios žarnos bei ccRCC potipio vėžį (Liang et al., 2022; Siraj et al., 2021). *PCDH8* genas koduoja protokadheriną-8. Protokadherinai – tai transmembraninės molekulės, reguliuojančios ląstelių adheziją (Pancho et al., 2020). *PCDH8* taip pat yra naviko supresijos genas, kuris reguliuoja ląstelių adheziją, proliferaciją ir migraciją (S. Wu et al., 2022), o šio geno metilinimo aberacijos buvo pastebėtos ir kitų vėžio tipų tyrimuose. Sumažėjusi *PCDH8* ekspresija bei aukštesnis promotoriaus srities metilinimo lygis aprašytas kepenų, storosios žarnos ir kitų vėžio formų atveju, įskaitant ir ccRCC potipį (Y.-L. Lin et al., 2014; S. Wu et al., 2022; C. Zhang et al., 2016). *FLRT2* (angl.

Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2) koduoja membranos baltymą, kuris sąveikauja su fibronektinu, dalyvauja ląstelių adhezijoje ir reguliuoja ląstelių augimą (Ando et al., 2022). Šio geno hipermetilinimas, kartu su sumažėjusia ekspresija buvo aptiktas storosios žarnos vėžio pacientuose (Guo et al., 2020). Krūties vėžio audiniuose bei ląstelių linijose buvo aptiktas *FLRT2* geno hipermetilinimas ir sumažėjusi ekspresija, kuri skatino ląstelių proliferaciją bei migraciją (Bae et al., 2017). *FBN2* (angl. *fibrillin-2*) – tai ekstraląstelinio matrikso glikoproteinas, kuris reguliuoja TGF-beta bioprieinamumą, o tai gali skatinti ar slopinti vėžio vystymąsi (van Loon et al., 2020). Šio geno hipermetilinimas buvo aptiktas storosios žarnos bei inkstų vėžio atveju (Morris et al., 2011; Rasmussen et al., 2016). *TFAP2B* genas koduoja transkripcijos faktorių AP-2 beta, kuris reguliuoja proliferaciją, diferenciaciją ir dalyvauja nefrono kanalėlio epitelinių ląstelių diferenciacijoje, dėl to yra būtinas inkstų vystymuisi (Zhu et al., 2020). *TAC1* genas koduoja tachikinina-1, kuris priklauso neuropeptidų šeimai ir veikia ląstelių sekreciją, judrumą bei uždegimines reakcijas. Aukštesni šio geno metilinimo lygiai buvo pastebėti storosios žarnos ir kitų vėžio tipų atveju (Ma et al., 2019).

Visi šie genai yra susiję su kancerogeneze svarbiais ląstelės procesais, kaip proliferacija ar ląstelių migracija, o genas *TFAP2B* taip pat yra reikšmingas inkstų vystymesi. Tiriama biožymenys taip pat anksčiau buvo tirti RCC ir kitų lokalizacijų navikų atveju.

Apibendrinant inkstų maži navikai – SRM – tai inkstų navikai, kurių skersmuo ≤ 4 cm, ir jie sudaro didžiąją dalį inkstų vėžio atvejų bei dažniausiai yra diagnozuojami atsitiktinai. Ankstyva diagnozė, kaip ir kitų vėžio formų atveju, yra labai svarbi inkstų vėžio gydyme, tačiau dabartiniai diagnostiniai metodai nepasižymi pakankamu jautrumu, be to yra invazyvūs, brangūs ir neatskiria gerybinių darinių nuo piktybinių navikų. Tačiau inkstų vėžio atveju, nepaisant didelio poreikio, nė vienas neinvaziškai aptinkamų biožymenų testas dar nėra komerciškai prieinamas. SRM augimo greitis bei metastazių tikimybė dažniausiai yra labai nedidelė, o apie 25 % tokių navikų yra gerybiniai, taigi gana dažnai pasitaiko perdėto gydymo atveju, kuris sukelia daug komplikacijų, ypač vyresnio amžiaus žmonėms, kuriems SRM dažniausiai ir diagnozuojami. Todėl aktyvi stebėseną tampa vis labiau priimtinas gydymo būdas, ypač SRM atveju. Tačiau aktyviai stebėsenai papildyti trūksta biožymenų, kurie galėtų įvertinti ligos progresiją. Vienas iš anksčiausių inkstų kancerogenezės metu įvykstančių pokyčių – DNR metilinimo pokyčiai, kuriuos galima aptikti prieinamais ir paprastais metodais skysčių biopsijose, pavyzdžiui šlapime. Šiame darbe ir siekiama įvertinti ankstesniuose tyrimuose identifikuotų neinvazyvių DNR metilinimo biožymenų diagnostinę bei prognostinę vertę.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Tyrimo objektas

Šiam tyrimui atlikti buvo gautas Lietuvos Bioetikos Komiteto leidimas Nr. 158200–17–952–457. Visi į tyrimą įtraukti asmenys pasirašė informuoto asmens sutikimo formą. Iš viso buvo įtraukti 54 pacientai, kuriems buvo diagnozuotas SRM ir buvo atlikta perkutaninė biopsija, siekiant patvirtinti RCC. Buvo nustatytas naviko laipsnis pagal WHO/ISUP vertinimo sistemą ir histologinis naviko tipas. Visi RCC histologiniai tipai buvo įtraukti į tyrimą. Diagnozavus SRM, pacientai buvo aktyviai stebimi ir buvo periodiškai paimami šlapimo mėginiai, kartu su įvairiais klinikiniais bei demografiniais rodikliais. Skirtingų etapų metu paimtų mėginių skaičius ir naviko dydžio rodikliai apibendrinti 2.1 lentelėje. Praktikos metu buvo ištirtas 81 šlapimo nuosėdų mėginys, tačiau dėl patikimesnės statistinės analizės buvo įtraukti ir anksčiau laboratorijoje ištirti mėginiai bei asimptominė kontrolė (AK). Iš viso analizė apėmė 215 šlapimo mėginius iš SRM sergančių asmenų ir 92 iš sveikų asmenų (AK). Tiriamųjų charakteristikos apibendrintos 2.2 lentelėje.

2.1 lentelė. Į tyrimą įtrauktų pacientų naviko dydis skirtinguose aktyvios stebėsenos etapuose.

Etapai	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Mėnesiai po SRM diagnozės	0 mėn.	2–9 mėn.	5–17 mėn.	11–28 mėn.	22–34 mėn.	25–39 mėn.	35–41 mėn.	42–48 mėn.
Mėginių skaičius	N = 54	N = 46	N = 38	N = 34	N = 21	N = 13	N = 5	N = 3
1 radiologas								
Vidutinis naviko tūris, mm³	7356	7418	10238	9910	12081	7219	1118	8623
Vidutinis didžiausias naviko skersmuo, mm	23,69	23,76	25,88	26,32	27,81	22,91	18,67	23
2 radiologas								
Vidutinis naviko tūris, mm³	8078	7896	9762	9609	11847	10845	4070	7145
Vidutinis didžiausias naviko skersmuo, mm	23,81	23,3	24,51	25,61	27,25	24,5	22,2	20,67

2.2 lentelė. Demografiniai bei klinikiniai–patologiniai tirtų pacientų rodikliai.

Kintamieji	Ligonų grupės			Šlapimo nuosėdų mėginių grupės		
Lytis	Moterys (N = 32)		Vyrai (N = 22)	Moterys (N = 134)		Vyrai (N = 81)
Rūkymas	Rūko (N = 1)	Nerūko (N = 47)	Anksčiau rūkė (N = 6)	Rūko (N = 6)	Nerūko (N = 184)	Anksčiau rūkė (N = 25)
Histologinis naviko tipas	ccRCC (N = 37)	pRCC (N = 8)	chRCC (N = 4)	ccRCC (N = 141)	pRCC (N = 42)	chRCC (N = 19)
Naviko laipsnis pagal WHO/ISUP	1 °(N = 14)		2 ° (N = 30)	1 °(N = 14)		2 ° (N = 30)
Naviko augimo greitis	Stabilus (N = 43)		Spartus (N = 11)	Stabilus (N = 166)		Spartus (N = 49)
Cukrinis diabetas	Yra (N = 15)		Nėra (N = 39)	Yra (N = 59)		Nėra (N = 151)
Arterinė hipertenzija	Yra (N = 47)		Nėra (N = 7)	Yra (N = 185)		Nėra (N = 26)
Kitos (esamos/buvusios) piktybinės ligos	Yra (N = 14)		Nėra (N = 40)	Yra (N = 47)		Nėra (N = 163)
Kitos charakteristikos						
Vidutinis amžius diagnozės metu			74,6 metai			
Vidutinis KMI			28,81 kg/m ²			

KMI – kūno masės indeksas; WHO/ISUP – *International Society of Urologic Pathologists/World Health Organization*, ccRCC – šviesių ląstelių RCC potipis, pRCC – papiliarinis RCC potipis, chRCC – chromofobinis RCC potipis.

2.2 DNR skyrimas iš šlapimo nuosėdų

Šlapimo mėginiai atšildomi +4 °C temperatūroje (~3–4 val.). Į sterilius 1,5 ml tūrio mėgintuvėlius pilama iki 1 ml šlapimo mėginio. Mėginiai centrifuguojami 5 min. 2000 x g greičiu. Supernatantas perkeliamas į naują mėgintuvėlį, centrifuguojama 2 min. 14000 aps./min. greičiu. Ant nuosėdų pilama 500 µl *Rene* lizės buferio, susidedančio iš 175 mM EDTA (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija), 750 mM NaCl (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija), 100 mM Tris–HCl pH 8,0 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija) ir 1% SDS (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija). Maišoma sukurine purtykle, trumpai nucentrifuguojama staline centrifuga. Pakartotinai centrifuguoto supernatanto skystoji dalis pašalinama, likęs mėgintuvėlių turinys perkeliamas į pagrindinius mėgintuvėlius su nuosėdomis ir lizės buferiu. Į kiekvieną mėgintuvėlį pilama po 10–15 µl proteinazės K (Thermo Fisher Scientific, Lietuva). Mėginiai inkubuojami terminėje maišyklėje ~16–18 val. 55 °C 400 aps./min. Po inkubacijos į mėgintuvėlius pilama 500 µl fenolio–chloroformo–izoamilo alkoholio mišinio (25:24:1) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija), mėginiai 10 min. maišomi horizontaliai vartant rankose. Mėginiai centrifuguojama 10 min. 14000 aps./min. greičiu, viršutinis sluoksnis perkeliamas į naują sterilų mėgintuvėlį. Dar kartą pilama 500 µl fenolio–chloroformo–izoamilo alkoholio mišinio, maišoma 10 min. horizontaliai vartant rankose ir centrifuguojama 10 min. 14000 aps./min. greičiu. Viršutinis sluoksnis perkeliamas naują sterilų mėgintuvėlį, pilama 500 µl chloroformo (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija), maišoma 10 min. horizontaliai vartant rankose, centrifuguojama 10 min. 14000 aps./min. greičiu. Viršutinis sluoksnis perkeliamas į naują sterilų mėgintuvėlį. Pilama 40 µl 5 M amonio acetato (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Vokietija), 1 µl (galutinė koncentracija – 0,01 mg/ml) glikogeno (Thermo Fisher Scientific, Lietuva), 1 ml 96 % etanolio. Mėginiai precipituojami 2 val. –20 °C temperatūroje. Po to centrifuguojami 25 min. 13500 aps./min. greičiu, supernatantas pašalinamas. Nuosėdos praplaunamos 500 µl 70 % etanolio tirpalo. Centrifuguojama 25 min. 13500 aps./min. greičiu, supernatantas pašalinamas, o etanolio likučiai išgarinami mėginius centrifuguojant 10 min 45 °C vakuuminėje centrifugoje (Concentrator plus, Eppendorf). DNR tirpinama 40 µl sterilaus vandens (Thermo Fisher Scientific, Lietuva) ~1 val. kambario temperatūroje. DNR koncentracija matuojama bekiuvečiu spektrofotometru (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Mėginiai saugomi –20 °C temperatūroje.

2.3 DNR modifikacija natrio bisulfitu

Genų metilinimo analizei iš šlapimo nuosėdų išskirtos DNR modifikuojama natrio bisulfitu naudojant *EZ DNA Methylation™ Kit* (Zymo Research, Irvinas, JAV). Bisulfitinės modifikacijos metu nemetilinti citozinai virsta uracilu, o metilinti išlieka nepakitę. Ši konversija leidžia įvairiais metodais analizuoti DNR metilinimą – PGR amplifikacija, DNR sekvenavimu ir kitais. Prieš

modifikaciją paruošiamas *CT conversion* reagentas – į mėgintuvėlį su reagentu pilama 750 µl vandens ir 210 µl *M–Dilution* buferio, tuomet 10 min maišoma mėgintuvėlį vartant rankose.

Mėgintuvėlyje 400 ng iš šlapimo nuosėdų išskirtos DNR yra sumaišoma su tiek vandens, kad galutinis mišinio tūris siektų 50 µl, ir 5 µl *M–Dilution* buferio. Mėginiai tuomet išmaišomi ir 15 min inkubuojami 42 °C temperatūroje. Po inkubacijos pilama 100 µl *CT Conversion* reagento, supurtoma ir mėginiai 16 val inkubuojami 50 °C temperatūroje, termostate. Kadangi *CT Conversion* reagentas yra jautrus šviesai, dirbama greitai, kad būtų sumažintas šviesos poveikis reakcijai. Tuomet reakcija nutraukiama mėginius 10 min inkubuojant 4 °C temperatūroje. *Zymo–Spin™ IC Column* kolonėlės įstatomos į surinkimo mėgintuvėlius ir į kiekvieną kolonėlę pilama 400 µl *M–Binding* buferio. Tuomet įnešama modifikuota DNR, kolonėlės uždaromos ir sumaišomos kelis kartus pavartant. Centrifuguojama 30 s, 11000 × g, filtratas pašalinamas. Į kiekvieną kolonėlę pilama po 100 µl *M–Wash* buferio, centrifuguojama 30 s 11000 x g. Tuomet į kiekvieną kolonėlę pilama po 200 µl *M–Desulphonation* buferio ir paliekama kambario temperatūroje 15–20 min. Po inkubacijos centrifuguojama 30 s 11000 x g. Tuomet plovimui užpilama 200 µl *M–Wash* buferio ir centrifuguojama 30 s 11000 x g, procedūra pakartojama. Kolonėlė įstatoma į naują, sterilų 1,5 ml mėgintuvėlį, užpilama 40 µl *M–Elution* buferio, centrifuguojama 30 s 12000 x g ir surenkama modifikuota DNR. Modifikuotos DNR mėginiai buvo iškart analizuojami arba laikomi –20 °C temperatūroje.

2.4 Genų metilinimo analizė kiekybiniu metilinimui jautrios PGR metodu

Iš šlapimo nuosėdų išskirta bisulfitu modifikuota DNR buvo naudojama kiekybinei metilinimui jautriai PGR (angl. *quantitative methylation–specific polymerase chain reaction (QMSP)*) atlikti. Pradinio DNR kiekio normalizavimui kiekvienos reakcijos metu buvo naudota *ACTB* (aktinas–β) geno endogeninė kontrolė. Pradmenys ir zondai specifiniai metilintoms genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* sekoms anksčiau sukurti laboratorijoje naudojant Methyl Primer Express® v1.0 (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Karlsbadas, JAV) programą (Kubiliūtė et al., 2022) ir užsakyti iš Metabion (Martinsried, Vokietija).

Reakcija atliekama 20 µL tūryje, 96 šulinėlių MicroAmp® plokštelėje (*Applied Biosystems™*). Reakcijos mišinio komponentai ir jų kiekiai vienai reakcijai pateikti 2.3 lentelėje. Atskiriems genams ir endogeninei kontrolei reakcijos mišiniai ruošiami atskirai ir išpilstomi po 18 µL, į kiekvieną šulinėlį dedama po 2 µL du kartus praskiestos natrio bisulfitu modifikuotos DNR (10 ng). Reakcijos metu naudojama taršos kontrolė (angl. *No Template Control (NTC)*) ir metilinta kontrolė (angl. *Methylated Control (MC)*), kiekvienam mėginiui ir endogeninei kontrolei vykdomi trys techniniai pakartojimai, MC – du pakartojimai. Buvo įskaitomos tik tos reakcijos, kurių metu MC šulinėliuose buvo gautas teigiamas signalas, o NTC šulinėliuose amplifikacija nevyko.

Užpildyta plokštelė užklijuojama MicroAmp® Clear Adhesive Film plėvele (*Applied Biosystems*™) ir centrifuguojama 4000 × g, 2 min. Plokštelė talpinama į ViiA7 Real-Time PCR (*Applied Biosystems*™) aparatą sujungtą su kompiuteriu, paleidžiama programa, kurios sąlygos nurodytas 2.4 lentelėje. Rezultatai buvo apdorojami naudojant *QuantStudio Real-Time PCR Software* (Thermo Scientific) programą. Genų–taikinių metilinimo lygis buvo apskaičiuotas naudojant $\Delta\Delta C_q$ algoritmą ir išreikštas procentais atitinkamai nuo MC, pagal 1 formulę.

$$\Delta C_t (\text{mėginio/MC}) = C_t(\text{tiriamo geno}) - C_t(\text{endogeninės kontrolės})$$

$$\text{Metilinimo lygis} = 2^{-(\Delta C_t(\text{tiriamo mėginio}) - \Delta C_t(\text{MC}))} * 100\%$$

1 formulė Formulė, naudota apskaičiuoti tiriamo geno metilinimo lygį procentais. C_t – slenkstinis ciklas (angl. *cycle threshold*), MC – metilinta kontrolė (angl. *methylated control*) (Livak & Schmittgen, 2001).

2.3 lentelė QMSP reakcijos komponentai ir jų kiekiai vienam mėginiui

Reakcijos mišinio komponentai	Kiekis reakcijos tūryje (20 µl)
Vanduo	6,6 µl
1 × <i>TaqMan</i> ® <i>Universal Master Mix II, no UNG</i> (<i>Applied Biosystems</i> ™)	10 µl
Pradmuo (prasminis)	0,6 µl
Pradmuo (antiprasminis)	0,6 µl
Zondas	0,2 µl
Natrio bisulfitu modifikuota DNR	2 µl (10 ng)

2.4 lentelė QMSP temperatūrinis režimas

Reakcijos stadija	Etapas	Temperatūra	Trukmė
Pradinė denatūracija	Denatūracija ir fermento aktyvinimas	95 °C	10 min
Amplifikacija (50 ciklų)	DNR grandinių atskyrimas	95 °C	15 s
	Pradmenų prijungimas/grandinės	60 °C	1 min

2.5 Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant MedCalc® v14.0 (MedCalc Software, Ostendas, Belgija) ir GraphPad Prism v8.0.2 (GraphPad Software, Lojola, JAV) programas. Sąsajos tarp dviejų neparametrinių kintamųjų įvertintos naudojant Spearman koreliacijos koeficientą. Pagal kategorinius kintamuosius išskirstytoms grupėms lyginti buvo naudojami Mann–Whitney U bei

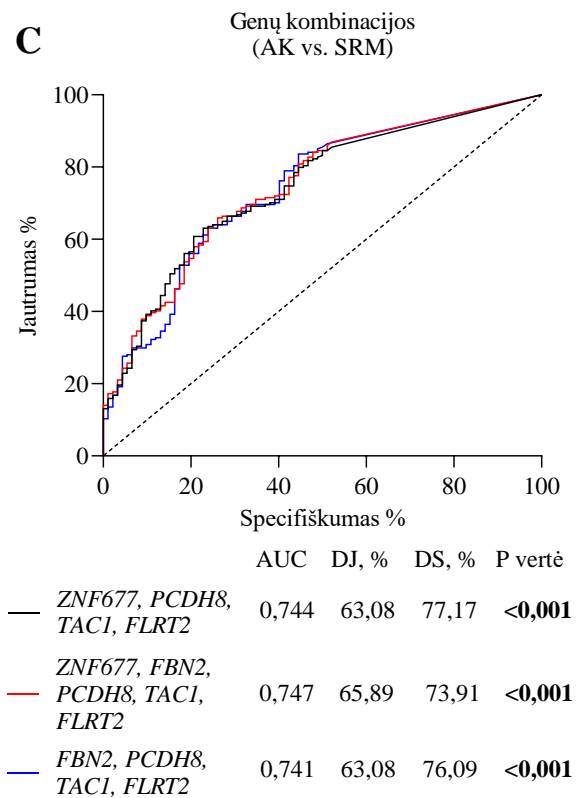
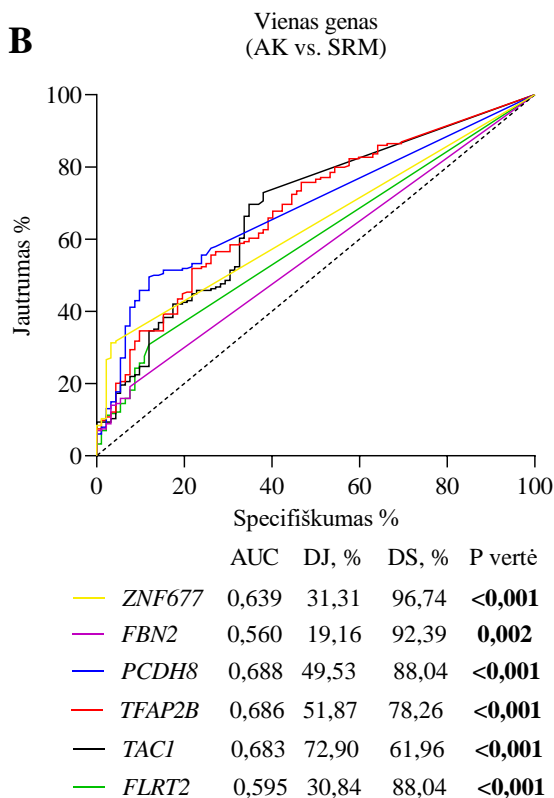
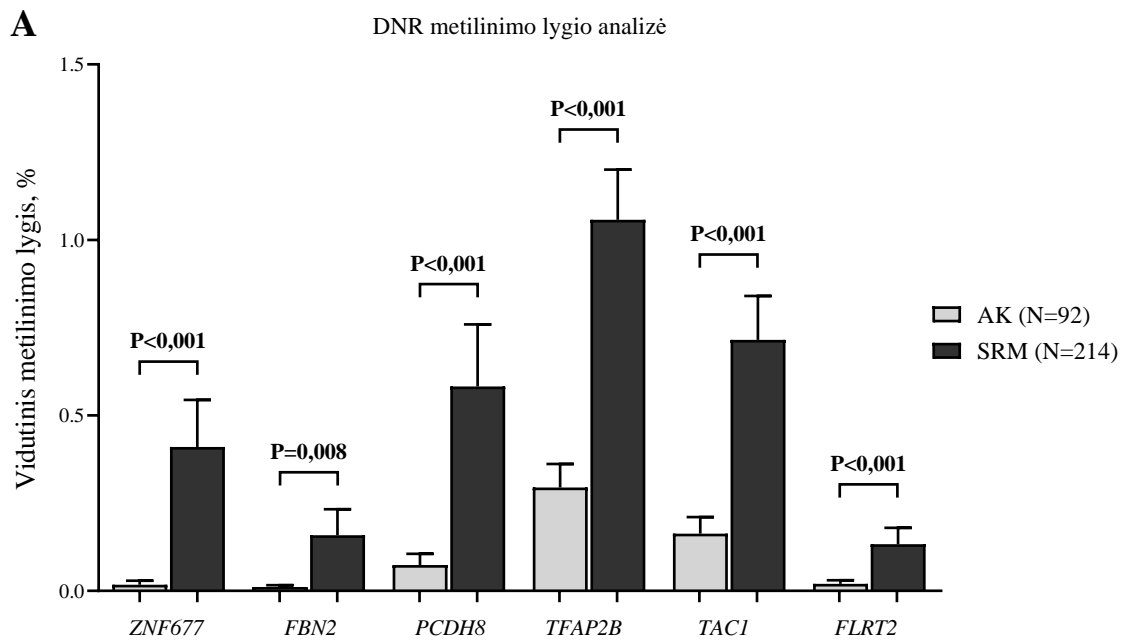
Kruskal–Wallis testai. Biožymenų diagnostiniam potencialui įvertinti buvo atlikta ROC (angl. *Receiver Operating Characteristic*) kreivių analizė ir apskaičiuotos ploto po kreive (angl. *Area under the ROC Curve (AUC)*), jautrumo bei specifiškumo reikšmės. AUC reikšmei artėjant link 1, sugebėjimas atskirti dvi grupes – asimptominę kontrolę ir žmones, turinčius SRM – didėja. Jautrumas – teisingai identifikuotų sergančių žmonių proporcija, o specifiškumas – teisingai identifikuotų nesergančių žmonių proporcija, abi šios reikšmės yra išreiškiamos procentais. Įvairių genų kombinacijų analizei buvo atlikta logistinė regresija. Pasirinkti statistinio reikšmingumo lygmenys: $p > 0,05$ – statistiškai nepatikima, $p \leq 0,05$ – patikima.

3. REZULTATAI

Genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* reguliacinių sričių DNR metilinimo lygis SRM ligonių (N (mėginių) = 214) ir asimptomatinių kontrolių (AK; N = 92) šlapimo nuosėdose buvo tirtas QMSP metodu. Pagal gautus metilinimo lygius buvo vertinama biožymenų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* diagnostinė vertė – gebėjimas atskirti SRM turinčius žmones nuo sveikų asmenų. Tiriamų genų metilinimas taip pat buvo toliau analizuojamas pagal demografinius bei klinikinius–patologinius kintamuosius, siekiant įvertinti šių biožymenų prognostinę vertę.

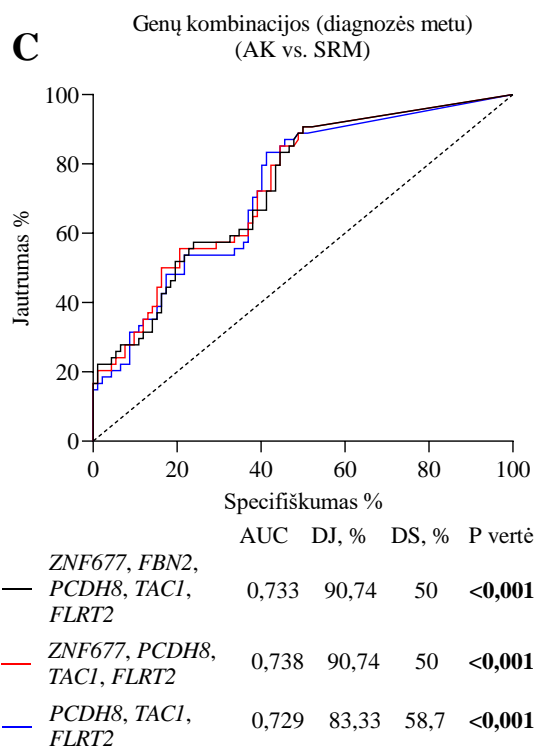
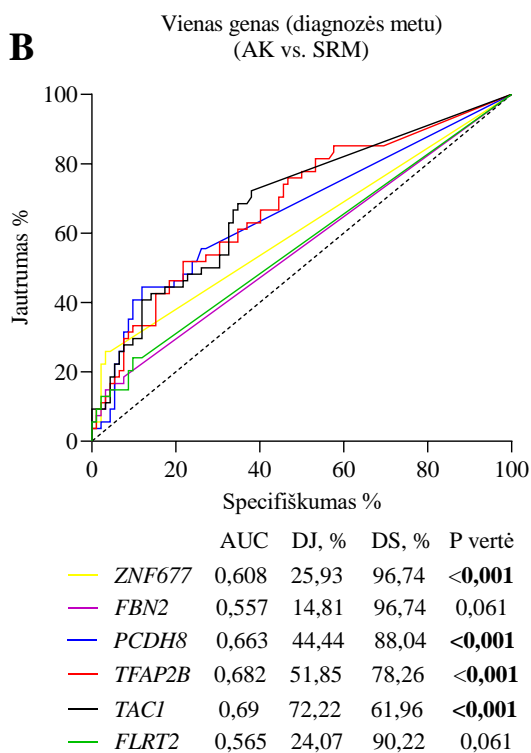
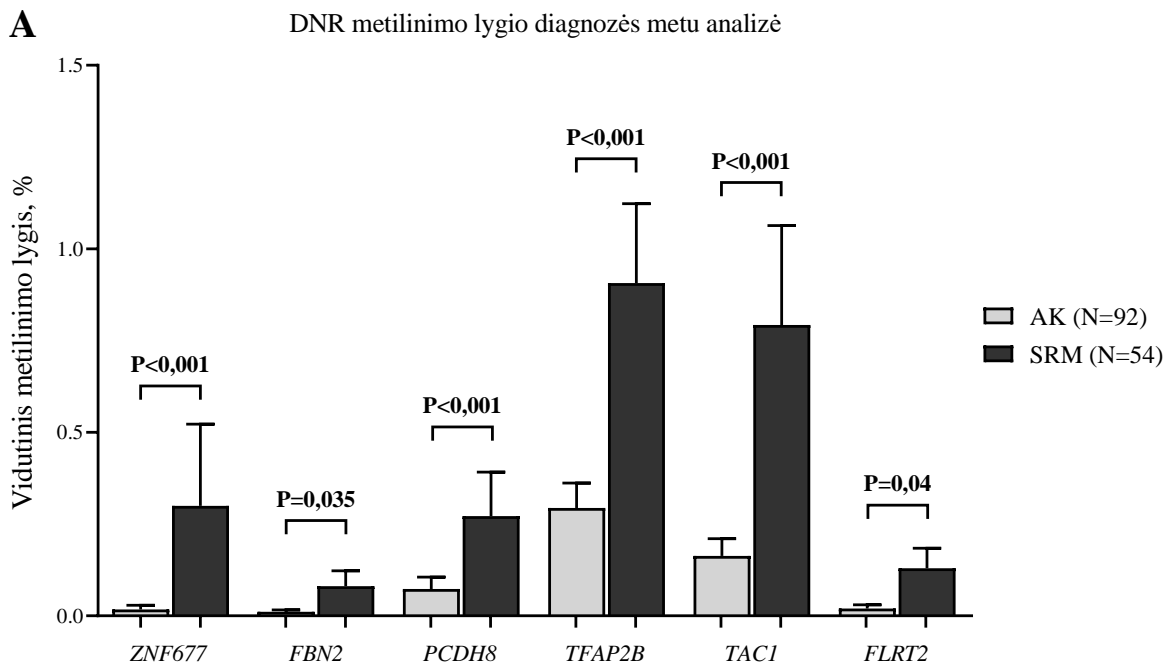
3.1 Biožymenų diagnostinės vertės analizė

Biožymenų diagnostinei vertei patikrinti buvo atliekama ROC kreivių analizė bei lyginami vidutiniai tiriamų genų metilinimo lygiai AK bei SRM ligonių šlapimo nuosėdose. Priedų 1 bei 2 lentelėje pavaizduota pilna visų genų bei jų kombinacijų diagnostinės vertės analizė. Visų tirtų genų metilinimo lygis buvo reikšmingai aukštesnis SRM ligonių šlapimo nuosėdose, lyginant su AK (3.1 pav., A). Genus tiriant atskirai, aukščiausia diagnostinė vertė matoma *PCDH8* geno atveju, kurio AUC buvo 0,69, jautrumas – 49,53 % ir specifiškumas – 88,04 % (3.1 pav., B). Tačiau geresnė diagnostinė vertė matoma analizuojant genų kombinacijas – aukščiausia AUC reikšme pasižymėjo penkių genų – *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TAC1* ir *FLRT2* kombinacija (AUC = 0,75, jautrumas – 65,89 %, specifiškumas – 73,91 %; $P < 0,001$) (3.1 pav., C). Visais atvejais buvo gautos patikimos P reikšmės ($< 0,05$) (priedai, 1 lentelė).



3.1 pav. Biožymenų diagnostinės vertės analizė. A – Tirtų genų reguliacinių sričių DNR metilinimo lygis SRM ligonių ir AK šlapimo nuosėdose. B – pavienių genų, C – genų kombinacijų ROC (angl. Receiver Operating Characteristic) kreivių analizė, parodanti biožymenų diagnostinę vertę. AK – asimptotinė kontrolė; SRM – inkstų maži navikai (angl. Small Renal Mass); AUC – plotas po kreive (angl. Area under the ROC Curve); DJ – diagnostinis jautrumas; DS – diagnostinis specifiškumas. Reikšmingos P reikšmės paryškintos.

Diagnozės metu paimti (I etapas, 0 mėn.) mėginiai buvo analizuojami atskirai ir genų metilinimo lygis buvo palygintas su AK bei apskaičiuota biožymenų diagnostinė vertė toje stadijoje, kurioje liga buvo aptikta. Visų genų atveju metilinimo lygis buvo reikšmingai aukštesnis nei AK (3.2 pav., A). Genus tiriant atskirai aukščiausia AUC pasižymėjo *TAC1* genas (AUC = 0,69, jautrumas – 72,22 %, specifiškumas – 61,96 %, $P < 0,001$) (3.2 pav., B). Geriausia diagnostinė vertė buvo matoma keturių genų rinkinio atveju – *ZNF677*, *PCDH8*, *TAC1* ir *FLRT2* (AUC = 0,74, jautrumas – 90,74 %, specifiškumas – 50 %, $P < 0,001$; 3.2 pav., C).



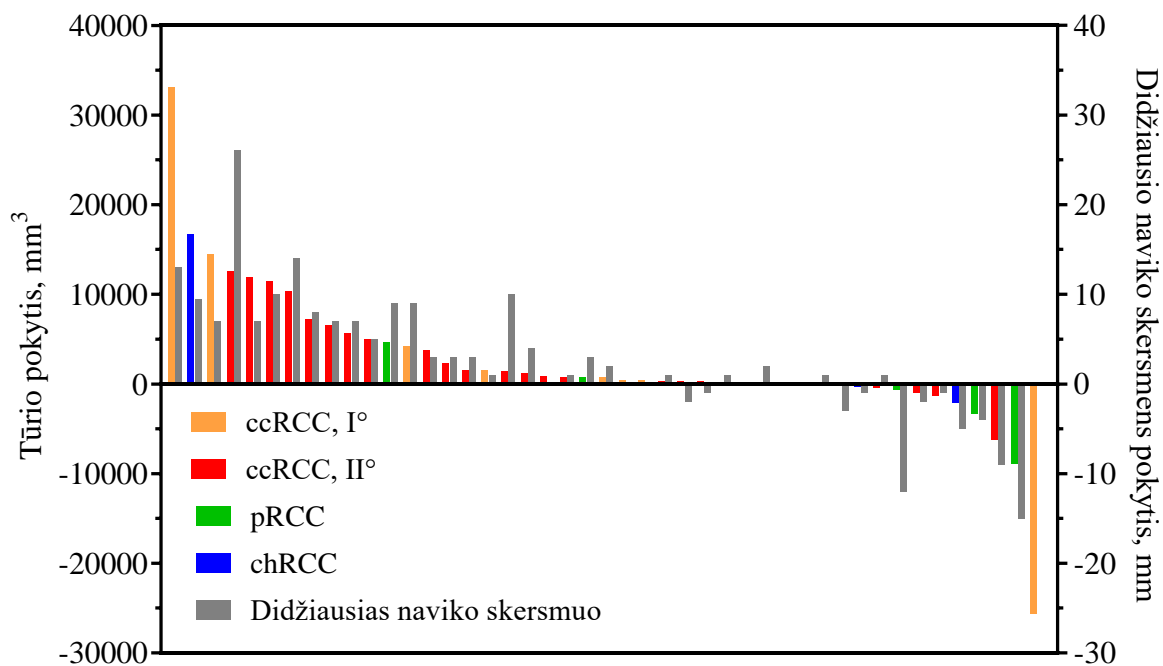
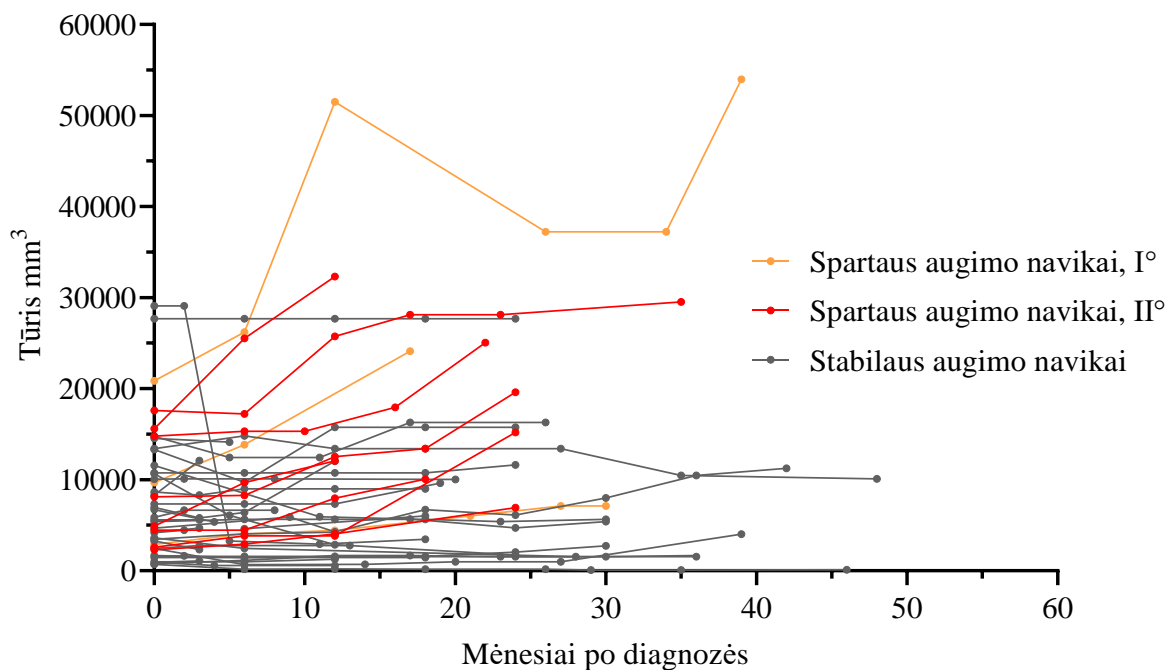
3.2 pav. Biožymenų diagnostinės vertės I etapo metu analizė. A – Genų biožymenų reguliacinių sričių DNR metilinimo lygis SRM ligonių ir AK šlapimo nuosėdose. B – pavienių genų, C – genų kombinacijų ROC (angl. *Receiver Operating Characteristic*) kreivių analizė, parodanti biožymenų diagnostinę vertę. AK – asimptotinė kontrolė; SRM – inkstų maži navikai; AUC – plotas po kreive (angl. *Area under the ROC Curve*); DJ – diagnostinis jautrumas; DS – diagnostinis specifiškumas. Reikšmingos P reikšmės (< 0,05) paryškintos.

3.2 Tirtų biožymenų sąsaja su naviko augimo dinamika

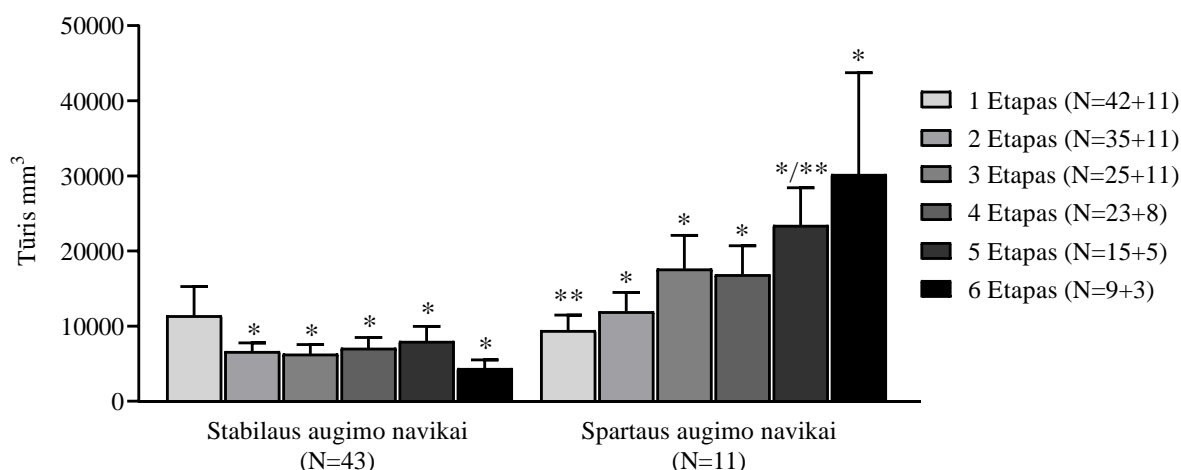
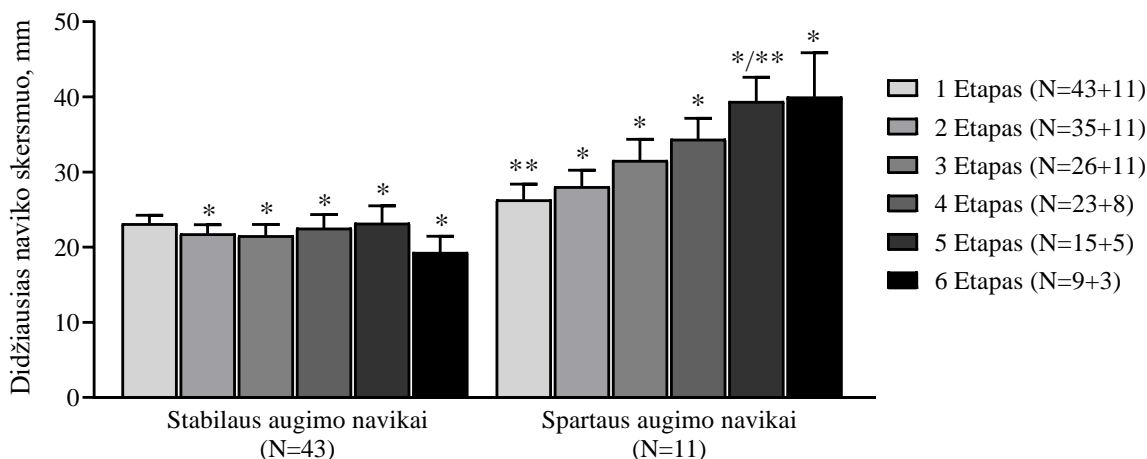
3.2.1 Naviko rodikliai skirtinguose tyrimo etapuose

Aktyvios stebėsenos metu ligoniams periodiškai paimti šlapimo nuosėdų mėginiai bei kai kurie kiti rodikliai buvo suskirstyti į etapus, priklausomai nuo mėginio paėmimo eilės. Naviko dydis šiuo metu yra vienas pagrindinių parametru, naudojamų navikų klasifikacijai ir naviko agresyvumui bei progresijos tikimybei įvertinti. Tyrimo eigoje naviko dydį apibūdina naviko tūrio ir didžiausio naviko skersmens parametrai. Šie skaičiavimai buvo atlikti dviejų radiologų. Visi čia ir toliau šiame skyriuje vaizduojami rezultatai buvo analizuojami pasitelkus antrojo radiologo skaičiavimus. Analogiški rezultatai, išanalizuoti pasitelkus pirmojo radiologo skaičiavimais, vaizduojami prieduose 5 – 11 paveiksluose. Navikai buvo suskirstyti pagal jų augimo greitį į stabilaus ir spartaus augimo navikus. Spartaus augimo buvo laikomi tokie navikai, kurių tūris per 12 mėnesių padvigubėjo arba kurių didžiausias skersmuo per aktyvios stebėsenos laikotarpį pasiekė >4 cm. Iš tirtų navikų 43 buvo stabilaus augimo ir 11 – spartaus, o sparčiai augančių navikų tarpe 3 buvo 1 WHO/ISUP laipsnio, likę – 2 WHO/ISUP laipsnio (3.3 pav., A; B). Tarp sparčiai augančių navikų didžioji dalis – 9 – buvo šviesių ląstelių histologijos, vienas papiliarinės ir vienas chromofobinės histologijos (3.3 pav., A). Aktyvios stebėsenos metu stabilaus augimo navikų tūrio vidutinis augimo greitis buvo 1,44 %/mėn., o spartaus augimo navikų tūrio vidutinis augimo greitis buvo žymiai didesnis – 9,37 %/mėn., ir statistškai patikimai skyrėsi nuo stabilų navikų tūrio augimo greičio ($P < 0,001$). Stabilaus augimo navikų vidutinis didžiausio skersmens augimo greitis (0,3 %/mėn.) taip pat buvo reikšmingai mažesnis nei spartaus augimo navikų vidutinis didžiausio skersmens augimo greitis (2,33 %/mėn.) ($P < 0,001$).

Toliau buvo analizuojamas naviko dydis skirtingų etapų metu. Stabilaus augimo navikų atveju jų tūris bei didžiausias skersmuo etapų bėgyje didelio pokyčio neparodė (3.3 pav., B; 3.4 pav.). O spartaus augimo navikų buvo stebimas stabilų abiejų šių parametru didėjimas (3.3 pav., B; 3.4 pav.). Visų, išskyrus pirmą (0 mėn.), etapų metu spartaus augimo navikai pasižymėjo reikšmingai didesniu naviko dydžiu, lyginant su stabilaus augimo navikais (3.4 pav.). Sparčiai augančių navikų dydžio skirtumas (lyginant su stabiliai augančiais) išryškėja jau nuo antro etapo, o sparčiai augančių navikų grupėje tūrio skirtumas tarp pirmo etapo ir sekančių etapų pastebimas tik 5 etape. Svarbu paminėti, kad 3.4 paveiksle vaizduojami tik pirmi šeši etapai, nes paskutiniai du etapai apėmė labai nedidelį mėginių skaičių. Prieduose 1 ir 2 paveiksluose vaizduojamas genų metilinimo kitimas ligos eigoje.

A**B**

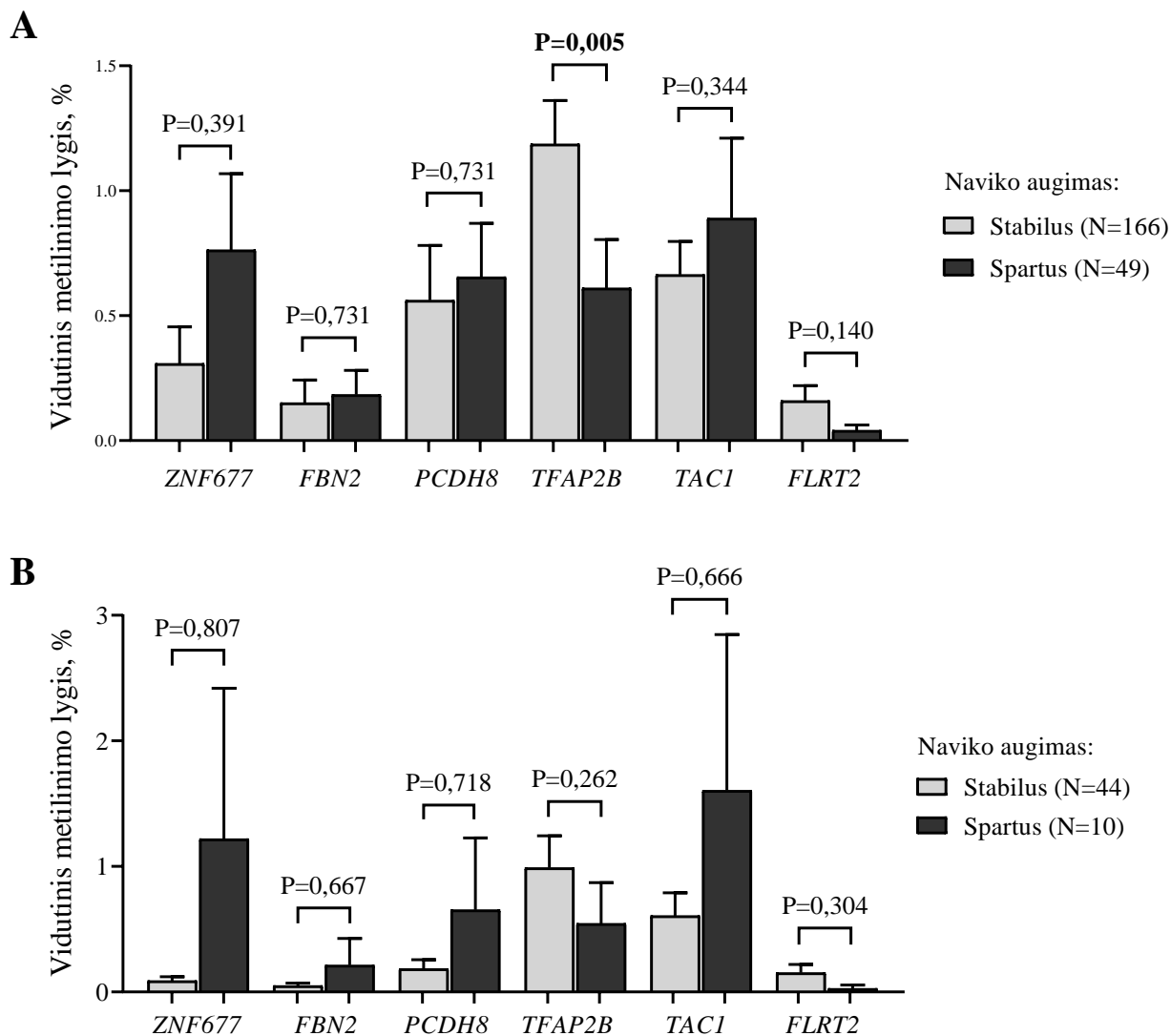
3.3 pav. SRM augimas aktyvios stebēsenos metu. A – kiekvieno pacienta naviko dydžio (naviko tūrio ir didžiausio skersmens) pokytis aktyvios stebēsenos metu. B – kiekvieno pacienta naviko tūris skirtinguose aktyvios stebēsenos laiko taškuose.

A**B**

3.4 pav. Inkstų mažų navikų dydžio pokyčiai aktyvios stebėsenos metu. A – vidutinis tūris skirtingų etapų metu, B – vidutinis didžiausias naviko skersmuo skirtingų etapų metu. * – nurodo statistiškai reikšmingą ($P < 0,05$) tūrio/didžiausio naviko skersmens skirtumą etapuose tarp stabiliai ir sparčiai augančių navikų, ** – nurodo statistiškai reikšmingą tūrio/didžiausio naviko skersmens skirtumą grupėje tarp pirmo ir sekančių etapų.

Touomet buvo sprendžiama, ar tirtų genų metilinimo lygis yra susijęs su nuo navikų augimo greičiu. Tiriant visų etapų metu paimtus mėginius buvo matoma, kad *TFAP2B* geno metilinimo lygis buvo reikšmingai didesnis stabilus augimo navikuose, lyginant su spartaus augimo navikais (3.5 pav., A) ($P = 0,005$). Kitų genų atveju statistiškai patikimų skirtumų rasta nebuvo. Tiriant tik diagnozės metu (I etapas, 0 mėn.) paimtus mėginius, nė vieno geno atveju reikšmingų skirtumų tarp šių dviejų grupių nebuvo (3.5 pav., B). Tačiau abejais atvejais, *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8* ir *TAC1* genų atveju yra matomas didesnis genų metilinimo lygis spartaus augimo navikus turinčių asmenų šlapimo mėginiuose, o šis skirtumas tampa dar ryškesnis analizuojant tik diagnozės metu paimtus

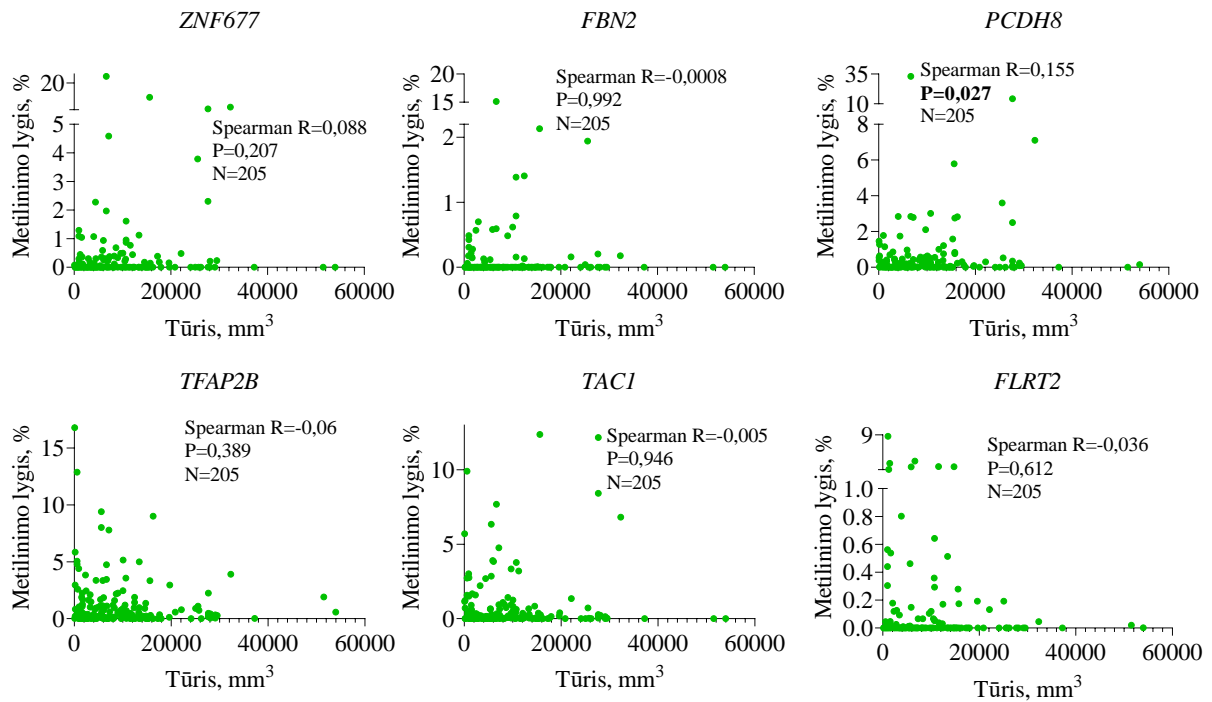
mėginius (3.5 pav., A; B). Galbūt esant didesnei imčiai būtų įmanoma aptikti ir statistiškai patikimus skirtumus.



3.5 pav. Genų metilinimo lygio sąsaja su navikų augimo greičiu. A – tirtų genų vidutinis metilinimo lygis stabiliai ir sparčiai augančiuose navikuose viso tyrimo metu. B – tirtų genų vidutinis metilinimo lygis stabiliai ir sparčiai augančiuose navikuose diagnozės metu. Reikšmingos P reikšmės paryškintos.

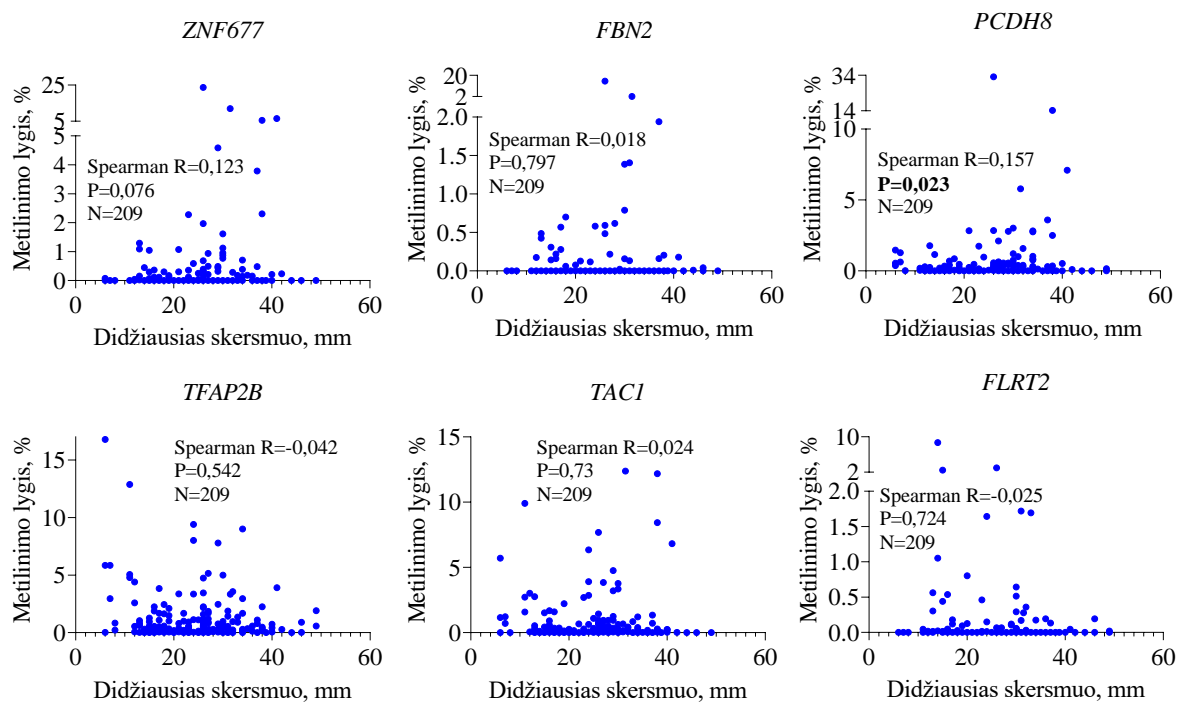
3.2.2 Tirtų biožymenų sąsaja su naviko dydžiu

Toliau buvo analizuojama genų metilinimo lygio sąsaja su naviko dydį apibūdinančiais parametrais – tūriu bei didžiausiu skersmeniu. Analizuojant genų metilinimo lygio sąsaja su naviko tūriu, *PCDH8* geno atveju buvo pastebėta reikšminga teigiama koreliacija ($R = 0,155$, $P = 0,027$) (3.6 pav.). Kitų genų atveju statistiškai patikima koreliacija tarp geno metilinimo lygio ir naviko tūrio pastebėta nebuvo.



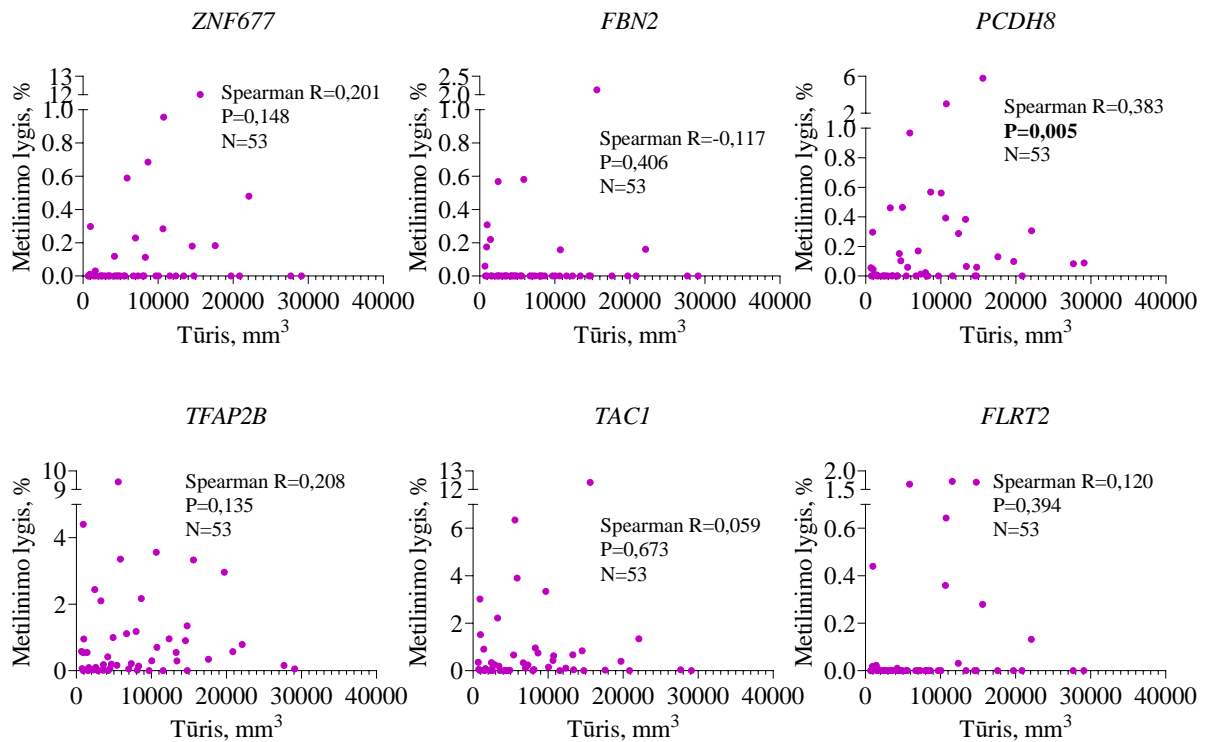
3.6 pav. Tirtų genų metilinimo lygio sąsajos su naviko tūriu analizė. Reikšmingos P reikšmės paryškintos.

PCDH8 geno metilinimo lygis taip pat reikšmingai teigiamai koreliavo su kitu naviko dydį apibūdinančiu parametru – didžiausiu naviko skersmeniu ($R = 0,157$, $P = 0,023$) (3.7 pav.). Kitų genų atveju statistškai patikima koreliacija tarp geno metilinimo lygio ir didžiausio naviko skersmens nepastebėta, tačiau *ZNF677* geno atveju buvo matomas ribinis patikimumas ($R = 0,123$, $P = 0,076$).

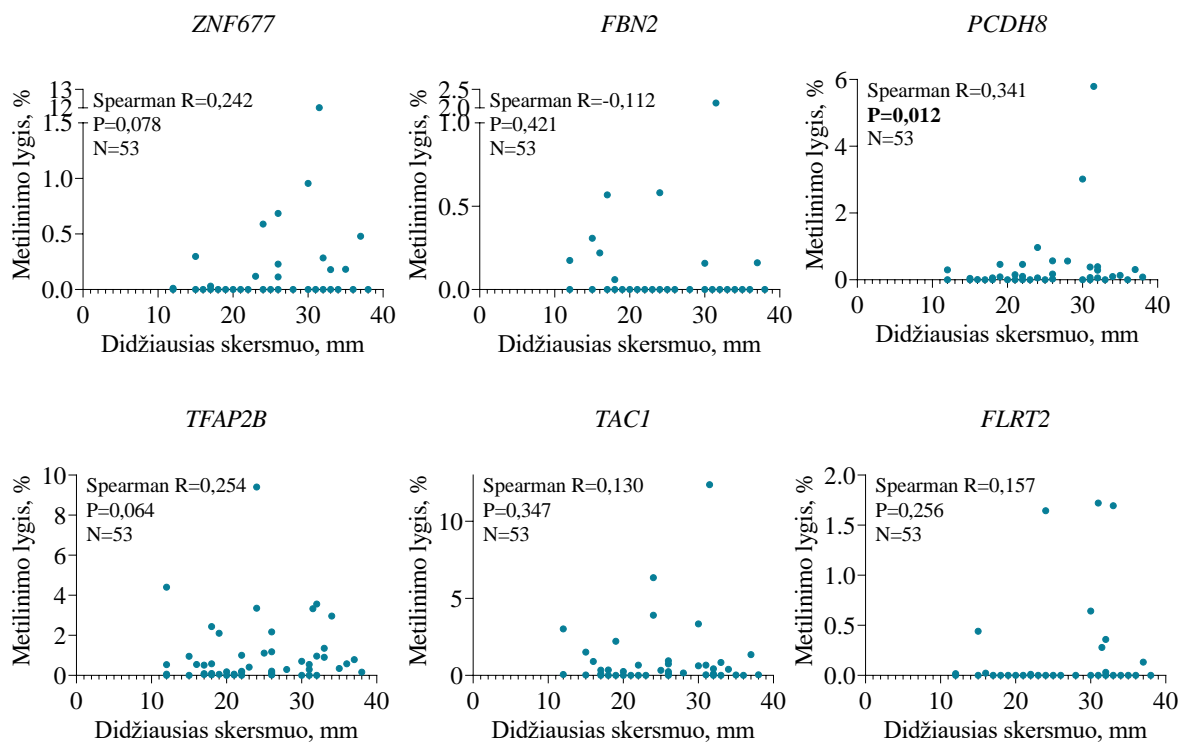


3.7 pav. Metilinimo lygio koreliacijos su didžiausiu naviko skersmeniu analizė. Reikšmingos P reikšmės paryškintos.

Tirtų genų metilinimo lygio sąsaja su naviko dydžiu taip pat buvo atskirai tiriama diagnozės metu paimituose mėginiuose. Vėlgį *PCDH8* geno metilinimo lygis teigiamai koreliavo su naviko tūriu ir didžiausiu naviko skersmeniu (3.8; 3.9 pav.). Remiantis pirmo radiologo duomenimis taip pat buvo pastebėta teigiama sąsaja tarp *TFAP2B* geno metilinimo lygio ir naviko tūrio bei didžiausio naviko skersmens diagnozės metu (priedai, 8 ir 9 pav.), tačiau atliekant analizę pasinaudojus antro radiologo duomenimis tokios sąsajos rasti nepavyko.



3.8 pav. Metilinimo lygio sąsajos su naviko tūriu diagnozės metu analizė. Reikšmingos P reikšmės paryškintos.



3.9 pav. Metilinimo lygio sąsajos su didžiausiu naviko skersmeniu diagnozės metu analizė. Reikšmingos P reikšmės paryškintos.

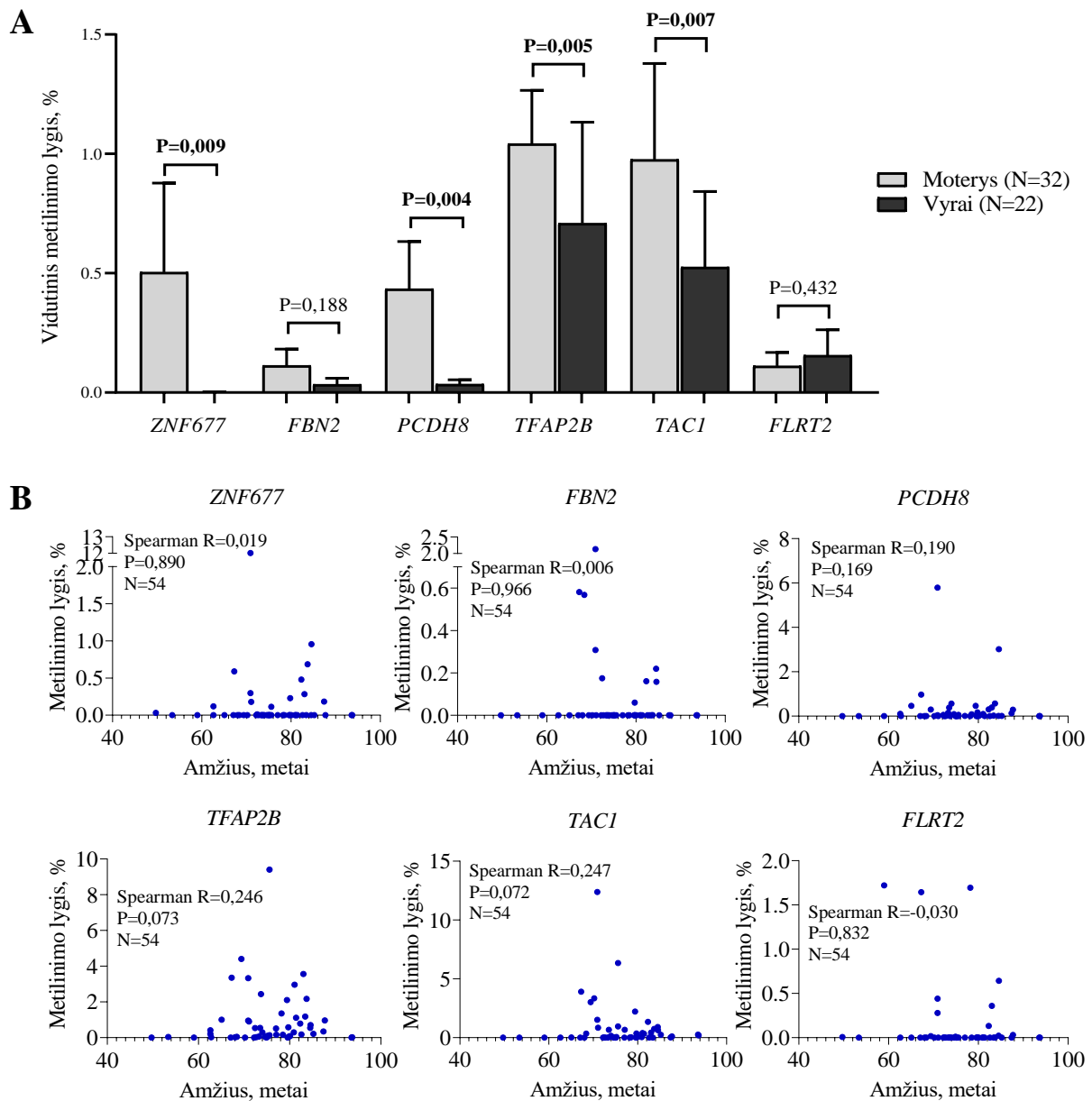
Toliau buvo analizuojama sąsaja tarp tirtų genų metilinimo ir naviko dydžio skirtingo augimo greičio navikų grupėse. Buvo aptikta statistiškai patikima teigiama sąsaja tarp *PCDH8* geno metilinimo lygio ir naviko tūrio bei didžiausio naviko skersmens stabilaus augimo navikų grupėje (priedai, 12 pav., A; 13 pav., A). Spartaus augimo navikų grupėje sąsajų tarp naviko dydį apibūdinančių parametrų ir tirtų genų metilinimo lygio neaptikta (priedai, 12 pav., B; 13 pav., B). Įvertinus genų reguliacinių sričių metilinimo lygio koreliacijas su naviko tūriu individualiuose ligoniuose skirtinguose aktyvios stebėsenos etapuose, kai kurių ligonių atveju galima buvo matyti kaip tirtų genų metilinimo lygis atspindėjo naviko tūrį (priedai, 14 – 16 pav.). Tačiau daugeliu atveju analizuojant tokias koreliacijas tirtų genų metilinimo lygis tik iš dalies atspindėjo naviko tūrį.

3.3 Tirtų genų metilinimo lygio sąsajos su demografiniais ir klinikiniais-patologiniais pacientų rodikliais

Siekiant įvertinti tiriamų biožymenų prognostinę vertę toliau buvo vertinama genų metilinimo lygio sąsaja su įvairiais demografiniais bei klinikiniais-patologiniais rodikliais. Analizuojant demografinių ir kai kurių klinikinių rodiklių sąsają su tirtų genų metiliniu buvo neįtraukiami pakartotinai iš to paties ligonio paimti mėginiai. Prieduose 3 ir 4 paveiksluose vaizduojama analizė apimanti visus tirtus mėginius.

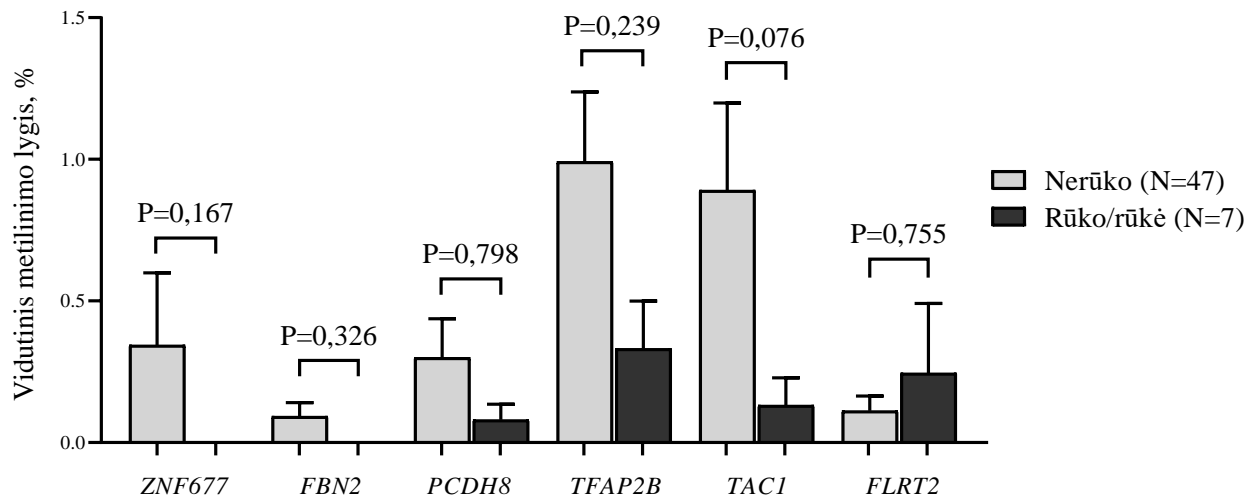
3.3.1 Genų metilinimo lygio sąsaja su demografiniais rodikliais

Pirmasis iš demografinių rodiklių, kurių sąsaja su tirtų genų metilinimo lygiu buvo tirta – lytis. Genų metilinimo lygis reikšmingai skyrėsi tarp lyčių *ZNF677*, *PCDH8*, *TFAP2B* ir *TAC1* genų atveju (3.10 pav., A). Visų šių genų atveju moterų tarpe buvo matomas aukštesnis metilinimo lygis lyginant su vyrais. Vienintelis genas, kurio atveju vyrų tarpe buvo matomas aukštesnis metilinimas – *FLRT2*, tačiau jo metilinimas statistiškai reikšmingai tarp lyčių nesiskyrė. Nė vieno geno atveju nenustatyta reikšminga koreliacija tarp metilinimo lygio ir ligonių amžiaus diagnozės metu (3.10 pav., B).



3.10 pav. Genų metilinimo lygio sąsajos su demografiniais rodikliais. A – genų metilinimo lygis tarp skirtingų lyčių. B – genų metilinimo lygio koreliacija su ligonių amžiumi diagnozės metu. Reikšmingos P reikšmės paryškintos.

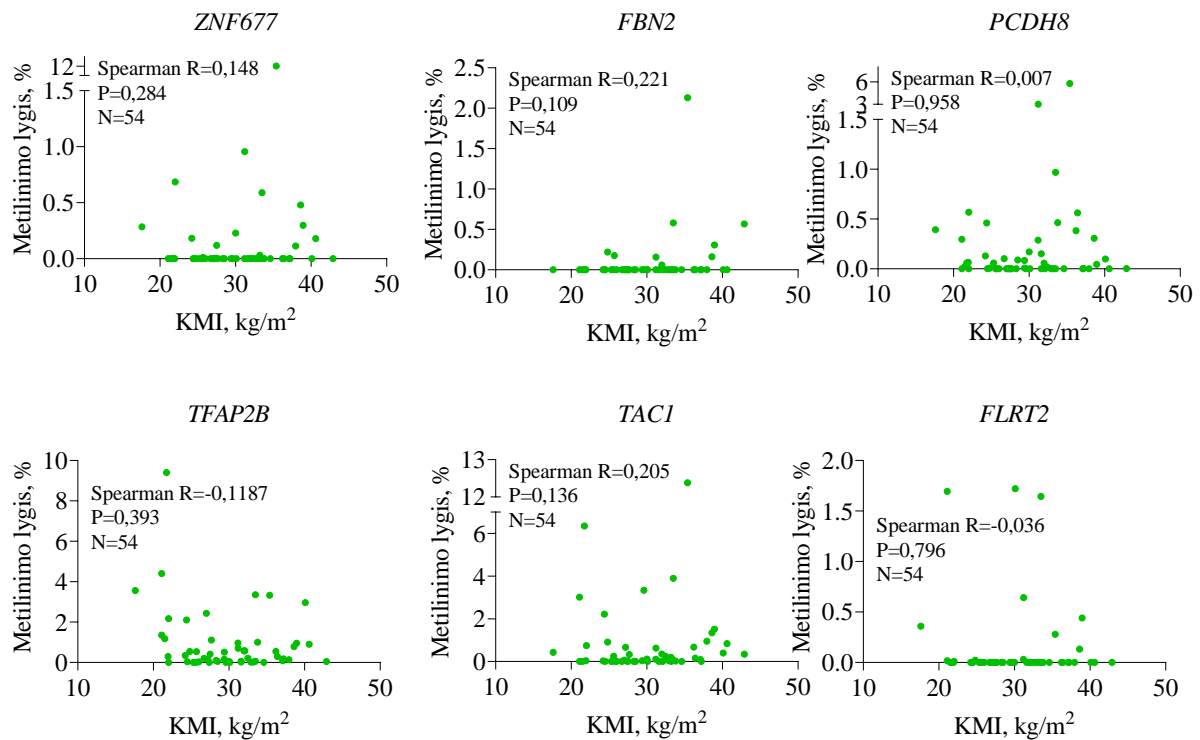
Rūkymas yra siejamas su padidėjusia rizika susirgti inkstų vėžiu bei prastesne ligonių prognoze, taigi toliau buvo analizuojama tirtų biožymenų metilinimo lygio sąsaja su pacientų rūkymo statusu. Anksčiau rūkusių bei mėginio paėmimo metu rūkančių asmenų mėginiai buvo apjungti ir palyginti su nerūkančių asmenų mėginiais. Nė vieno geno atveju statistiškai patikimi skirtumai tarp rūkančių ar anksčiau rūkusių ir nerūkančių asmenų metilinimo lygio neaptikti (3.11 pav.).



3.11 pav. Genų metilinimo lygio skirtumai tarp nerūkančių ir rūkančių ar anksčiau rūkusių pacientų.

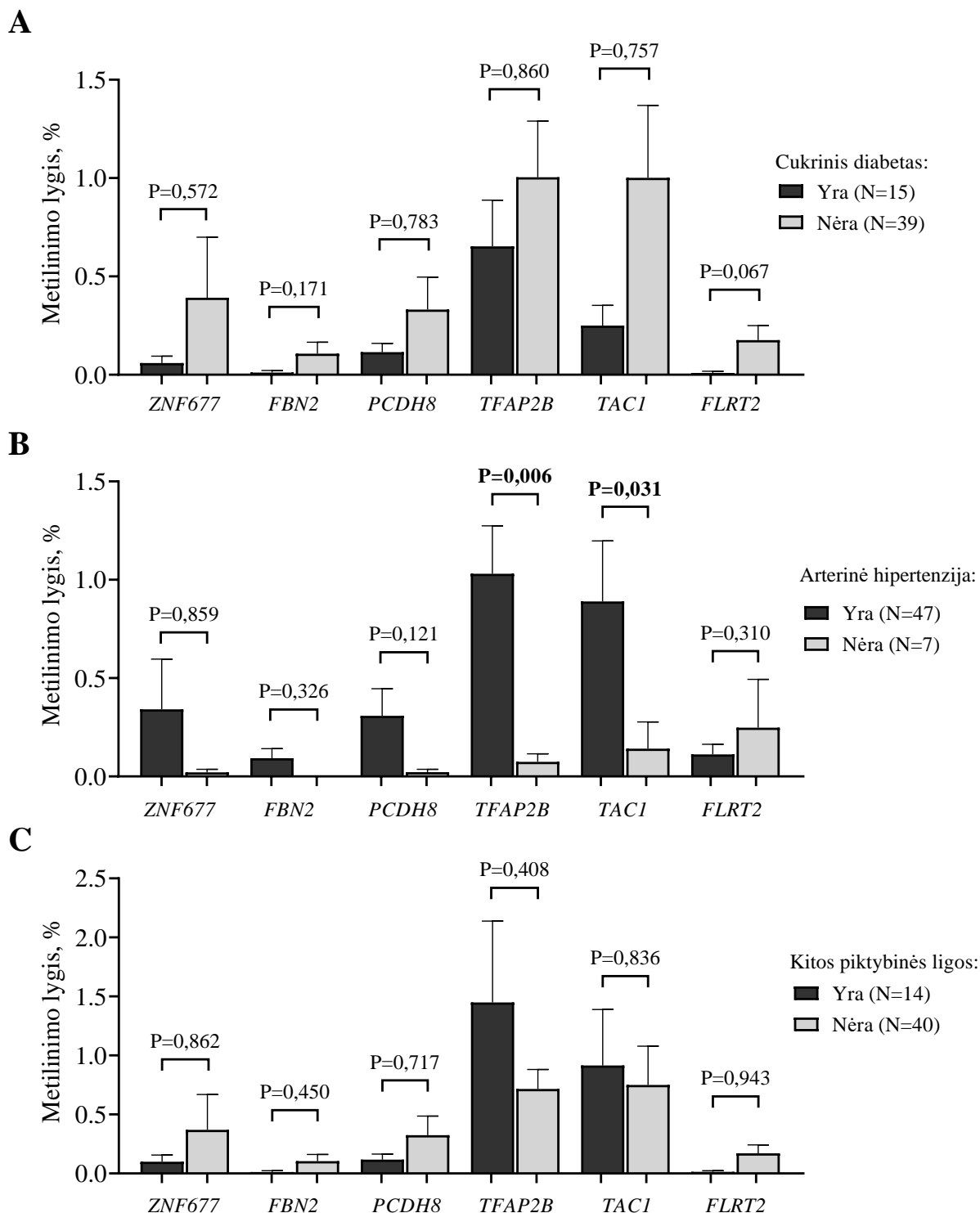
3.3.2 Genų metilinimo lygio sąsaja su klinikiniais–patologiniais rodikliais

Toliau tiriant šių biožymenų prognostinę vertę buvo analizuojama genų metilinimo lygio koreliacija su įvairiais klinikiniais rodikliais. Vienas iš tokių rodiklių – kūno masės indeksas (KMI), kuris yra siejamas su padidėjusia rizika sirgti įvairiomis ligomis, tarp jų ir RCC, bei su prastesne šios ligos prognoze. Išanalizavus genų metilinimo lygio sąsają su KMI paaiškėjo, kad visų genų atveju reikšmingų korelacijų tarp metilinimo lygio ir KMI nebuvo (3.12 pav., B).



3.12 pav. Genų metilinimo lygio sąsaja su kūno masės indeksu (KMI).

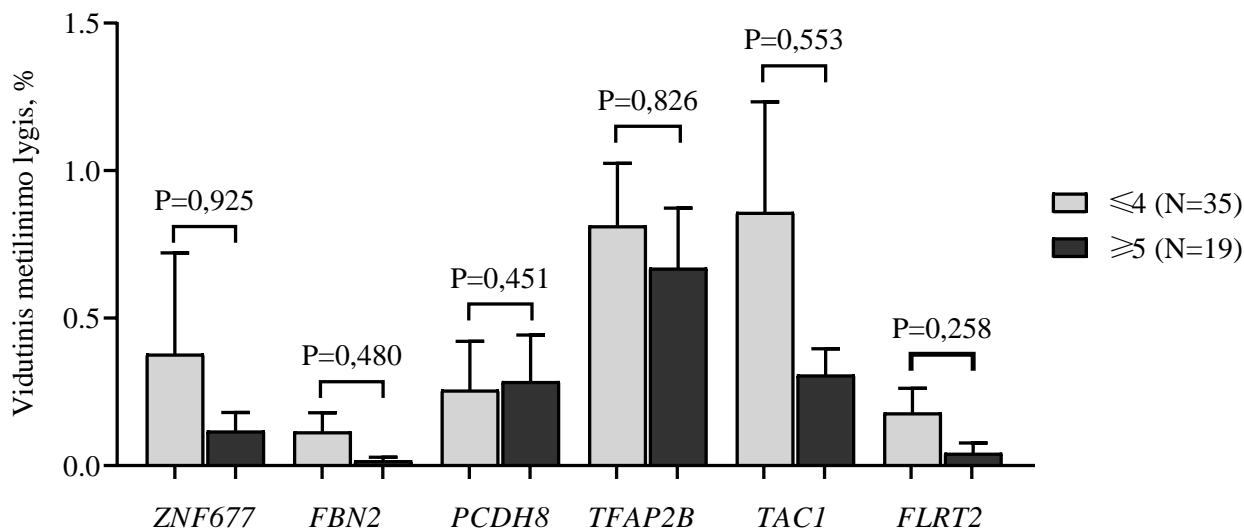
Vienas iš inkstų vėžio rizikos faktorių – įvairios gretutinės ligos, kurios ne tik didina riziką sirgti šia liga, bet ir yra siejamos su prastesne gyvenimo kokybe ir trumpesniu išgyvenamumu. Buvo tikrinama genų metilinimo lygio priklausomybė nuo sergamumo cukriniu diabetu, arterine hipertenzija, kitomis (dabartinėmis ar anksčiau buvusiomis) piktybinėmis ligomis. Nė vieno geno atveju nebuvo rasta reikšmingų skirtumų tarp metilinimo lygio cukriniu diabetu sergančiuose ir nesergančiuose ligoniuose (3.13 pav., A). Arterinę hipertenziją turinčių ligonių tarpe *TFAP2B* ir *TAC1* genų metilinimo lygis buvo statistiškai patikimai aukštesnis lyginant su šia liga nesergančių ligonių (3.13 pav., B). Kitomis (dabartinėmis ar anksčiau buvusiomis) piktybinėmis ligomis sergančių asmenų tarpe nė vieno geno metilinimo lygis statistiškai patikimai nesiskyrė nuo tokių ligų neturinčių asmenų (3.13 pav., C).



3.13 pav. Genų metilinimo lygio sąsaja su klinikiniais rodikliais. Genų metilinimo lygio analizė tarp ligonių sergančių ir nesergančių įvairiomis ligomis: A – cukriniu diabetu, B – arterine hipertenzija, C – kitomis (dabartinėmis ar anksčiau buvusiomis) piktybinėmis ligomis. Reikšmingos P reikšmės paryškintos.

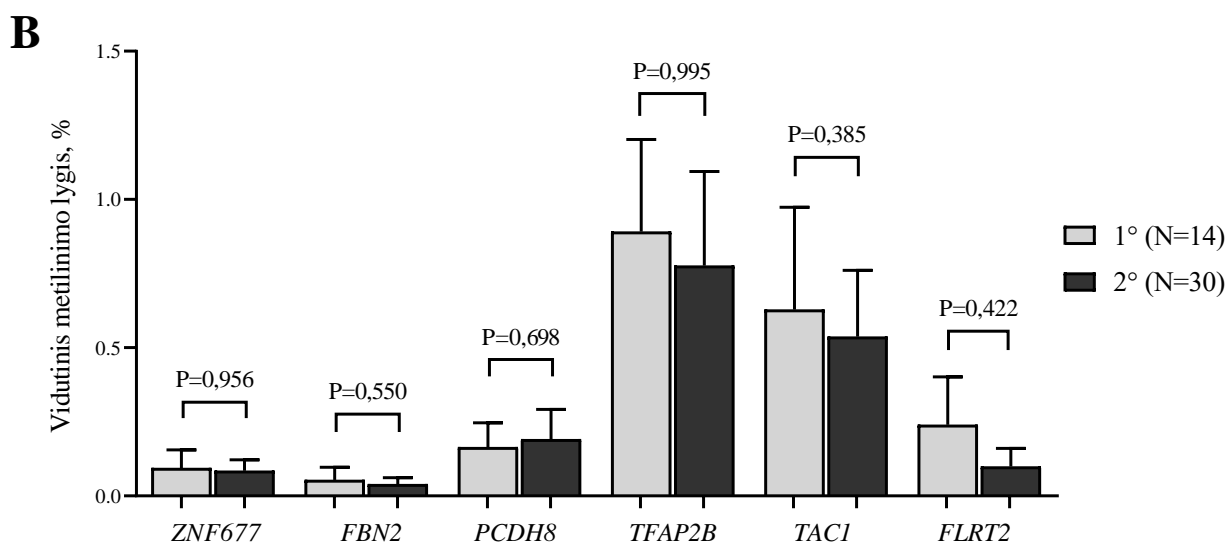
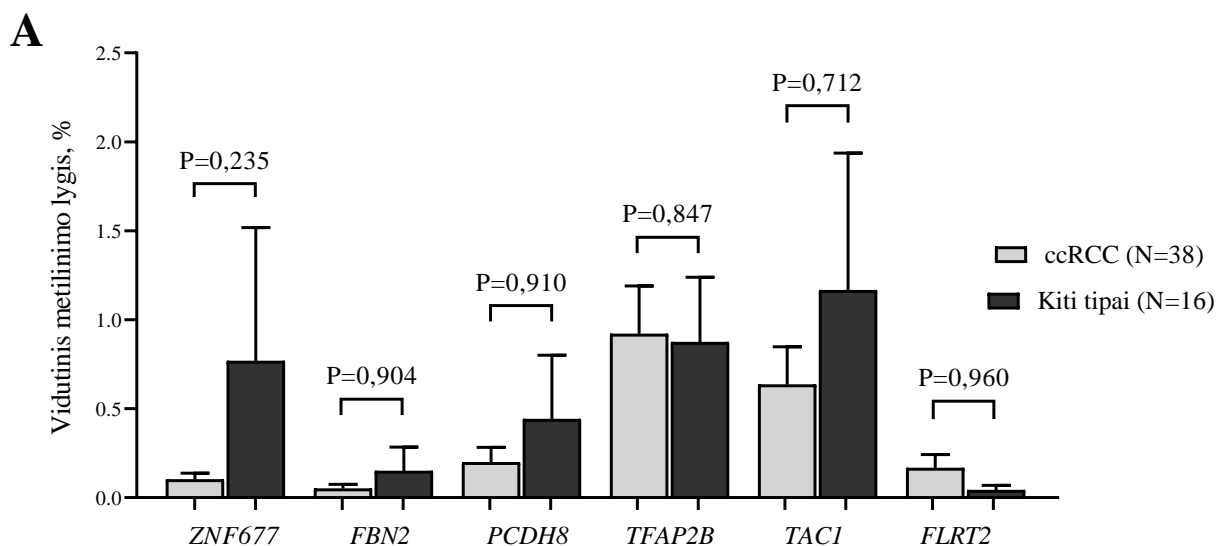
Toliau buvo ieškoma sąsajų tarp visų tirtų genų metilinimo lygio ir Charlson'o gretutinių ligų indekso (angl. *Charlson's Comorbidity Index (CCI)*) indekso. Mėginiai buvo suskirstyti į dvi grupes

pagal CCI – ≤ 4 ir ≥ 5 . Tarp šių dviejų grupių nė vieno geno atveju reikšmingų metilinimo lygio skirtumų rasta nebuvo (3.14 pav.)



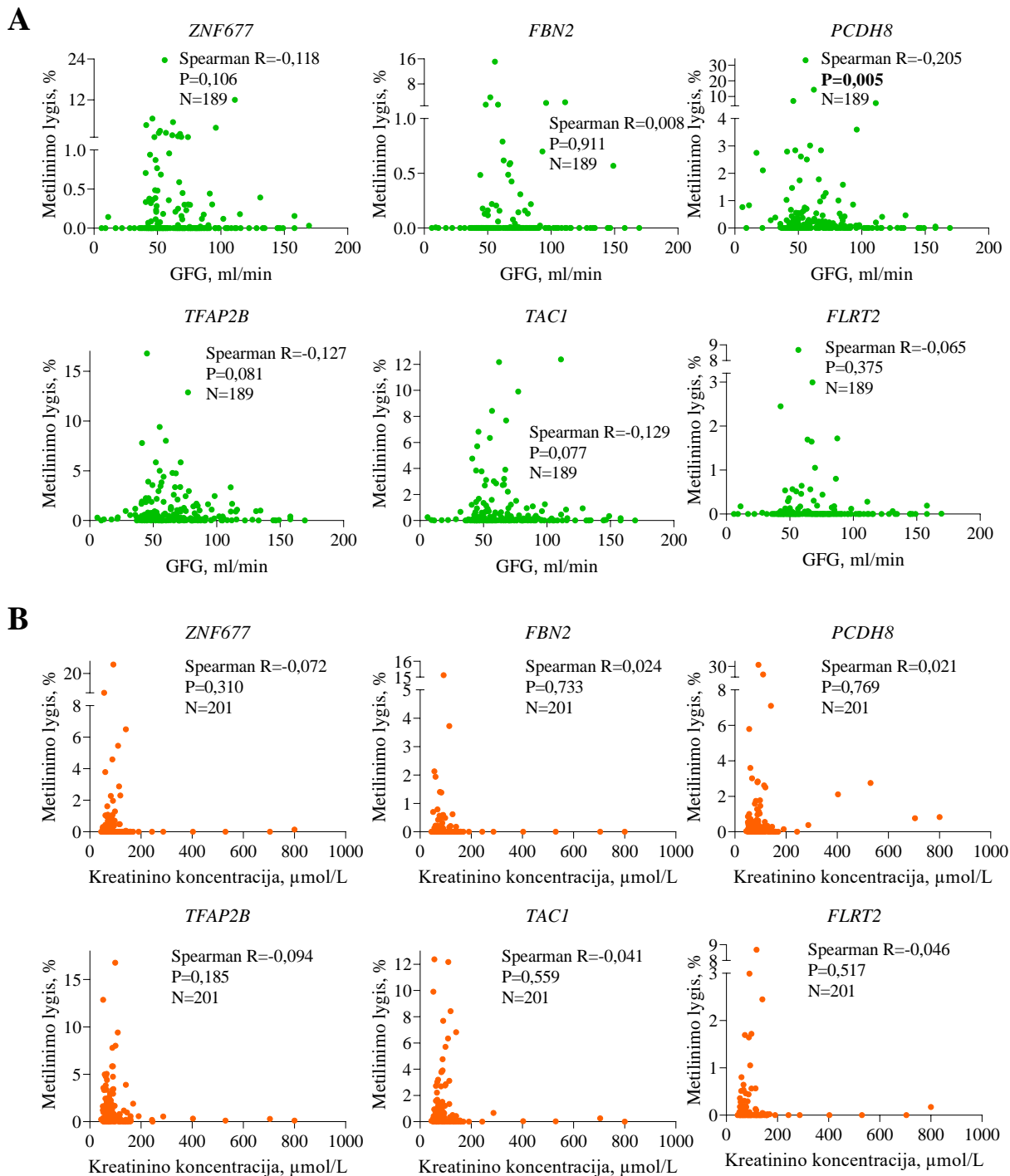
3.14 pav. Genų metilinimo lygio priklausomybė nuo Charlson‘o gretutinių ligų indekso (angl. *Charlson‘s comorbidity index (CCI)*). Genų metilinimo lygis vaizduojamas grupėse, suskirstytose pagal CCI – ≤ 4 ir ≥ 5 .

Naviko agresyvumą bei progresavimo riziką galima prognozuoti pagal daug parametru, vieni iš jų – RCC potipis ir WHO/ISUP laipsnis – kurių galima sąsaja su tiriamų genų metilinimo lygiu ir buvo analizuojama toliau. Šviesių ląstelių RCC (ccRCC), kaip dažniausiai pasitaikantis RCC potipis, apėmė didžiąją dalį tirtų mėginių, o kiti potipiai – chromofobinis ir papiliarinis – buvo apjungti į vieną grupę. Lyginant ccRCC su kitais RCC potipiais tirtų genų metilinimo lygiai nesiskyrė tarp šių dviejų grupių (3.15 pav., A). Tarp pirmo ir antro naviko WHO/ISUP laipsnio tirtų genų metilinimo lygiai statistiškai reikšmingai nesiskyrė (3.15 pav., B).



3.15 pav. Genų metilinimo lygio sąsaja su klinikiniais rodikliais. A – Genų metilinimo lygio palyginimas tarp šviesių ląstelių RCC (ccRCC) potipio ir kitų potipių. B – Genų metilinimo lygio skirtumai tarp pirmo ir antro ISUP (angl. *International Society of Urologic Pathologists*) laipsnio.

Taip pat buvo analizuojama genų metilinimo koreliacija su inkstų funkcijas apibūdinančiais parametrais – glomerulių filtracijos greičiu (GFG) ir kreatinino koncentracija kraujyje. Statistiškai patikima neigiama koreliacija buvo rasta tarp *PCDH8* geno metilinimo lygio ir glomerulių filtracijos greičio (GFG) ($R = -0,2053$, $P = 0,005$) (3.16 pav., A). Nė vieno iš tirtų genų metilinimo lygis su kreatinino koncentracija kraujyje reikšmingai nekoreliavo (3.16 pav., B).



3.16 pav. Genų metilinimo lygio koreliacijos su inkstų funkcijos rodikliais analizė. A – glomerulių filtracijos greičio (GFG) koreliacija su genų metilinimo lygiu, B – kreatinino koncentracijos kraujyje koreliacija su genų metilinimo lygiu. Reikšmingos P reikšmės ($< 0,05$) paryškintos.

Apibendrinant, buvo išanalizuoti genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* reguliacinių sričių DNR metilinimo lygiai SRM ligonių ir asimptomatių kontrolinių šlapimo nuosėdose, ir tiriami genai bei įvairios jų kombinacijos pasižymėjo gera diagnostine verte tiek tiriant viso aktyvios stebėsenos laikotarpio metu tiek diagnozės metu paimtus mėginius. Taip pat buvo tiriama šių biožymenų prognostinė vertė ir išanalizuota genų metilinimo lygio koreliacija su

įvairiais demografiniais ir klinikiniais rodikliais. Geno *PCDH8* metilinimo lygio koreliacija su naviko dydį apibūdinančiais parametrais parodo šio biožymens galimą pritaikomumą aktyviai SRM turinčių ligonių stebėsenai.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Inkstų ląstelių karcinoma – labiausiai paplitęs inkstų vėžio tipas, o sergamumas šia liga vis auga (Kabaria et al., 2016). Šis vėžys dėl besimptomės ligos eigos dažnai aptinkamas atsitiktinai, nors, kaip ir visose vėžio formose ankstyvas ligos (angl. *Small renal mass (SRM)*) aptikimas yra labai svarbus norint užkirsti kelią tolimesniam vėžio plitimui (Vasudev et al., 2020). Inkstų mažų navikų aptikimas yra dar sudėtingesnis dėl nedidelio jų dydžio ir mažo diagnostikoje naudojamų metodų jautrumo. Be to dabartiniai diagnostikoje naudojami vaizdavimo metodai neatskiria gerybinių bei piktybinių navikų ir pasitaiko atvejų kuomet pašalinamas pavojaus nekeliantis gerybinis navikas ir, kartu su juo, dalis ar visas inkstas (Chenam & Lau, 2018b). Nefrektomija turi daug komplikacijų, kurios ypatingai dažnai pasireiškia ligoniams su gretutinėmis ligomis ar vyresnio amžiaus ligoniams, kuriems SRM dažniausiai ir diagnozuojami. Tokiems ligoniams aktyvi stebėseną galėtų tapti saugesne ir naudingesne SRM gydymo strategija, o ligos eigoje praverstų biožymenys, kurie puikiai papildytų dabartinės šių navikų diagnozės strategijas, ypač ankstyvoje ligos stadijoje, be to praverstų prognostikoje.

DNR metilinimo pokyčiai – vieni anksčiausių inkstų kancerogenezės metu, dėl to gali būti naudojami ankstyvai šios ligos diagnostikai (Arai & Kanai, 2010). Inkstų vėžio vystymosi metu vykstantys DNR metilinimo pokyčiai taip pat gali būti aptinkami iš šlapimo nuosėdų išskirtoje naviko DNR (Locke et al., 2019a). Šlapimo mėginio paėmimas yra labai paprastas, pigus ir neinvazyvus procesas, taigi leidžia dažną pakartotiną mėginių paėmimą. Šlapime aptinkama naviko DNR taip pat atsižvelgia į naviko heterogeniškumą, ko biopsijos paprastai nedaro. Taigi DNR metilinimo biožymenys yra labai tinkami ne tik ankstyvai inkstų vėžio diagnozei bet ir ligos progresijai bei atsakui į gydymą stebėti.

Ankstesniuose tyrimuose buvo atlikta viso genomo metilintos DNR audiniuose ir atrinktų genų reguliacinių sričių metilinimo šlapimo mėginiuose analizė ir atrinkti genai, kurių reguliacinėse srityse įvykę metilinimo pokyčiai galėtų būti naudojami kaip biožymenys (Kubiliūtė et al., 2022).

Darbe nustatytas reikšmingai aukštesnis visų tirtų genų metilinimo lygis SRM ligonių šlapimo nuosėdose, lyginant su sveikų asmenų mėginiais, kas parodo jų diagnostinį potencialą. Pavienių žymenų jautrumas svyravo nuo 19,16 iki 72,90 %. Geriausia diagnostine verte pasižymėjo genas *PCDH8* (AUC – 0,69, jautrumas – 49,53 %, specifiškumas – 88,04 %). Didesne nei pavienių genų diagnostine verte pasižymėjo biožymenų kombinacijos, geriausia iš jų – *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TAC1* ir *FLRT2* kombinacija (AUC = 0,75, jautrumas – 65,89 %, specifiškumas – 73,91 %). Inkstų vėžio atveju ankstyva diagnozė yra ypatingai svarbi, tačiau ji dažnai apsunkinama besimptomės ligos eigos, taigi pavienių genų ir jų kombinacijų diagnostinė vertė taip pat buvo tirta išskirtinai pirmame tyrimo etape, diagnozės metu. Šiuo atveju geriausia diagnostine verte pasižymėjo *TAC1*

genas (AUC = 0,69, jautrumas – 72,22 %, specifiškumas – 61,96 %) bei genų *ZNF677*, *PCDH8*, *TAC1* ir *FLRT2* kombinacija (AUC = 0,74, jautrumas – 90,74 %, specifiškumas – 50 %). Didelė šių genų diagnostinė vertė pirmame tyrimo etape parodo jų pritaikomumą ankstyvam SRM aptikimui, o tai pagelbėtų užkirsti kelią tolimesniai vėžio vystymuisi bei plitimui. Nors keli tyrimai aprašė inkstų vėžio biožymenis su aukštesnėmis AUC, jautrumo ar specifiškumo vertėmis, nedaugelis jų ištyrė pakankamai didelę imtį, o tyrimų, kurie fokusavosi ties SRM, yra dar mažiau. Viename iš jų buvo aprašytos 9 miRNR, kurių kiekis buvo aukštesnis ccRCC potipio SRM sergančių ligonių šlapime lyginant su inkstų onkocitoma – gerybinę naviką turinčių ligonių mėginiais, ir visų miRNR atveju buvo matoma mažesnė AUC reikšmė negu rasta šiame tyrime (Di Meo et al., 2020). Taip pat buvo rasti 6 baltymai, kurių ekspresija ccRCC potipio SRM ligonių šlapime buvo padidėjusi (Di Meo, Batruch, et al., 2020). Tačiau baltymais pagrįstų biožymenų tyrimai yra brangesni ir sudėtingesni nei DNR metilinimo biožymenų tyrimai, o miRNR biologinės funkcijos ir vaidmuo kancerogenezeje yra sudėtingi ir ne iki galo išaiškinti (Kubiliute & Jarmalaite, 2021). DNR taip pat yra stabili, o DNR metilinimo pokyčiai vyksta anksti RCC navikų vystymosi metu, taigi DNR metilinimo biožymenis yra labiau tinkami ankstyvai vėžio diagnozei, o DNR biožymenis laikomi tinkamesniais ligos progresijai aptikti ankstyvose stadijose, lyginant su baltymų biožymenimis (Duffy & Crown, 2022).

Navikus suskirsčius pagal augimą į sparčiai augančius ir stabiliai augančius, buvo pastebėtas reikšmingai aukštesnis *TFAP2B* metilinimo lygis stabiliai augančių navikų atveju, lyginant su sparčiai augančiais navikais. Tai galbūt galima būtų paaiškinti šio geno dalyvavimu WNT/ β -katenino signalinio kelio aktyvavime, taip prisidedant prie ląstelių proliferacijos skatinimo (L. Wang et al., 2020). Šis biožymuo galėtų padėti atskirti stabiliai ir sparčiai augančius SRM, ir taip įvertinti jų tinkamumą aktyviai stebėsenai. Didėjantis atsitiktinai aptiktų SRM skaičius tapo didele problema dėl perdėtinio gydymo. Galimybė numatyti ligos eigą prieš pritaikant radikalų gydymą, kuris sukelia daug trumpalaikių ir ilgalaikių komplikacijų, gali sumažinti šią riziką. Sparčiai augančių navikų atveju geriausia gydymo strategija greičiausiai bus nefrektomija ar abliacija, tačiau stabiliai augantiems navikams pritaikius aktyvią stebėseną galima būtų išsaugoti inkstų funkciją bei išvengti operacijos sukiamų sunkumų.

Nuo lyties priklausomi metilinimo skirtumai specifiniuose genomo regionuose ar audiniuose galimai atsiranda dėl *SRY* geno buvimo, X chromosomos dozės bei lytinių hormonų (Lopes-Ramos et al., 2020). Sergant vėžiu taip pat stebimi tam tikri su lytimi susiję DNR metilinimo skirtumai, kurie gali apsunkinti DNR metilinimo biožymenų paiešką bei tyrimus. RCC atveju prognozės ar sergamumo skirtumai tarp lyčių gali atsirasti dėl genetinių, gyvenimo būdo, aplinkos ir epigenetinių veiksnių derinio (Dahlmann et al., 2023). Reikšmingai aukštesni *ZNF677*, *PCDH8*, *TFAP2B* ir

TAC1 genų metilinimo lygiai moteryse lyginant su vyrais gali būti paaiškinami bendrais visame genome esančiais metilinimo skirtumais tarp vyrų ir moterų. Tačiau lytis yra sunkiai įvertinamas faktorius, nes skirtumai tarp lyčių gali atsirasti ne tik dėl biologinės lyties, bet ir dėl socialinių bei demografinių faktorių, kurie gali labai stipriai varijuoti. Kad būtų išaiškinta šiame tyrime rasta asociacija reikalingi tolimesni tyrimai su didesniu kiekiu tiriamųjų.

PCDH8 geno metilinimo lygis koreliavo teigiamai su naviko dydį apibūdinančiais parametrais, taigi šis biožymuo galėtų būti naudojamas prognostikoje, siekiant įvertinti naviko augimą ir ligos eigą. *PCDH8* metilinimo aberacijos buvo pastebėtos ir kituose tyrimuose. ccRCC audiniuose šio geno metilinimo dažnis buvo reikšmingai didesnis lyginant su sveikais inkstų audiniais, be to koreliavo su pažengusia naviko stadija ir aukštesniu naviko laipsniu bei metastazėmis limfmazgiuose (Lin et al., 2014). Lin ir bendraautorių tyrime *PCDH8* metilinimo dažnis taip pat buvo siejamas su prastesniu išgyvenamumu bei progresavimu. Diagnozės metu, be *PCDH8* geno, vieno radiologo matavimo duomenimis *TFAP2B* geno metilinimo lygis diagnozės metu taip pat koreliavo su naviko dydį apibūdinančiais parametrais, demonstruodamas prognostinį potencialą, šalia diagnostinio.

Arterinės hipertenzijos įtaka inkstų vėžio kancerogenzei kol kas nėra pilnai suprantama, tačiau ne viename tyrime buvo aprašyta šios ligos sąsaja su didesniu sergamumu inkstų vėžiu. Šiame darbe buvo aptiktas didesnis *TFAP2B* ir *TAC1* genų metilinimo lygis arterinę hipertenziją turinčių SRM ligonių atveju. *TFAP2B* genas yra svarbus inkstų vystymesi bei ląstelių augimo ir diferenciacijos procesuose (Zhu et al., 2020), taigi jo reguliacinių sričių hipermetilinimas galimai siejasi su prastesne inkstų funkcija ir prognoze SRM pacientuose. Taip pat antihipertenziniai vaistai buvo įvardinti kaip kancerogeniški inkstams ir siejami su didesniu sergamumu RCC (Ba et al., 2022), todėl jų vartojimas gali būti susijęs su prastesne prognoze RCC atveju, o aukštesnis *TFAP2B* ir *TAC1* metilinimo lygis atspindi tokią būseną.

Glomerulių filtracijos greitis (GFG) nurodo greitį, kuriuo kraujas filtruojamas glomerulėse, ir yra pagrindinis rodiklis, atspindintis inkstų funkciją (Kaufman et al., 2023). RCC ligoniuose matoma sumažėusi inkstų funkcija, ypatingai pažengusiose ligos stadijose, kuri dar labiau sumažėja dėl operacijos pašalinus visą ar dalį inksto (Z. Liu et al., 2020). Tyrime buvo aptikta neigiama koreliacija tarp *PCDH8* metilinimo lygio ir GFG, kas dar kartą parodo *PCDH8* geno, kaip prognostinio biožymens vertę.

Nors tirti genai parodė aukštą diagnostinę vertę bei buvo rastos sąsajos su kai kuriais demografiniais bei klinikiniais rodikliais, taip parodant jų prognostinę vertę, šiuos biožymenis taip pat reikalinga ištirti kitų navikų atveju, kad patvirtinti jų tinkamumą būtent šio vėžio atveju. Taip

pat, nors buvo iširta didelė imtis SRM ligonių, tikslesnei statistinei analizei įvykdyti ir apskritai tolimesniuose tyrimuose turėtų būti siekiama apimti kuo daugiau SRM ligonių. Be to norint tiksliai atskirti piktybiškus SRM nuo ne tik sveikų asmenų bet ir asmenų su gerybiniais navikais, būtų naudinga į tyrimą įtraukti gerybinių SRM atvejų.

Apbendrinus šis tyrimas pademonstravo *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* epigenetinių biožymenų galimybę aptikti SRM, tiriant šlapimo nuosėdas. Buvo rasta genų *TFAP2B*, *PCDH8* ir *TAC1* reguliacinių sričių metilinimo lygio sąsaja su kai kuriais klinikiniais-patologiniais rodikliais: naviko dydžiu, arterine hipertenzija bei glomerulių filtracijos greičiu, o tai parodė šių biožymenų prognostinę vertę ir jų potencialą papildyti aktyvios stebėsenos strategijas stebint ligos eigą.

Išvados

1. Genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* metilinimo lygis ligonių, kuriems diagnozuoti maži inkstų navikai, šlapimo nuosėdų mėginiuose yra reikšmingai didesnis lyginant su asimptomatine kontrole ($P < 0.050$);
2. Tarp pavienių genų, geriausia diagnostine verte pasižymi *TAC1* genas (AUC = 0,69, jautrumas – 72,22 %, specifiškumas – 61,96 %). Tarp genų kombinacijų, aukščiausia diagnostine verte pasižymi genų *ZNF677*, *PCDH8*, *TAC1* ir *FLRT2* rinkinys (AUC = 0,74, jautrumas – 90,74 %, specifiškumas – 50 %).
3. Geno *PCDH8* metilinimo lygis SRM pacientų šlapimo nuosėdose teigiamai koreliuoja su naviko dydžiu ($R_s \geq 0,383$; $P = 0,005$). Stabilaus augimo navikams būdingas reikšmingai didesnis *TFAP2B* geno reguliacinių sričių metilinimo lygis, lyginant su sparčiai augančiais navikais (1,187 % vs. 0,611 %; $P = 0,005$).
4. Tarp pacientų, kuriems diagnozuotas SRM, aukštesnis genų *ZNF677*, *PCDH8*, *TFAP2B* ir *TAC1* metilinimo lygis būdingas moterims, lyginant su vyrais ($P < 0,05$). Geno *PCDH8* reguliacinės srities metilinimo lygis neigiamai koreliuoja su glomerulių filtracijos greičiu ($R_s = -0,205$; $P = 0,005$), o *TFAP2B* ir *TAC1* genų reguliacinių sričių metilinimo lygis reikšmingai didesnis arterinę hipertenziją turinčių SRM ligonių atveju, lyginant su pacientais, kuriems arterinė hipertenzija nenustatyta.

Asmeninio indėlio aprašymas

Dalia Jurkėnaitė atliko visus eksperimentus su dalimi darbe analizuojamų mėginių (DNR skyrimas, bisulfitinė modifikacija, kiekybinė metilnimui jautri PGR), literatūros analizę, duomenų statistinę analizę ir vizualizavimą. Praktikos metu Dalia Jurkėnaitė ištyrė 81 šlapimo nuosėdų mėginį, tačiau dėl patikimesnės statistinės analizės buvo įtraukti ir anksčiau laboratorijoje ištirti mėginiai (N=134) bei asimptominė kontrolė (N=92).

Padėka

Šis darbas yra tęstinė tarptautinio Europos šalyse vykdomo projekto „Aktyviai stebimų inkstų navikų studija“ (Nr.: 158200-17-952-457) tyrimo dalis. Tyrimas dalinai finansuojamas projekto „Vėžio diagnostinių sistemų išvystymas“ (Intelektas. Bendri mokslo-verslo projektai. Nr. J05-LVPA-K-04-0029) bei Ateities Biomedicinos fondo projekto „Epigenetiniai biožymenys ankstyvai neinvazinei inkstų navikų diagnostikai ir personalizuoto gydymo parinkimui“. Prie tyrimo prisidėjo ir kiti žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje dirbantys kolegos: gydytojas Algirdas Žalimas, Kristina Žukauskaitė, Raimonda Kubiliūtė.

Nuoširdžiai dėkoju vadovei dr. Raimondai Kubiliūtei bei visiems prisidėjusiems prie vykdytų tyrimų už pagalbą, mėginių ir klinikinių duomenų rinkimą ir suteiktas žinias. Ačiū ir ligoniams už sutikimą dalyvauti moksliniuose tyrimuose.

Literatūros sąrašas

- Adams, K. F., Leitzmann, M. F., Albanes, D., Kipnis, V., Moore, S. C., Schatzkin, A., & Chow, W.-H. (2008). Body size and renal cell cancer incidence in a large US cohort study. *American Journal of Epidemiology*, *168*(3), 268–277. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn122>
- Akhtar, M., Al-Bozom, I. A., & Al Hussain, T. (2018). Molecular and Metabolic Basis of Clear Cell Carcinoma of the Kidney. *Advances in Anatomic Pathology*, *25*(3), 189–196. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000185>
- Alam, D. R., Patel, D. H. D., Osumah, D. T., Srivastava, D. A., Gorin, D. M. A., Johnson, D. M. H., Trock, D. B. J., Chang, D. P., Wagner, D. A. A., McKiernan, D. J. M., Allaf, D. M. E., & Pierorazio, D. P. M. (2019). Comparative Effectiveness of Management Options for Patients with Small Renal Masses: A Prospective Cohort Study. *BJU International*, *123*(1), 42. <https://doi.org/10.1111/bju.14490>
- Amin, M. B., Edge, S. B., Greene, F. L., Byrd, D. R., Brookland, R. K., Washington, M. K., Gershenwald, J. E., Compton, C. C., Sullivan, D. C., Jessup, J. M., Brierley, J. D., Gaspar, L. E., Schilsky, R. L., Balch, C. M., Winchester, D. P., Asare, E. A., Madera, M., Gress, D. M., & Meyer, L. R. (2016). *AJCC cancer staging manual*. Springer Cham.
- Ando, T., Tai-Nagara, I., Sugiura, Y., Kusumoto, D., Okabayashi, K., Kido, Y., Sato, K., Saya, H., Navankasattusas, S., Li, D. Y., Suematsu, M., Kitagawa, Y., Seiradake, E., Yamagishi, S., & Kubota, Y. (2022). Tumor-specific interendothelial adhesion mediated by FLRT2 facilitates cancer aggressiveness. *The Journal of Clinical Investigation*, *132*(6), e153626. <https://doi.org/10.1172/JCI153626>
- Arai, E., & Kanai, Y. (2010). Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *4*(1), 58–73.
- Ather, M. H., & Nazim, S. M. (2010). Impact of Charlson's comorbidity index on overall survival following tumor nephrectomy for renal cell carcinoma. *International Urology and Nephrology*, *42*(2), 299–303. <https://doi.org/10.1007/s11255-009-9636-8>
- Ba, Z., Xiao, Y., He, M., Liu, D., Wang, H., Liang, H., & Yuan, J. (2022). Risk Factors for the Comorbidity of Hypertension and Renal Cell Carcinoma in the Cardio-Oncologic Era and Treatment for Tumor-Induced Hypertension. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.810262>
- Bae, H., Kim, B., Lee, H., Lee, S., Kang, H.-S., & Kim, S. J. (2017). Epigenetically regulated Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2 (FLRT2) shows tumor suppressor activity in breast cancer cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 272. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00424-0>

- Ballard, B. D., & Guzman, N. (2022). Renal Mass. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567761/>
- Bergström, A., Hsieh, C. C., Lindblad, P., Lu, C. M., Cook, N. R., & Wolk, A. (2001). Obesity and renal cell cancer—A quantitative review. *British Journal of Cancer*, *85*(7), 984–990.
<https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.2040>
- Bhindi, B., Thompson, R. H., Lohse, C. M., Mason, R. J., Frank, I., Costello, B. A., Potretzke, A. M., Hartman, R. P., Potretzke, T. A., Boorjian, S. A., Cheville, J. C., & Leibovich, B. C. (2018). The Probability of Aggressive Versus Indolent Histology Based on Renal Tumor Size: Implications for Surveillance and Treatment. *European Urology*, *74*(4), 489–497.
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.06.003>
- Bridges, M. C., Daulagala, A. C., & Kourtidis, A. (2021). LNCcation: LncRNA localization and function. *The Journal of Cell Biology*, *220*(2), e202009045.
<https://doi.org/10.1083/jcb.202009045>
- Browning, L., Colling, R., & Verrill, C. (2021). WHO/ISUP grading of clear cell renal cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma; validation of grading on the digital pathology platform and perspectives on reproducibility of grade. *Diagnostic Pathology*, *16*(1), 75.
<https://doi.org/10.1186/s13000-021-01130-2>
- Bukavina, L., Bensalah, K., Bray, F., Carlo, M., Challacombe, B., Karam, J. A., Kassouf, W., Mitchell, T., Montironi, R., O'Brien, T., Panebianco, V., Scelo, G., Shuch, B., van Poppel, H., Blosser, C. D., & Psutka, S. P. (2022). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update. *European Urology*, *82*(5), 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2022.08.019>
- Burrini, R., Lhermitte, B., Cerantola, Y., Tawadros, T., Meuwly, J.-Y., Berthold, D., Jichlinski, P., & Valerio, M. (2016). The role of renal biopsy in small renal masses. *Canadian Urological Association Journal = Journal De l'Association Des Urologues Du Canada*, *10*(1–2), E28–33. <https://doi.org/10.5489/cuaj.3417>
- Büttner, F. A., Winter, S., Stühler, V., Rausch, S., Hennenlotter, J., Füssel, S., Zastrow, S., Meinhardt, M., Toma, M., Jerónimo, C., Henrique, R., Miranda-Gonçalves, V., Kröger, N., Ribback, S., Hartmann, A., Agaimy, A., Stöhr, C., Polifka, I., Fend, F., ... Schaeffeler, E. (2022). A novel molecular signature identifies mixed subtypes in renal cell carcinoma with poor prognosis and independent response to immunotherapy. *Genome Medicine*, *14*(1), 105.
<https://doi.org/10.1186/s13073-022-01105-y>
- Campbell, S., Uzzo, R. G., Allaf, M. E., Bass, E. B., Cadeddu, J. A., Chang, A., Clark, P. E., Davis, B. J., Derweesh, I. H., Giambaresi, L., Gervais, D. A., Hu, S. L., Lane, B. R., Leibovich, B. C., & Pierorazio, P. M. (2017). Renal Mass and Localized Renal Cancer: AUA Guideline. *The Journal of Urology*, *198*(3), 520–529. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.04.100>

- Cancer today*. (n.d.). Retrieved 20 March 2023, from <http://gco.iarc.fr/today/home>
- Capitanio, U., Bensalah, K., Bex, A., Boorjian, S. A., Bray, F., Coleman, J., Gore, J. L., Sun, M., Wood, C., & Russo, P. (2019). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European Urology*, 75(1), 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.036>
- Capitanio, U., & Montorsi, F. (2016). Renal cancer. *Lancet (London, England)*, 387(10021), 894–906. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00046-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00046-X)
- Chan, S. H., Chiang, J., & Ngeow, J. (2021). CDKN2A germline alterations and the relevance of genotype-phenotype associations in cancer predisposition. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 19(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13053-021-00178-x>
- Charlson, M. E., Carrozzino, D., Guidi, J., & Patierno, C. (2022). Charlson Comorbidity Index: A Critical Review of Clinimetric Properties. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 91(1), 8–35. <https://doi.org/10.1159/000521288>
- Chenam, A., & Lau, C. (2018). Management of Small Renal Masses. *Cancer Treatment and Research*, 175, 105–126. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93339-9_5
- Cheungpasitporn, W., Thongprayoon, C., O’Corragain, O. A., Edmonds, P. J., Ungprasert, P., Kittanamongkolchai, W., & Erickson, S. B. (2015). The risk of kidney cancer in patients with kidney stones: A systematic review and meta-analysis. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 108(3), 205–212. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcu195>
- Choueiri, T. K., Je, Y., & Cho, E. (2014). Analgesic use and the risk of kidney cancer: A meta-analysis of epidemiologic studies. *International Journal of Cancer*, 134(2), 384–396. <https://doi.org/10.1002/ijc.28093>
- Cimadamore, A., Cheng, L., Scarpelli, M., Massari, F., Mollica, V., Santoni, M., Lopez-Beltran, A., Montironi, R., & Moch, H. (2021). Towards a new WHO classification of renal cell tumor: What the clinician needs to know—a narrative review. *Translational Andrology and Urology*, 10(3), 1506–1520. <https://doi.org/10.21037/tau-20-1150>
- Colebatch, A. J., Dobrovic, A., & Cooper, W. A. (2019). TERT gene: Its function and dysregulation in cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 72(4), 281–284. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2018-205653>
- Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 15(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
- Dahlmann, S., Bressemer, K., Bashian, B., Ulas, S. T., Rattunde, M., Busch, F., Makowski, M. R., Ziegeler, K., & Adams, L. (2023). Sex Differences in Renal Cell Carcinoma: The Importance of Body Composition. *Annals of Surgical Oncology*, 30(2), 1269–1276. <https://doi.org/10.1245/s10434-022-12738-z>

- D'Avella, C., Abbosh, P., Pal, S. K., & Geynisman, D. M. (2020). Mutations in renal cell carcinoma. *Urologic Oncology*, 38(10), 763–773.
<https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.10.027>
- Delahunt, B., Eble, J. N., Egevad, L., & Samaratunga, H. (2019). Grading of renal cell carcinoma. *Histopathology*, 74(1), 4–17. <https://doi.org/10.1111/his.13735>
- Delahunt, B., Egevad, L., Samaratunga, H., Martignoni, G., Nacey, J. N., & Srigley, J. R. (2016). Gleason and Fuhrman no longer make the grade. *Histopathology*, 68(4), 475–481.
<https://doi.org/10.1111/his.12803>
- Di Meo, A., Batruch, I., Brown, M. D., Yang, C., Finelli, A., Jewett, M. A., Diamandis, E. P., & Yousef, G. M. (2020). Searching for prognostic biomarkers for small renal masses in the urinary proteome. *International Journal of Cancer*, 146(8), 2315–2325.
<https://doi.org/10.1002/ijc.32650>
- Di Meo, A., Brown, M. D., Finelli, A., Jewett, M. A. S., Diamandis, E. P., & Yousef, G. M. (2020). Prognostic urinary miRNAs for the assessment of small renal masses. *Clinical Biochemistry*, 75, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.10.002>
- Duffy, M. J., & Crown, J. (2022). Circulating Tumor DNA as a Biomarker for Monitoring Patients with Solid Cancers: Comparison with Standard Protein Biomarkers. *Clinical Chemistry*, 68(11), 1381–1390. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvac121>
- Ehrlich, M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 1(2), 239–259.
<https://doi.org/10.2217/epi.09.33>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., & Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 103, 356–387. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005>
- Frank, I., Blute, M. L., Cheville, J. C., Lohse, C. M., Weaver, A. L., & Zincke, H. (2003). Solid renal tumors: An analysis of pathological features related to tumor size. *The Journal of Urology*, 170(6 Pt 1), 2217–2220. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000095475.12515.5e>
- Gild, P., Eghdaie, B., & Kluth, L. A. (2017). Effect of obesity on bladder cancer and renal cell carcinoma incidence and survival. *Current Opinion in Urology*, 27(5), 409–414.
<https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000425>
- Gluba-Brzózka, A., Rysz, J., Ławiński, J., & Franczyk, B. (2022). Renal Cell Cancer and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3404.
<https://doi.org/10.3390/ijms23063404>
- Gontero, P., Joniau, S., Oderda, M., Ruutu, M., Van Poppel, H., Laguna, M. P., de la Rosette, J., & Kirkali, Z. (2013). Active surveillance for small renal tumors: Have clinical concerns been

- addressed so far? *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*, 20(4), 356–361. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2012.03227.x>
- Gossage, L., & Eisen, T. (2010). Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 7(5), 277–288. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.42>
- Gu, W., Wu, J., Liu, X., Zhang, H., Shi, G., Zhu, Y., & Ye, D. (2017). Early skeletal muscle loss during target therapy is a prognostic biomarker in metastatic renal cell carcinoma patients. *Scientific Reports*, 7, 7587. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07955-6>
- Guo, X., Song, C., Fang, L., Li, M., Yue, L., & Sun, Q. (2020). FLRT2 functions as Tumor Suppressor gene inactivated by promoter methylation in Colorectal Cancer. *Journal of Cancer*, 11(24), 7329–7338. <https://doi.org/10.7150/jca.47558>
- He, Z.-H., Qin, X.-H., Zhang, X.-L., Yi, J.-W., & Han, J.-Y. (2018). Long noncoding RNA GIHCG is a potential diagnostic and prognostic biomarker and therapeutic target for renal cell carcinoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(1), 46–54. https://doi.org/10.26355/eurrev_201801_14099
- Heinemann, F. G., Tolkach, Y., Deng, M., Schmidt, D., Perner, S., Kristiansen, G., Müller, S. C., & Ellinger, J. (2018). Serum miR-122-5p and miR-206 expression: Non-invasive prognostic biomarkers for renal cell carcinoma. *Clinical Epigenetics*, 10, 11. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0444-9>
- Hidayat, K., Du, X., Zou, S.-Y., & Shi, B.-M. (2017). Blood pressure and kidney cancer risk: Meta-analysis of prospective studies. *Journal of Hypertension*, 35(7), 1333–1344. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001286>
- Hollingsworth, J. M., Miller, D. C., Daignault, S., & Hollenbeck, B. K. (2006). Rising incidence of small renal masses: A need to reassess treatment effect. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(18), 1331–1334. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj362>
- Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA Methylation. *Genes & Cancer*, 2(6), 607–617. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957>
- Kabaria, R., Klaassen, Z., & Terris, M. K. (2016). Renal cell carcinoma: Links and risks. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 9, 45–52. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S75916>
- Kane, C. J., Mallin, K., Ritchey, J., Cooperberg, M. R., & Carroll, P. R. (2008). Renal cell cancer stage migration: Analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer*, 113(1), 78–83. <https://doi.org/10.1002/cncr.23518>
- Kang, H. W., Kim, S. M., Kim, W. T., Yun, S. J., Lee, S.-C., Kim, W.-J., Hwang, E. C., Kang, S. H., Hong, S.-H., Chung, J., Kwon, T. G., Kim, H. H., Kwak, C., Byun, S.-S., Kim, Y.-J., &

- KORCC (Korean Renal Cell Carcinoma) Group. (2020). The age-adjusted Charlson comorbidity index as a predictor of overall survival of surgically treated non-metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *146*(1), 187–196. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03042-7>
- Karami, S., Daugherty, S. E., & Purdue, M. P. (2015). A prospective study of alcohol consumption and renal cell carcinoma risk. *International Journal of Cancer*, *137*(1), 238–242. <https://doi.org/10.1002/ijc.29359>
- Kaufman, D. P., Basit, H., & Knohl, S. J. (2023). Physiology, Glomerular Filtration Rate. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500032/>
- Kidney cancer incidence statistics*. (2015, May 15). Cancer Research UK. <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/kidney-cancer/incidence>
- Kim, S. H., Park, W. S., Kim, S. H., Joung, J. Y., Seo, H. K., Lee, K. H., & Chung, J. (2016). Systemic Treatments for Metastatic Renal Cell Carcinoma: 10-Year Experience of Immunotherapy and Targeted Therapy. *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association*, *48*(3), 1092–1101. <https://doi.org/10.4143/crt.2015.316>
- Kubiliute, R., & Jarmalaite, S. (2021). Epigenetic Biomarkers of Renal Cell Carcinoma for Liquid Biopsy Tests. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8846. <https://doi.org/10.3390/ijms22168846>
- Kubiliūtė, R., Žukauskaitė, K., Žalimas, A., Ulys, A., Sabaliauskaitė, R., Bakavičius, A., Želvys, A., Jankevičius, F., & Jarmalaitė, S. (2022). Clinical significance of novel DNA methylation biomarkers for renal clear cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *148*(2), 361–375. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03837-7>
- Lambe, M., Lindblad, P., Wu, J., Remler, R., & Hsieh, C. -c. (2002). Pregnancy and risk of renal cell cancer: A population-based study in Sweden. *British Journal of Cancer*, *86*(9), 1425–1429. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600263>
- Lane, B. R., Demirjian, S., Derweesh, I. H., Takagi, T., Zhang, Z., Velet, L., Ercole, C. E., Fergany, A. F., & Campbell, S. C. (2015). Survival and Functional Stability in Chronic Kidney Disease Due to Surgical Removal of Nephrons: Importance of the New Baseline Glomerular Filtration Rate. *European Urology*, *68*(6), 996–1003. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.04.043>
- Lew, J. Q., Chow, W.-H., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., & Park, Y. (2011). Alcohol consumption and risk of renal cell cancer: The NIH-AARP diet and health study. *British Journal of Cancer*, *104*(3), 537–541. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606089>

- Li, Y., Yang, Q., Guan, H., Shi, B., Ji, M., & Hou, P. (2018). ZNF677 Suppresses Akt Phosphorylation and Tumorigenesis in Thyroid Cancer. *Cancer Research*, 78(18), 5216–5228. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0003>
- Liang, W., Chen, S., Yang, G., Feng, J., Ling, Q., Wu, B., Yan, H., & Cheng, J. (2022). Overexpression of zinc-finger protein 677 inhibits proliferation and invasion by and induces apoptosis in clear cell renal cell carcinoma. *Bioengineered*, 13(3), 5292–5304. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2038891>
- Liao, L. M., Hofmann, J. N., Cho, E., Pollak, M. N., Chow, W.-H., & Purdue, M. P. (2017). Circulating levels of obesity-related markers and risk of renal cell carcinoma in the PLCO cancer screening trial. *Cancer Causes & Control: CCC*, 28(7), 801–807. <https://doi.org/10.1007/s10552-017-0901-3>
- Lin, S. Y., Linehan, J. A., Wilson, T. G., & Hoon, D. S. B. (2017). Emerging Utility of Urinary Cell-free Nucleic Acid Biomarkers for Prostate, Bladder, and Renal Cancers. *European Urology Focus*, 3(2–3), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.03.009>
- Lin, Y.-L., Wang, Y.-L., Fu, X.-L., & Ma, J.-G. (2014). Aberrant Methylation of PCDH8 is a Potential Prognostic Biomarker for Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 20, 2380–2385. <https://doi.org/10.12659/MSM.892433>
- Linehan, W. M., & Ricketts, C. J. (2019). The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: Findings and clinical implications. *Nature Reviews. Urology*, 16(9), 539–552. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0211-5>
- Liu, J.-J., Leppert, J. T., Maxwell, B. G., Panousis, P., & Chung, B. I. (2014). Trends and perioperative outcomes for laparoscopic and robotic nephrectomy using the National Surgical Quality Improvement Program (NSQIP) database. *Urologic Oncology*, 32(4), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.09.012>
- Liu, Z., Tang, S., Tian, X., Zhang, H., Wang, G., Zhang, S., & Ma, L. (2020). The effect of renal function change on renal cell carcinoma patients with tumor thrombus after nephrectomy and thrombectomy: A large Chinese center experience. *BMC Cancer*, 20(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-6563-7>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Locke, W. J., Guanzon, D., Ma, C., Liew, Y. J., Duesing, K. R., Fung, K. Y. C., & Ross, J. P. (2019). DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. *Frontiers in Genetics*, 10, 1150. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01150>

- Lommen, K., Vaes, N., Aarts, M. J., van Roermund, J. G., Schouten, L. J., Oosterwijk, E., Melotte, V., Tjan-Heijnen, V. C., van Engeland, M., & Smits, K. M. (2021). Diagnostic DNA Methylation Biomarkers for Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review. *European Urology Oncology*, *4*(2), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2019.07.011>
- Lopes-Ramos, C. M., Quackenbush, J., & DeMeo, D. L. (2020). Genome-Wide Sex and Gender Differences in Cancer. *Frontiers in Oncology*, *10*, 597788. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.597788>
- Lotan, Y., Karam, J. A., Shariat, S. F., Gupta, A., Roupret, M., Bensalah, K., & Margulis, V. (2016). Renal-cell carcinoma risk estimates based on participants in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial and national lung screening trial. *Urologic Oncology*, *34*(4), 167.e9-16. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.10.011>
- Lu, J., Xie, F., Geng, L., Shen, W., Sui, C., & Yang, J. (2015). Potential Role of MicroRNA-210 as Biomarker in Human Cancers Detection: A Meta-Analysis. *BioMed Research International*, *2015*, 303987. <https://doi.org/10.1155/2015/303987>
- Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2018). MicroRNA. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *141*(4), 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>
- Lughezzani, G., Jeldres, C., Isbarn, H., Perrotte, P., Shariat, S. F., Sun, M., Widmer, H., Arjane, P., Peloquin, F., Pharand, D., Patard, J.-J., Graefen, M., Montorsi, F., & Karakiewicz, P. I. (2009). Tumor size is a determinant of the rate of stage T1 renal cell cancer synchronous metastasis. *The Journal of Urology*, *182*(4), 1287–1293. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.06.018>
- Ma, Z., Williams, M., Cheng, Y. Y., & Leung, W. K. (2019). Roles of Methylated DNA Biomarkers in Patients with Colorectal Cancer. *Disease Markers*, *2019*, 2673543. <https://doi.org/10.1155/2019/2673543>
- Macleod, L. C., Hotaling, J. M., Wright, J. L., Davenport, M. T., Gore, J. L., Harper, J., & White, E. (2013). Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study. *The Journal of Urology*, *190*(5), 1657–1661. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.04.130>
- Makino, T., Kadomoto, S., Izumi, K., & Mizokami, A. (2022). Epidemiology and Prevention of Renal Cell Carcinoma. *Cancers*, *14*(16), 4059. <https://doi.org/10.3390/cancers14164059>
- Mandriota, S. J., Turner, K. J., Davies, D. R., Murray, P. G., Morgan, N. V., Sowter, H. M., Wykoff, C. C., Maher, E. R., Harris, A. L., Ratcliffe, P. J., & Maxwell, P. H. (2002). HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: Evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell*, *1*(5), 459–468. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00071-5](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00071-5)

- Marra, G., Oderda, M., Allasia, M., Munegato, S., Joniau, Steven, & Gontero, P. (2017). A Review on the Management of Small Renal Masses: Active Surveillance Versus Surgery. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 18.
<https://doi.org/10.2174/1871520617666171113123443>
- Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E., & Ulbright, T. M. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*, 70(1), 93–105.
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>
- Mohn, F., & Schübeler, D. (2009). Genetics and epigenetics: Stability and plasticity during cellular differentiation. *Trends in Genetics: TIG*, 25(3), 129–136.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.12.005>
- Morris, M. R., Ricketts, C. J., Gentle, D., McRonald, F., Carli, N., Khalili, H., Brown, M., Kishida, T., Yao, M., Banks, R. E., Clarke, N., Latif, F., & Maher, E. R. (2011). Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Oncogene*, 30(12), 1390–1401.
<https://doi.org/10.1038/onc.2010.525>
- Morrissey, J. J., London, A. N., Luo, J., & Kharasch, E. D. (2010). Urinary biomarkers for the early diagnosis of kidney cancer. *Mayo Clinic Proceedings*, 85(5), 413–421.
<https://doi.org/10.4065/mcp.2009.0709>
- Nikanjam, M., Kato, S., & Kurzrock, R. (2022). Liquid biopsy: Current technology and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 131.
<https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>
- Ohashi, R., Schraml, P., Batavia, A., Angori, S., Simmler, P., Rupp, N., Ajioka, Y., Oliva, E., & Moch, H. (2019). Allele Loss and Reduced Expression of CYCLOPS Genes is a Characteristic Feature of Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *Translational Oncology*, 12(9), 1131–1137. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.05.005>
- Oto, J., Fernández-Pardo, Á., Roca, M., Plana, E., Solmoirago, M. J., Sánchez-González, J. V., Vera-Donoso, C. D., Martínez-Sarmiento, M., España, F., Navarro, S., & Medina, P. (2020). Urine metabolomic analysis in clear cell and papillary renal cell carcinoma: A pilot study. *Journal of Proteomics*, 218, 103723. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103723>
- Pancho, A., Aerts, T., Mitsogiannis, M. D., & Seuntjens, E. (2020). Protocadherins at the Crossroad of Signaling Pathways. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.00117>

- Park, S.-W., Lee, S. S., Lee, D. H., Nam, J. K., & Chung, M. K. (2017). Growth kinetics of small renal mass: Initial analysis of active surveillance registry. *Investigative and Clinical Urology*, 58(6), 429–433. <https://doi.org/10.4111/icu.2017.58.6.429>
- Patel, N., Cranston, D., Akhtar, M. Z., George, C., Jones, A., Leiblich, A., Protheroe, A., & Sullivan, M. (2012). Active surveillance of small renal masses offers short-term oncological efficacy equivalent to radical and partial nephrectomy. *BJU International*, 110(9), 1270–1275. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11130.x>
- Pearson-Stuttard, J., Zhou, B., Kontis, V., Bentham, J., Gunter, M. J., & Ezzati, M. (2018). Worldwide burden of cancer attributable to diabetes and high body-mass index: A comparative risk assessment. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 6(6), e6–e15. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30150-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30150-5)
- Pierorazio, P. M., Johnson, M. H., Ball, M. W., Gorin, M. A., Trock, B. J., Chang, P., Wagner, A. A., McKiernan, J. M., & Allaf, M. E. (2015). Five-year analysis of a multi-institutional prospective clinical trial of delayed intervention and surveillance for small renal masses: The DISSRM registry. *European Urology*, 68(3), 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.02.001>
- Prujm, M., Hofmann, L., Vogt, B., Muller, M.-E., Piskunowicz, M., Stuber, M., & Burnier, M. (2013). Renal tissue oxygenation in essential hypertension and chronic kidney disease. *International Journal of Hypertension*, 2013, 696598. <https://doi.org/10.1155/2013/696598>
- Qi, X., Li, Q., Che, X., Wang, Q., & Wu, G. (2021). The Uniqueness of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Summary of the Process and Abnormality of Glucose Metabolism and Lipid Metabolism in ccRCC. *Frontiers in Oncology*, 11, 727778. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.727778>
- Rasmussen, S. L., Krarup, H. B., Sunesen, K. G., Pedersen, I. S., Madsen, P. H., & Thorlacius-Ussing, O. (2016). Hypermethylated DNA as a biomarker for colorectal cancer: A systematic review. *Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 18(6), 549–561. <https://doi.org/10.1111/codi.13336>
- Rebez, G., & Mir, M. C. (2022). Current perspectives on active surveillance for patients with small renal masses. *Asian Journal of Urology*, 9(3), 204–205. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2022.04.003>
- Regier, M., & Chun, F. (2015). Thermal Ablation of Renal Tumors: Indications, Techniques and Results. *Deutsches Ärzteblatt International*, 112(24), 412–418. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2015.0412>

- Ricketts, C. J., De Cubas, A. A., Fan, H., Smith, C. C., Lang, M., Reznik, E., Bowlby, R., Gibb, E. A., Akbani, R., Beroukhim, R., Bottaro, D. P., Choueiri, T. K., Gibbs, R. A., Godwin, A. K., Haake, S., Hakimi, A. A., Henske, E. P., Hsieh, J. J., Ho, T. H., ... Linehan, W. M. (2018). The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports*, 23(12), 3698. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.032>
- Rivero, J. R., De La Cerda, J., Wang, H., Liss, M. A., Farrell, A. M., Rodriguez, R., Suri, R., & Kaushik, D. (2018). Partial Nephrectomy versus Thermal Ablation for Clinical Stage T1 Renal Masses: Systematic Review and Meta-Analysis of More than 3,900 Patients. *Journal of Vascular and Interventional Radiology: JVIR*, 29(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2017.08.013>
- Rosner, I., Bratslavsky, G., Pinto, P. A., & Linehan, W. M. (2009). The clinical implications of the genetics of renal cell carcinoma. *Urologic Oncology*, 27(2), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2008.11.001>
- Saito, K., Arai, E., Maekawa, K., Ishikawa, M., Fujimoto, H., Taguchi, R., Matsumoto, K., Kanai, Y., & Saito, Y. (2016). Lipidomic Signatures and Associated Transcriptomic Profiles of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Scientific Reports*, 6, 28932. <https://doi.org/10.1038/srep28932>
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, 20(2), 12. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- Sanchez, A., Feldman, A. S., & Hakimi, A. A. (2018). Current Management of Small Renal Masses, Including Patient Selection, Renal Tumor Biopsy, Active Surveillance, and Thermal Ablation. *Journal of Clinical Oncology*, 36(36), 3591–3600. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.79.2341>
- Sanfilippo, K. M., McTigue, K. M., Fidler, C. J., Neaton, J. D., Chang, Y., Fried, L. F., Liu, S., & Kuller, L. H. (2014). Hypertension and obesity and the risk of kidney cancer in 2 large cohorts of US men and women. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 63(5), 934–941. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02953>
- Sharifi, N., & Farrar, W. L. (2006). Perturbations in hypoxia detection: A shared link between hereditary and sporadic tumor formation? *Medical Hypotheses*, 66(4), 732–735. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.11.003>
- Siraj, A. K., Parvathareddy, S. K., Siraj, N., Al-Obaisi, K., Aldughaiter, S. M., AlManea, H. M., AlHussaini, H. F., Al-Dayel, F., & Al-Kuraya, K. S. (2021). Loss of ZNF677 expression is a predictive biomarker for lymph node metastasis in Middle Eastern Colorectal Cancer. *Scientific Reports*, 11(1), 22346. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01869-0>

- Stone, A., Zotenko, E., Locke, W. J., Korbie, D., Millar, E. K. A., Pidsley, R., Stirzaker, C., Graham, P., Trau, M., Musgrove, E. A., Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., & Clark, S. J. (2015). DNA methylation of oestrogen-regulated enhancers defines endocrine sensitivity in breast cancer. *Nature Communications*, *6*, 7758. <https://doi.org/10.1038/ncomms8758>
- Su, Z. T., Patel, H. D., Huang, M. M., Alam, R., Cheaib, J. G., Pavlovich, C. P., Allaf, M. E., & Pierorazio, P. M. (2022). Active Surveillance versus Immediate Intervention for Small Renal Masses: A Cost-Effectiveness and Clinical Decision Analysis. *The Journal of Urology*, *208*(4), 794–803. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000002812>
- Sun, M., Vetterlein, M., Harshman, L. C., Chang, S. L., Choueiri, T. K., & Trinh, Q.-D. (2017). Risk Assessment in Small Renal Masses: A Review Article. *The Urologic Clinics of North America*, *44*(2), 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.12.005>
- Swami, U., Nussenzveig, R. H., Haaland, B., & Agarwal, N. (2019). Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: Quest for improvement. *Annals of Translational Medicine*, *7*(Suppl 1), S18. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.01.50>
- Turajlic, S., Swanton, C., & Boshoff, C. (2018). Kidney cancer: The next decade. *The Journal of Experimental Medicine*, *215*(10), 2477–2479. <https://doi.org/10.1084/jem.20181617>
- Turco, F., Tucci, M., Di Stefano, R. F., Samuelly, A., Bungaro, M., Audisio, M., Pisano, C., Di Maio, M., Scagliotti, G. V., & Buttigliero, C. (2021). Renal cell carcinoma (RCC): Fatter is better? A review on the role of obesity in RCC. *Endocrine-Related Cancer*, *28*(7), R207–R216. <https://doi.org/10.1530/ERC-20-0457>
- Ueno, D., Xie, Z., Boeke, M., Syed, J., Nguyen, K. A., McGillivray, P., Adeniran, A., Humphrey, P., Dancik, G. M., Kluger, Y., Liu, Z., Kluger, H., & Shuch, B. (2018). Genomic Heterogeneity and the Small Renal Mass. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *24*(17), 4137–4144. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0214>
- van Loon, K., Yemelyanenko-Lyalenko, J., Margadant, C., Griffioen, A. W., & Huijbers, E. J. M. (2020). Role of fibrillin-2 in the control of TGF- β activation in tumor angiogenesis and connective tissue disorders. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, *1873*(2), 188354. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188354>
- Vartolomei, L., Cotruş, A., Stanciu, C., Delcea, C., Tozzi, M., Lievore, E., Crocetto, F., Giudice, F. D., Lucarelli, G., Muto, M., & Ferro, M. (2022). Quality of Life and Psychological Distress among Patients with Small Renal Masses. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(14). <https://doi.org/10.3390/jcm11143944>
- Vasudev, N. S., Wilson, M., Stewart, G. D., Adeyoju, A., Cartledge, J., Kimuli, M., Datta, S., Hanbury, D., Hrouda, D., Oades, G., Patel, P., Soomro, N., Sullivan, M., Webster, J., Selby,

- P. J., & Banks, R. E. (2020). Challenges of early renal cancer detection: Symptom patterns and incidental diagnosis rate in a multicentre prospective UK cohort of patients presenting with suspected renal cancer. *BMJ Open*, *10*(5), e035938. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-035938>
- Wang, J., Chang, S., Li, G., & Sun, Y. (2017). Application of liquid biopsy in precision medicine: Opportunities and challenges. *Frontiers of Medicine*, *11*(4), 522–527. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0526-7>
- Wang, J., Xu, A. M., Zhang, J. Y., He, X. M., Pan, Y. S., Cheng, G., Qin, C., Hua, L. X., & Wang, Z. J. (2016). Prognostic significance of long non-coding RNA MALAT-1 in various human carcinomas: A meta-analysis. *Genetics and Molecular Research: GMR*, *15*(1). <https://doi.org/10.4238/gmr.15017433>
- Wang, L., Wang, C., Wu, T., & Sun, F. (2020). Long non-coding RNA TP73-AS1 promotes TFAP2B-mediated proliferation, metastasis and invasion in retinoblastoma via decoying of miRNA-874-3p. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *14*(2), 193–205. <https://doi.org/10.1007/s12079-020-00550-x>
- Welch, H. G., & Black, W. C. (2010). Overdiagnosis in cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *102*(9), 605–613. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq099>
- Wong, E. C. L., Di Lena, R., Breau, R. H., Pouliot, F., Finelli, A., Lavallée, L. T., So, A., Tanguay, S., Fairey, A., Rendon, R., Richard, P. O., Lattouf, J.-B., Kawakami, J., Mallick, R., & Kapoor, A. (2019). Morphologic subtyping as a prognostic predictor for survival in papillary renal cell carcinoma: Type 1 vs. type 2. *Urologic Oncology*, *37*(10), 721–726. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2019.05.009>
- Wu, S., Li, X., Yang, J., & Yang, L. (2022). PCDH8 participates in the growth process of colorectal cancer cells by regulating the AKT/GSK3 β / β -catenin signaling pathway. *Tissue & Cell*, *78*, 101864. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101864>
- Wu, Y., Wang, Y.-Q., Weng, W.-W., Zhang, Q.-Y., Yang, X.-Q., Gan, H.-L., Yang, Y.-S., Zhang, P.-P., Sun, M.-H., Xu, M.-D., & Wang, C.-F. (2016). A serum-circulating long noncoding RNA signature can discriminate between patients with clear cell renal cell carcinoma and healthy controls. *Oncogenesis*, *5*(2), e192. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.48>
- Xie, J., Zhong, Y., Chen, R., Li, G., Luo, Y., Yang, J., Sun, Z., Liu, Y., Liu, P., Wang, N., An, J., Li, C., & Song, Y. (2020). Serum long non-coding RNA LINC00887 as a potential biomarker for diagnosis of renal cell carcinoma. *FEBS Open Bio*, *10*(9), 1802–1809. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12930>

- Xu, X., Zhu, Y., Zheng, X., & Xie, L. (2015). Does beer, wine or liquor consumption correlate with the risk of renal cell carcinoma? A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget*, 6(15), 13347–13358. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3749>
- Yang, X., Liao, H.-Y., & Zhang, H.-H. (2022). Roles of MET in human cancer. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 525, 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.12.017>
- Young, S., Golzarian, J., & Anderson, J. K. (2019). Thermal Ablation of T1a Renal Cell Carcinoma: The Clinical Evidence. *Seminars in Interventional Radiology*, 36(5), 367–373. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1696650>
- Zhang, C., Peng, Y., Yang, F., Qin, R., Liu, W., & Zhang, C. (2016). PCDH8 is Frequently Inactivated by Promoter Hypermethylation in Liver Cancer: Diagnostic and Clinical Significance. *Journal of Cancer*, 7(4), 446–452. <https://doi.org/10.7150/jca.13065>
- Zhang, G.-M., Zhu, Y., & Ye, D.-W. (2014). Metabolic syndrome and renal cell carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*, 12, 236. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-236>
- Zhang, Q., Chen, P., Tian, R., He, J., Han, Q., & Fan, L. (2022). Metabolic Syndrome is an Independent Risk Factor for Fuhrman Grade and TNM Stage of Renal Clear Cell Carcinoma. *International Journal of General Medicine*, 15, 143–150. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S346972>
- Zhao, X., Dai, F., Mei, L., Huang, D., Shen, X., Zhang, H., She, X., & Ma, Z. (2021). The Potential Use of Dynamics Changes of ctDNA and cfDNA in the Perioperative Period to Predict the Recurrence Risk in Early NSCLC. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.671963>
- Zhu, M., Zou, L., Lu, F., Ye, L., Su, B., Yang, K., Lin, M., Fu, J., & Li, Y. (2020). MiR-142-5p promotes renal cell tumorigenesis by targeting TFAP2B. *Oncology Letters*, 20(6), 324. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12187>

Priedai

1 lentelė Tirtų biožymenų ir jų kombinacijų diagnostinės vertės analizė.

Genai	AUC	P reikšmė	Jautrumas, %	Specifiškumas, %
<i>ZNF677</i>	0,639	<0,0001	31,31	96,74
<i>FBN2</i>	0,56	0,0018	19,16	92,39
<i>PCDH8</i>	0,688	<0,0001	49,53	88,04
<i>TFAP2B</i>	0,686	<0,0001	51,87	78,26
<i>TAC1</i>	0,683	<0,0001	72,9	61,96
<i>FLRT2</i>	0,595	0,0001	30,84	88,04
2 genų kombinacijos				
<i>ZNF677, PCDH8</i>	0,704	<0,0001	55,14	84,78
<i>ZNF677, FBN2</i>	0,65	<0,0001	37,38	91,3
<i>ZNF677, FLRT2</i>	0,674	<0,0001	47,2	85,87
<i>ZNF677, TAC1</i>	0,716	<0,0001	49,07	85,87
<i>ZNF677, TFAP2B</i>	0,721	<0,0001	47,2	89,13
<i>FBN2, PCDH8</i>	0,694	<0,0001	55,61	80,43
<i>FBN2, TFAP2B</i>	0,694	<0,0001	59,35	71,74
<i>FBN2, TAC1</i>	0,693	<0,0001	75,7	60,87
<i>FBN2, FLRT2</i>	0,631	<0,0001	42,06	83,7
<i>PCDH8, TFAP2B</i>	0,713	<0,0001	62,15	76,09
<i>PCDH8, TAC1</i>	0,719	<0,0001	56,07	83,7
<i>PCDH8, FLRT2</i>	0,72	<0,0001	62,15	76,09
<i>TFAP2B, TAC1</i>	0,688	<0,0001	57,94	73,91
<i>TFAP2B, FLRT2</i>	0,69	<0,0001	55,61	73,91
<i>TAC1, FLRT2</i>	0,698	<0,0001	76,64	59,78
3 genų kombinacijos				
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8</i>	0,708	<0,0001	60,75	77,17
<i>ZNF677, FBN2, TFAP2B</i>	0,724	<0,0001	50	84,78
<i>ZNF677, FBN2, TAC1</i>	0,72	<0,0001	78,04	57,61
<i>ZNF677, FBN2, FLRT2</i>	0,69	<0,0001	54,21	81,52
<i>ZNF677, PCDH8, TFAP2B</i>	0,727	<0,0001	53,74	84,78
<i>ZNF677, PCDH8, TAC1</i>	0,725	<0,0001	59,35	81,52
<i>ZNF677, PCDH8, FLRT2</i>	0,73	<0,0001	62,15	77,17
<i>ZNF677, TFAP2B, TAC1</i>	0,72	<0,0001	62,62	72,83
<i>ZNF677, TFAP2B, FLRT2</i>	0,721	<0,0001	49,07	86,96
<i>ZNF677, TAC1, FLRT2</i>	0,726	<0,0001	53,74	82,61
<i>FBN2, PCDH8, TFAP2B</i>	0,714	<0,0001	64,49	72,83
<i>FBN2, PCDH8, TAC1</i>	0,722	<0,0001	58,41	79,35
<i>FBN2, PCDH8, FLRT2</i>	0,724	<0,0001	65,89	73,91
<i>FBN2, TFAP2B, TAC1</i>	0,696	<0,0001	60,75	71,74
<i>FBN2, TFAP2B, FLRT2</i>	0,7	<0,0001	59,81	71,74
<i>FBN2, TAC1, FLRT2</i>	0,711	<0,0001	78,97	58,7
<i>PCDH8, TFAP2B, TAC1</i>	0,715	<0,0001	66,36	72,83
<i>PCDH8, TFAP2B, FLRT2</i>	0,72	<0,0001	64,49	72,83
<i>PCDH8, TAC1, FLRT2</i>	0,739	<0,0001	60,75	79,35

<i>TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,698	<0,0001	61,68	70,65
4 genų kombinacijos				
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, TFAP2B</i>	0,729	<0,0001	66,36	70,65
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, TAC1</i>	0,729	<0,0001	63,08	77,17
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, FLRT2</i>	0,732	<0,0001	62,15	77,17
<i>ZNF677, FBN2, TFAP2B, TAC1</i>	0,723	<0,0001	64,49	70,65
<i>ZNF677, FBN2, TFAP2B, FLRT2</i>	0,726	<0,0001	47,2	86,96
<i>ZNF677, FBN2, TAC1, FLRT2</i>	0,732	<0,0001	82,71	54,35
<i>ZNF677, PCDH8, TFAP2B, TAC1</i>	0,729	<0,0001	68,22	70,65
<i>ZNF677, PCDH8, TFAP2B, FLRT2</i>	0,732	<0,0001	49,53	89,13
<i>ZNF677, PCDH8, TAC1, FLRT2</i>	0,744	<0,0001	63,08	77,17
<i>ZNF677, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,725	<0,0001	47,2	88,04
<i>FBN2, PCDH8, TFAP2B, TAC1</i>	0,717	<0,0001	67,29	70,65
<i>FBN2, PCDH8, TFAP2B, FLRT2</i>	0,723	<0,0001	67,76	69,57
<i>FBN2, PCDH8, TAC1, FLRT2</i>	0,741	<0,0001	63,08	76,09
<i>FBN2, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,705	<0,0001	64,95	69,57
<i>PCDH8, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,724	<0,0001	69,63	69,57
5 genų kombinacijos				
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, TFAP2B, TAC1</i>	0,731	<0,0001	70,09	68,48
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, TFAP2B, FLRT2</i>	0,734	<0,0001	50,93	85,87
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, TAC1, FLRT2</i>	0,747	<0,0001	65,89	73,91
<i>ZNF677, FBN2, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,728	<0,0001	67,29	67,39
<i>ZNF677, PCDH8, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,736	<0,0001	70,56	67,39
<i>FBN2, PCDH8, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,727	<0,0001	70,56	68,48
6 genų kombinacija				
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,738	<0,0001	72,43	66,3

AUC – plotas po ROC kreive (angl. *Area Under the ROC Curve*)

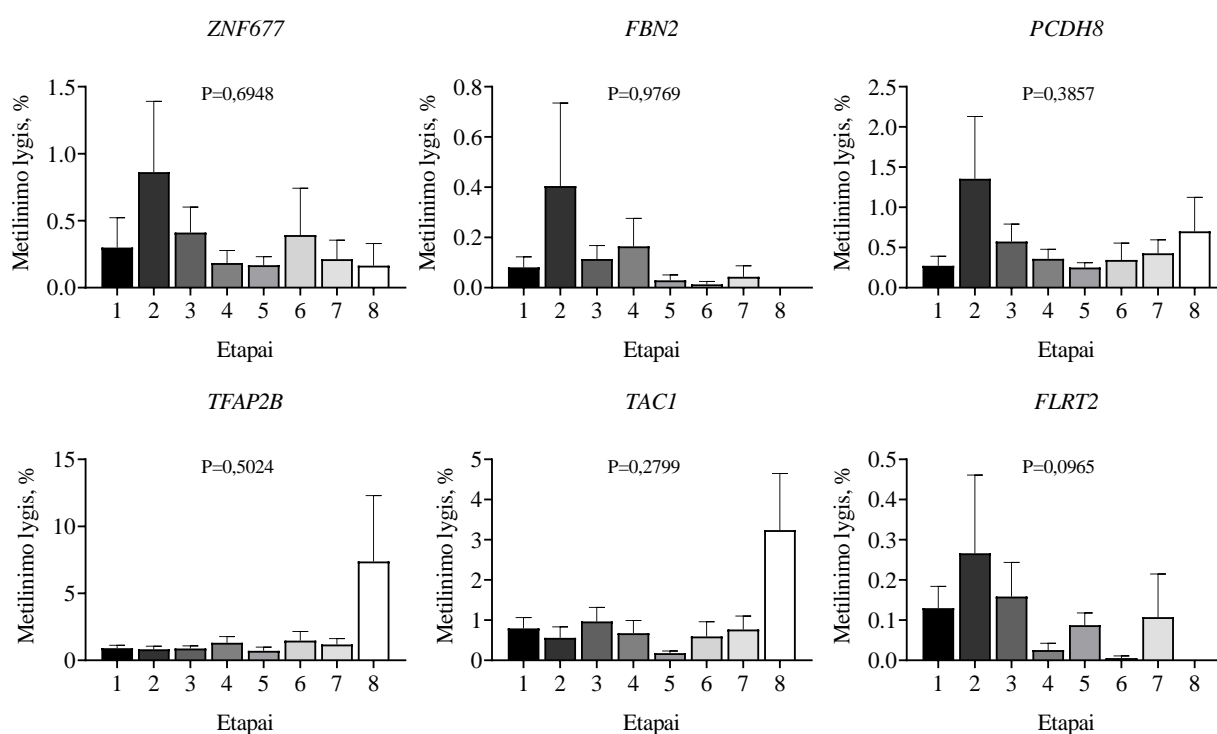
2 lentelė Tirtų biožymenų ir jų kombinacijų diagnostinės vertės analizė įtraukus tik diagnozės metu (I etapas, 0 mėn) paimtus mėginius.

Genai	AUC	P reikšmė	Jautrumas, %	Specifiškumas, %
<i>ZNF677</i>	0,608	0,0007	25,93	96,74
<i>FBN2</i>	0,557	0,0614	14,81	96,74
<i>PCDH8</i>	0,663	0,0002	44,44	88,04
<i>TFAP2B</i>	0,682	0,0001	51,85	78,26
<i>TAC1</i>	0,69	<0,0001	72,22	61,96
<i>FLRT2</i>	0,565	0,0607	24,07	90,22
2 genų kombinacijos				
<i>ZNF677, PCDH8</i>	0,698	<0,0001	51,85	86,96
<i>ZNF677, FBN2</i>	0,604	0,0045	31,48	91,3

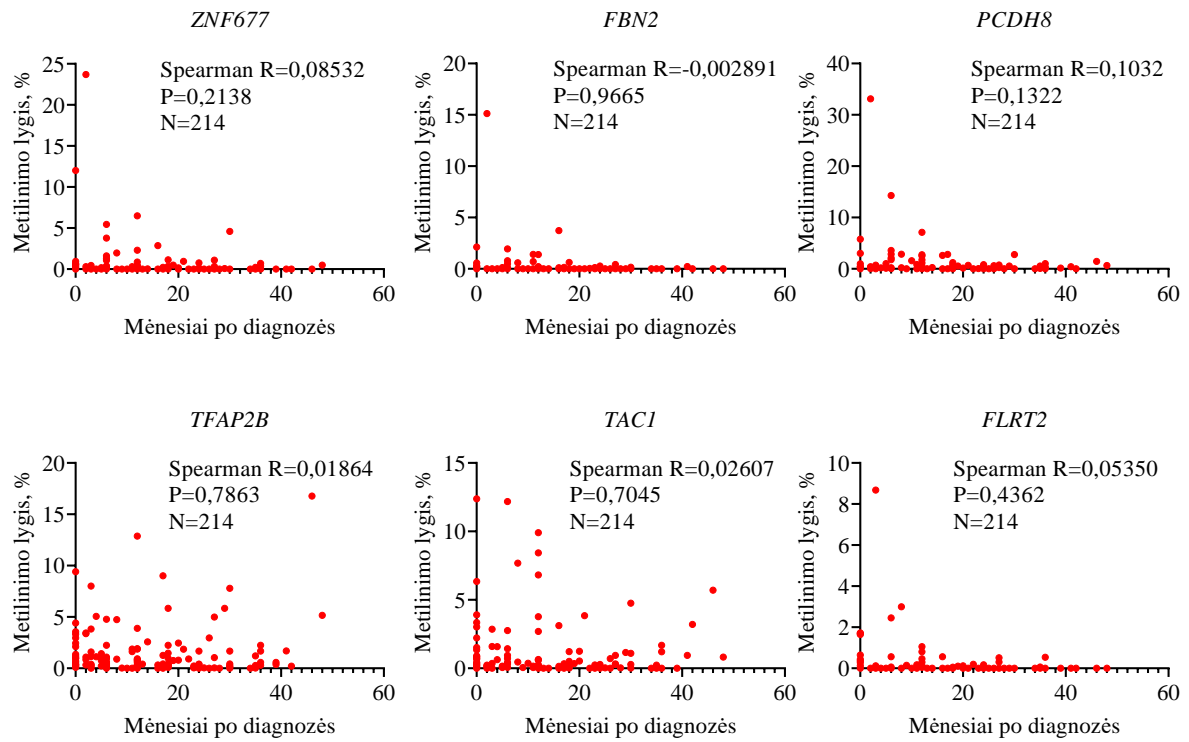
ZNF677, FLRT2	0,622	0,0016	35,19	88,04
ZNF677, TAC1	0,706	<0,0001	75,93	58,7
ZNF677, TFAP2B	0,699	<0,0001	50	83,7
FBN2, PCDH8	0,658	0,0003	50	83,7
FBN2, TFAP2B	0,681	<0,0001	75,93	53,26
FBN2, TAC1	0,683	<0,0001	72,22	60,87
FBN2, FLRT2	0,584	0,0279	31,48	84,78
PCDH8, TFAP2B	0,683	0,0001	62,96	66,3
PCDH8, TAC1	0,709	<0,0001	79,63	57,61
PCDH8, FLRT2	0,675	0,0001	55,56	77,17
TFAP2B, TAC1	0,696	<0,0001	62,96	69,57
TFAP2B, FLRT2	0,685	<0,0001	90,74	39,13
TAC1, FLRT2	0,705	<0,0001	74,07	61,96
3 genų kombinacijos				
ZNF677, FBN2, PCDH8	0,683	<0,0001	57,41	80,43
ZNF677, FBN2, TFAP2B	0,695	<0,0001	57,41	73,91
ZNF677, FBN2, TAC1	0,697	<0,0001	75,93	57,61
ZNF677, FBN2, FLRT2	0,623	0,0024	38,89	83,7
ZNF677, PCDH8, TFAP2B	0,697	<0,0001	53,7	80,43
ZNF677, PCDH8, TAC1	0,723	<0,0001	77,78	60,87
ZNF677, PCDH8, FLRT2	0,703	<0,0001	59,26	78,26
ZNF677, TFAP2B, TAC1	0,705	<0,0001	61,11	73,91
ZNF677, TFAP2B, FLRT2	0,697	<0,0001	51,85	80,43
ZNF677, TAC1, FLRT2	0,718	<0,0001	81,48	54,35
FBN2, PCDH8, TFAP2B	0,683	0,0001	74,07	55,43
FBN2, PCDH8, TAC1	0,702	<0,0001	79,63	55,43
FBN2, PCDH8, FLRT2	0,676	0,0001	59,26	75
FBN2, TFAP2B, TAC1	0,695	<0,0001	61,11	70,65
FBN2, TFAP2B, FLRT2	0,689	<0,0001	90,74	39,13
FBN2, TAC1, FLRT2	0,704	<0,0001	79,63	55,43
PCDH8, TFAP2B, TAC1	0,702	<0,0001	70,37	64,13
PCDH8, TFAP2B, FLRT2	0,69	<0,0001	92,59	38,04
PCDH8, TAC1, FLRT2	0,729	<0,0001	83,33	58,7
TFAP2B, TAC1, FLRT2	0,708	<0,0001	59,26	72,83
4 genų kombinacijos				
ZNF677, FBN2, PCDH8, TFAP2B	0,694	<0,0001	55,56	76,09
ZNF677, FBN2, PCDH8, TAC1	0,712	<0,0001	77,78	58,7
ZNF677, FBN2, PCDH8, FLRT2	0,697	<0,0001	61,11	76,09
ZNF677, FBN2, TFAP2B, TAC1	0,7	<0,0001	61,11	72,83
ZNF677, FBN2, TFAP2B, FLRT2	0,697	<0,0001	59,26	70,65
ZNF677, FBN2, TAC1, FLRT2	0,714	<0,0001	81,48	54,35
ZNF677, PCDH8, TFAP2B, TAC1	0,705	<0,0001	61,11	73,91
ZNF677, PCDH8, TFAP2B, FLRT2	0,696	<0,0001	51,85	80,43
ZNF677, PCDH8, TAC1, FLRT2	0,738	<0,0001	90,74	50
ZNF677, TFAP2B, TAC1, FLRT2	0,712	<0,0001	62,96	71,74
FBN2, PCDH8, TFAP2B, TAC1	0,701	<0,0001	68,52	64,13
FBN2, PCDH8, TFAP2B, FLRT2	0,692	<0,0001	92,59	38,04

<i>FBN2, PCDH8, TAC1, FLRT2</i>	0,727	<0,0001	83,33	57,61
<i>FBN2, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,708	<0,0001	62,96	67,39
<i>PCDH8, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,714	<0,0001	61,11	70,65
5 genų kombinacijos				
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, TFAP2B, TAC1</i>	0,701	<0,0001	61,11	72,83
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, TFAP2B, FLRT2</i>	0,696	<0,0001	59,26	70,65
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, TAC1, FLRT2</i>	0,733	<0,0001	90,74	50
<i>ZNF677, FBN2, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,709	<0,0001	62,96	70,65
<i>ZNF677, PCDH8, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,709	<0,0001	62,96	71,74
<i>FBN2, PCDH8, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,712	<0,0001	98,15	32,61
6 genų kombinacija				
<i>ZNF677, FBN2, PCDH8, TFAP2B, TAC1, FLRT2</i>	0,706	<0,0001	62,96	69,57

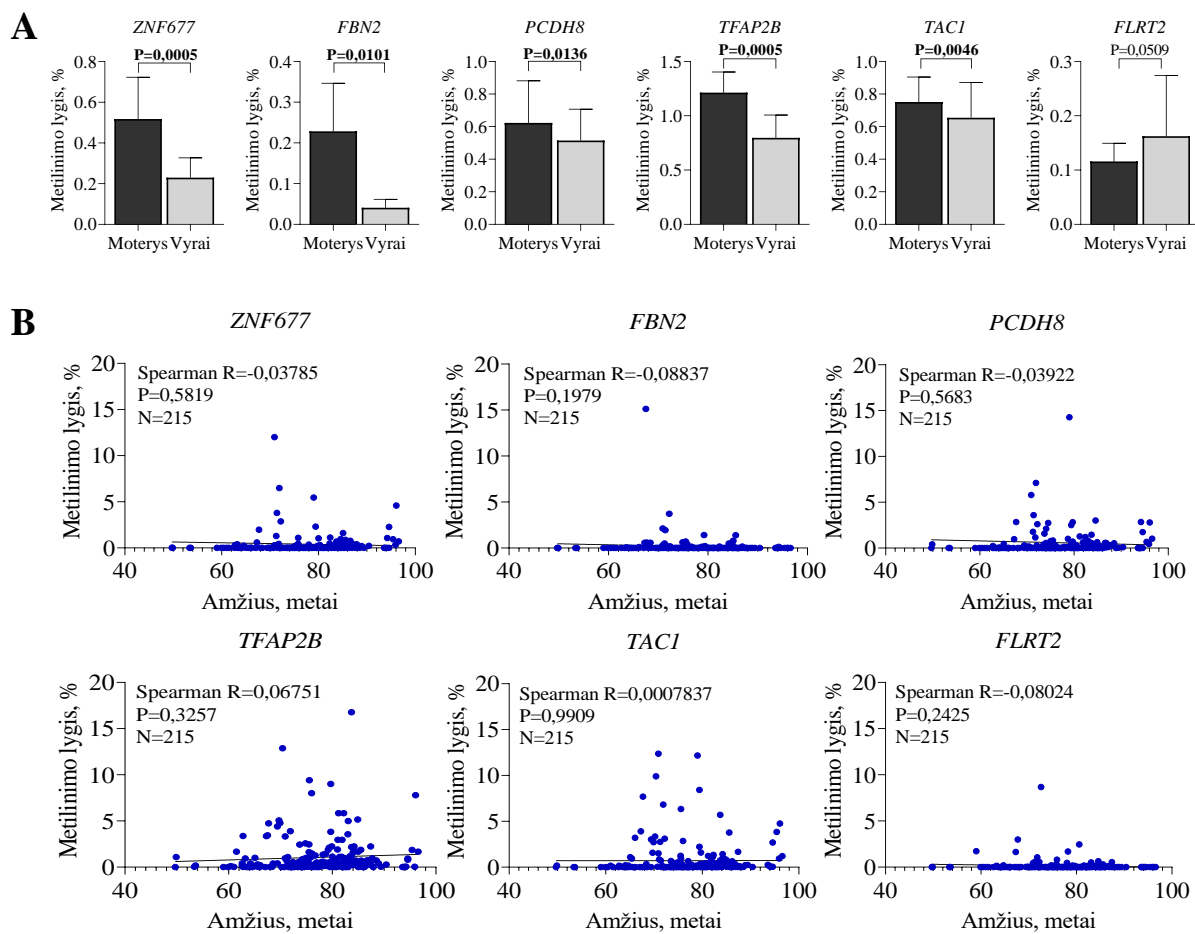
AUC – plotas po ROC kreive (angl. *Area Under the ROC Curve*)



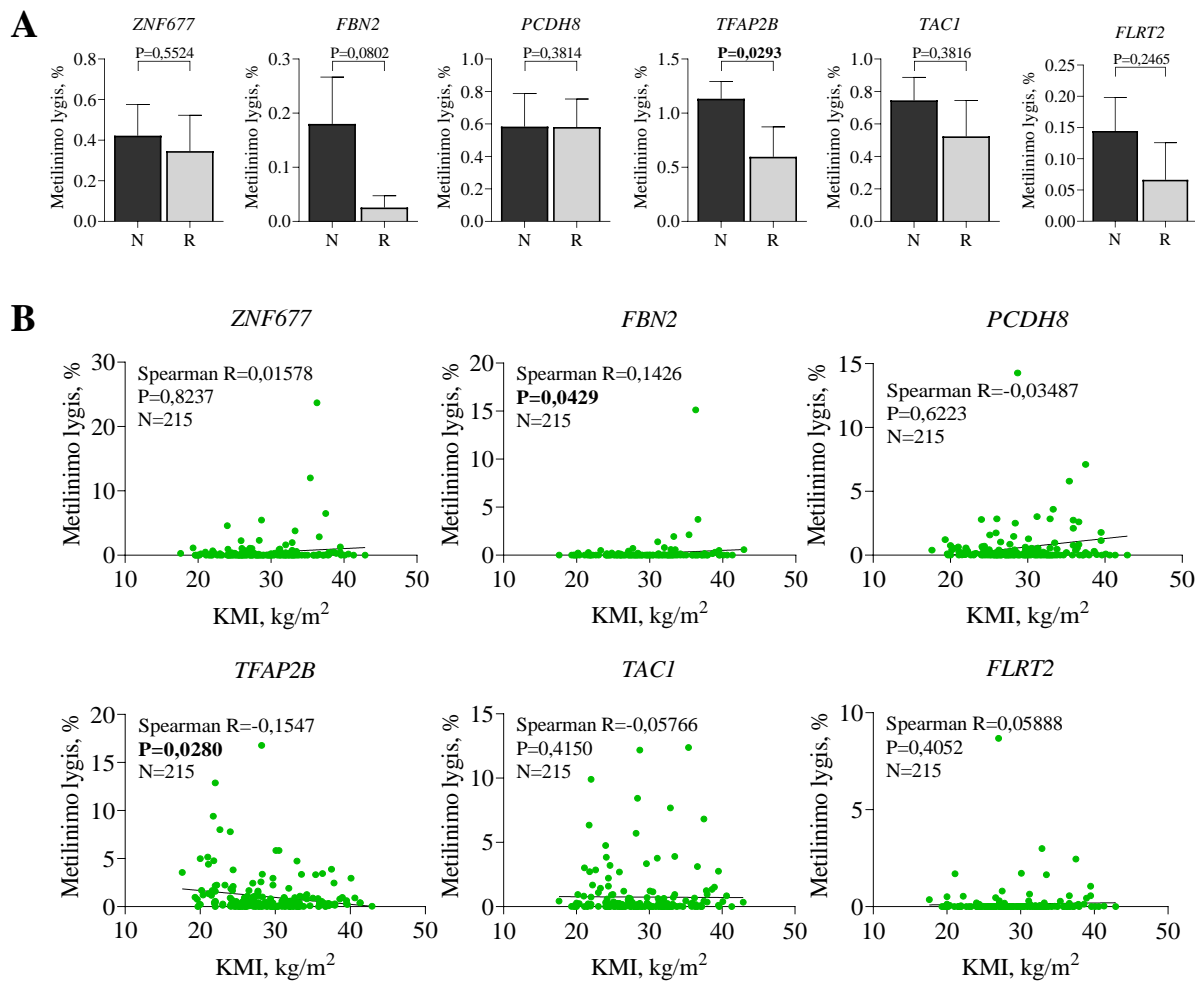
1 pav. Vidutinis genų metilinimo lygis skirtinguose mėginio paėmimo etapuose.



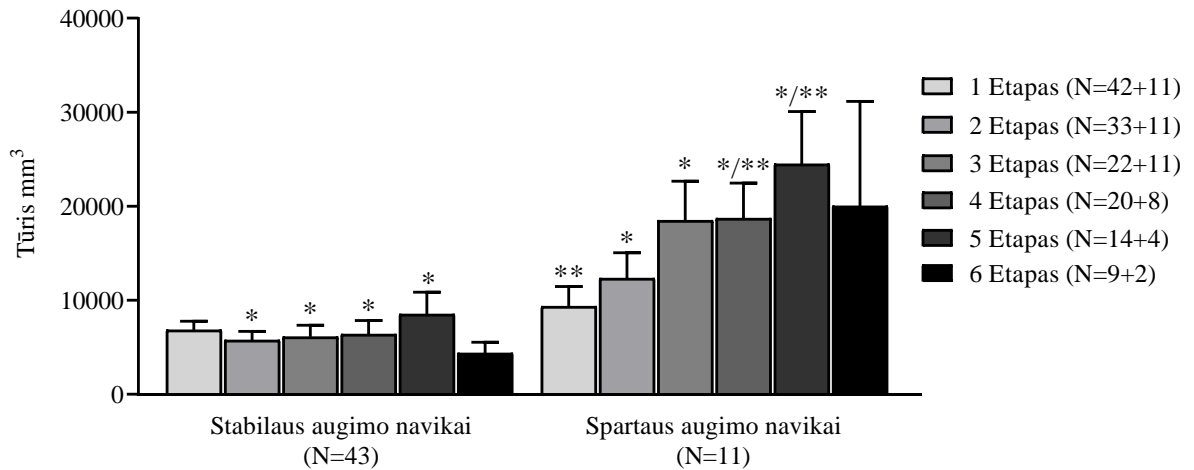
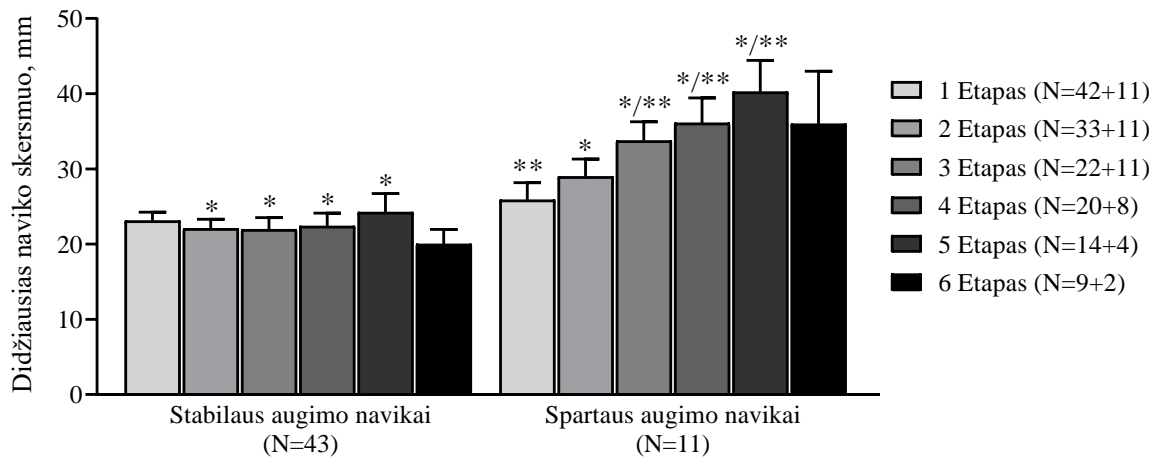
2 pav. Genų metilinimo lygio sąsaja su mėnesių po diagnozės skaičiumi.



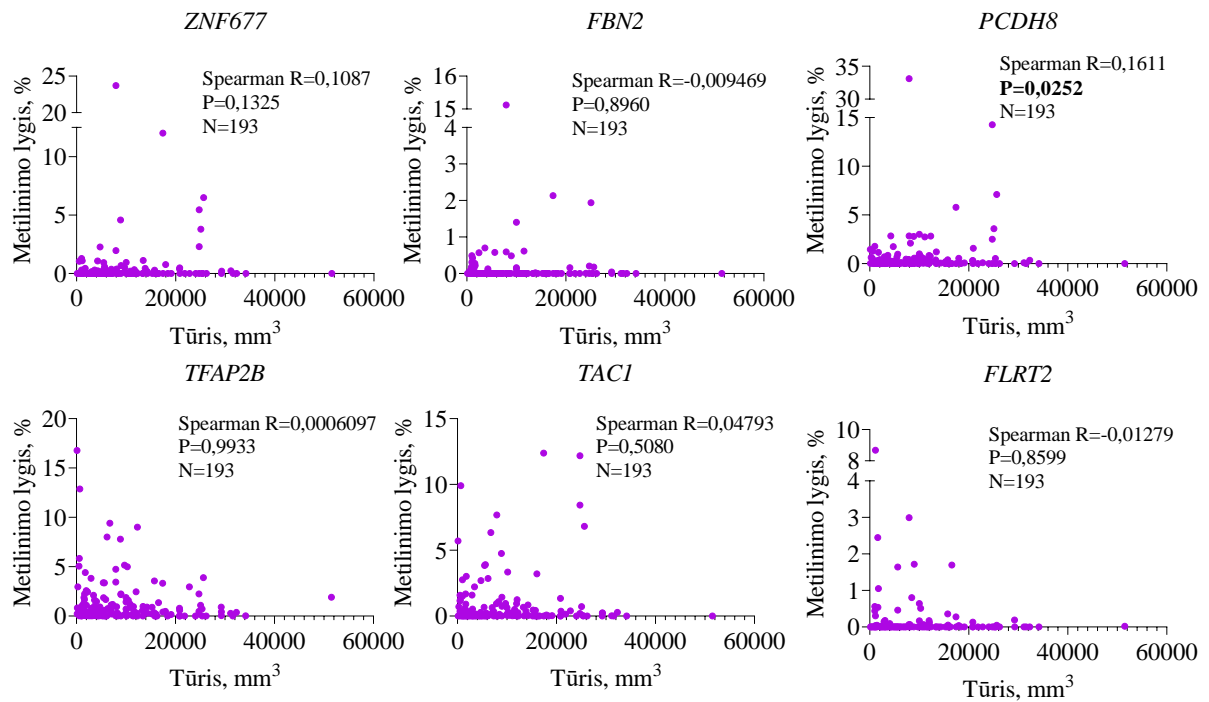
3 pav. A – genų metilinimo lygis skirtingose lytys. B – genų metilinimo lygio koreliacija su ligonių amžiumi. Reikšmingos P reikšmės (< 0,05) paryškintos.



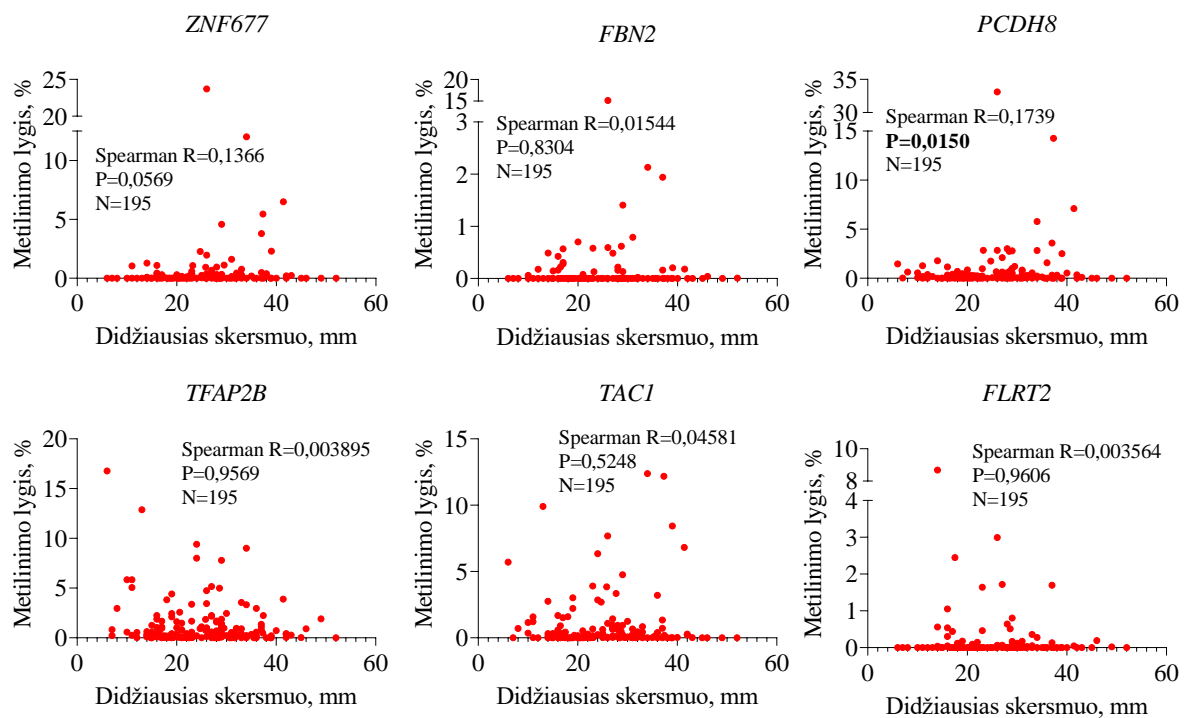
4 pav. A – genų metilinimo lygio skirtumai tarp nerūkančių (N) ir rūkančių ar anksčiau rūkusių (R). B – genų metilinimo lygio koreliacija su kūno masės indeksu (KMI). Reikšmingos P reikšmės (< 0,05) paryškintos.

A**B**

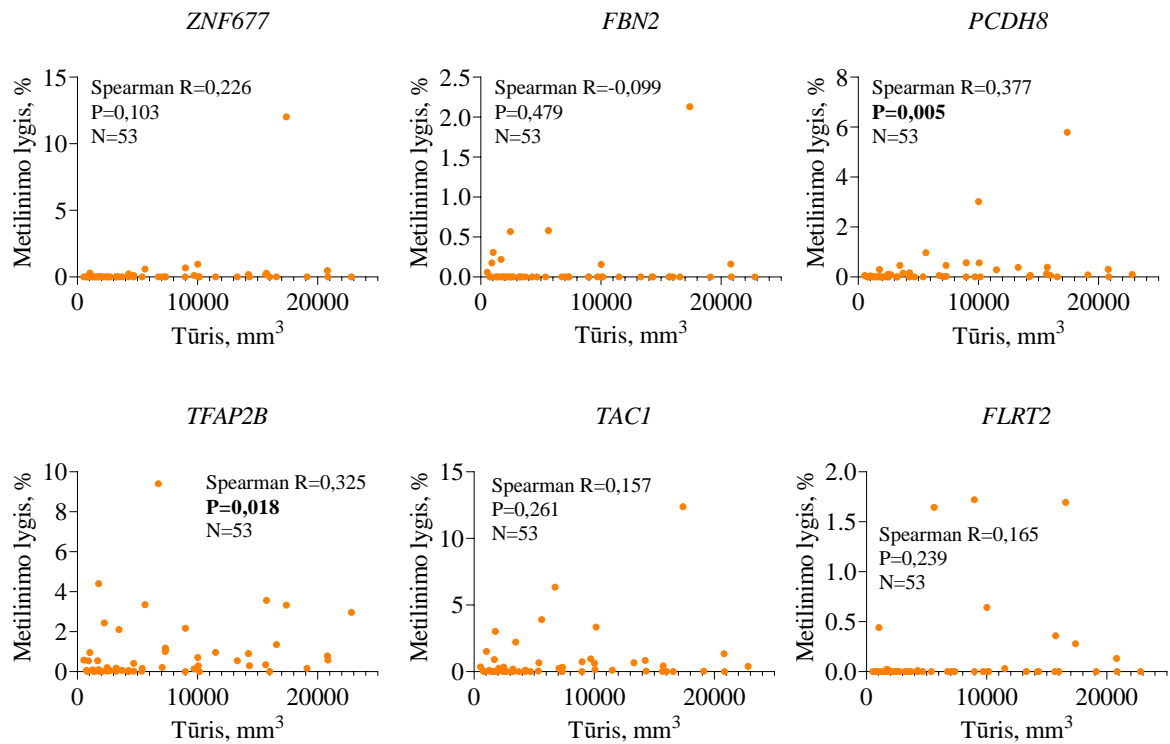
5 pav. Inkstų mažų navikų dydžio pokyčiai aktyvios stebėsenos metu, pirmo radiologo duomenys. A – vidutinis tūris skirtingų etapų metu, B – vidutinis didžiausias naviko skersmuo skirtingų etapų metu. * – nurodo statistiškai reikšmingą ($P < 0,05$) tūrio/didžiausio naviko skersmens skirtumą etapuose tarp stabiliai ir sparčiai augančių navikų, ** – nurodo statistiškai reikšmingą tūrio/didžiausio naviko skersmens skirtumą grupėje tarp pirmo ir sekančių etapų.



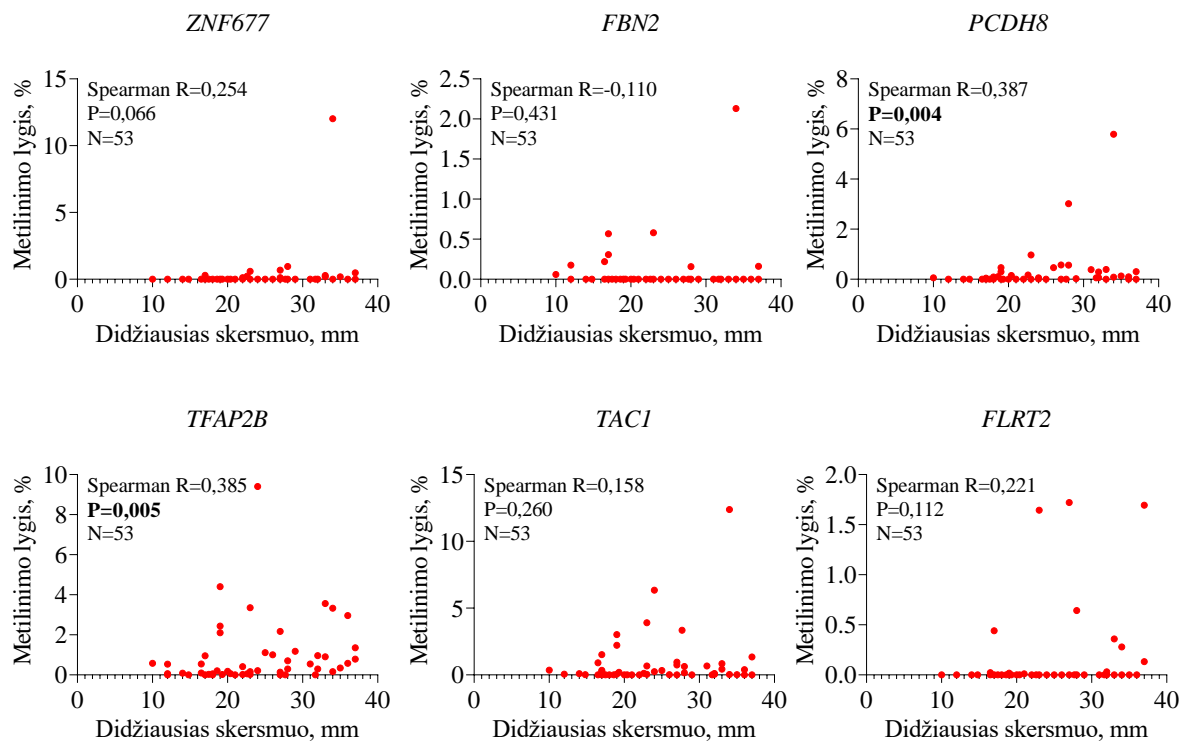
6 pav. Tirtų genų metilinimo lygio sąsajos su naviko tūriu analizė, pirmo radiologo duomenys. Reikšmingos P reikšmės (< 0,05) paryškintos.



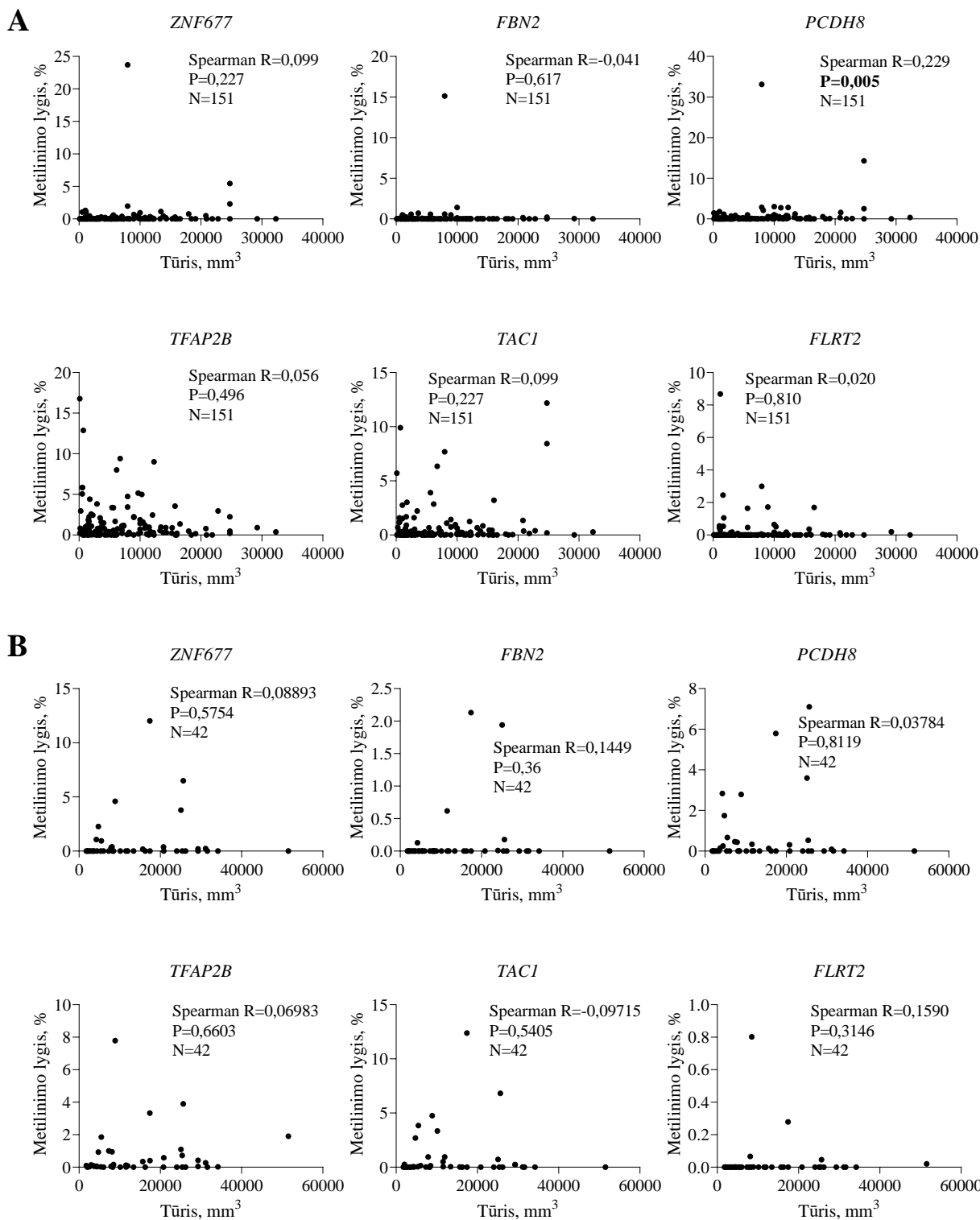
7 pav. Tirtų genų metilinimo lygio sąsajos su didžiausiu naviko skersmeniu analizė, pirmo radiologo duomenys. Reikšmingos P reikšmės (< 0,05) paryškintos.



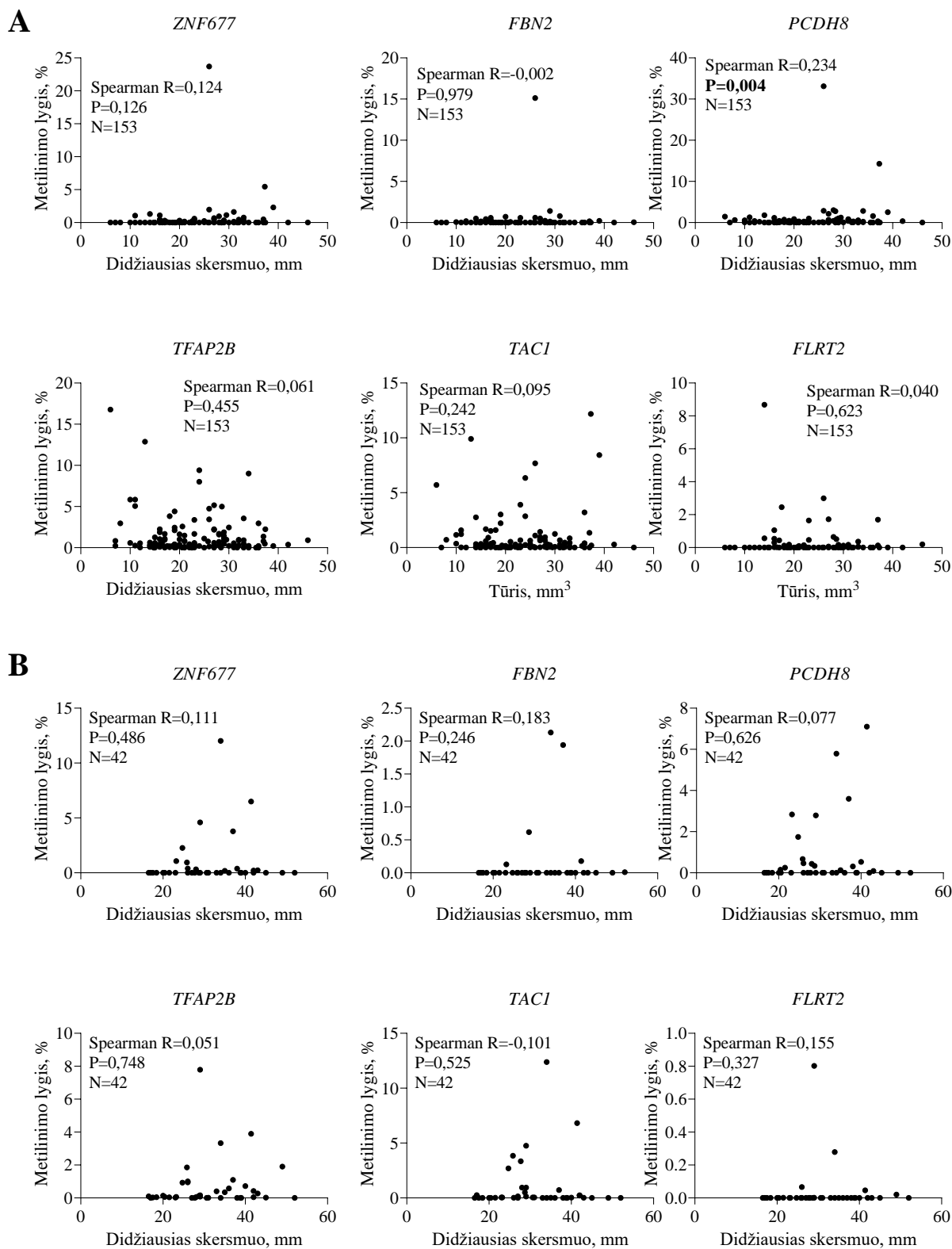
8 pav. Metilinimo lygio sąsajos su naviko tūriu diagnozės metu analizė, pirmo radiologo duomenys. Reikšmingos P reikšmės (< 0,05) paryškintos.



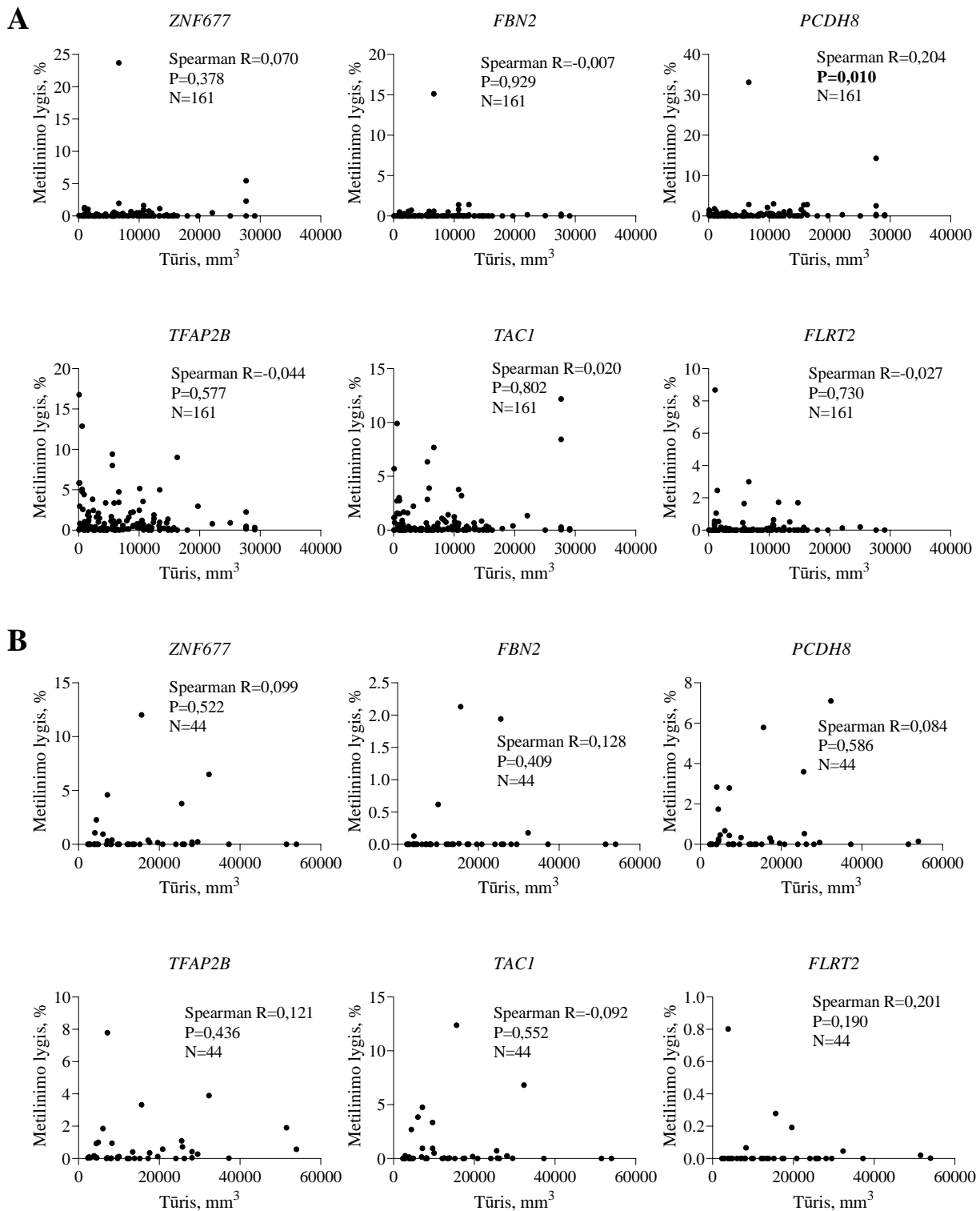
9 pav. Metilinimo lygio sąsajos su didžiausiu naviko skersmeniu diagnozės metu analizė, pirmo radiologo duomenys. Reikšmingos P reikšmės (< 0,05) paryškintos.



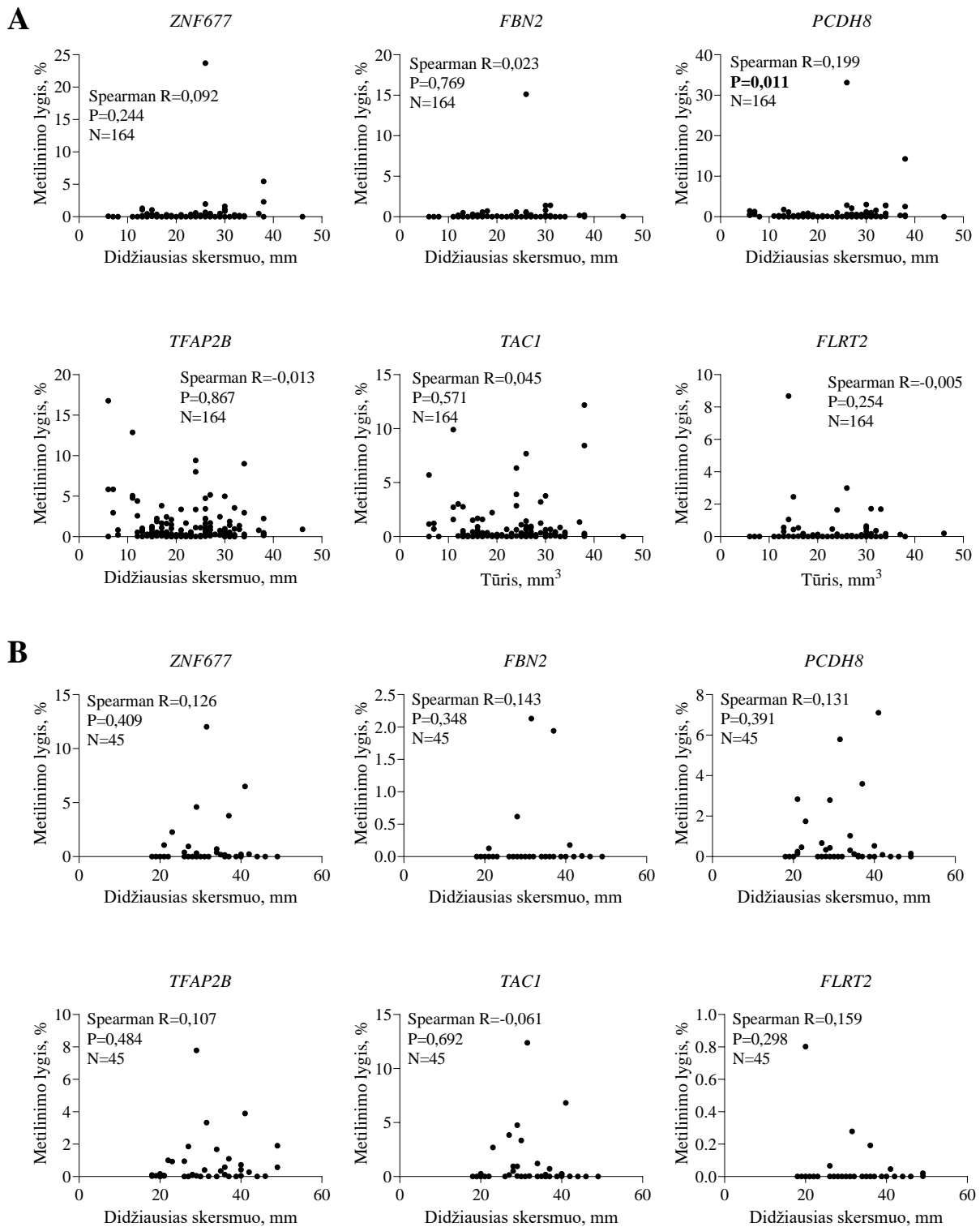
10 pav. Metilinimo lygio koreliacijos su naviko dydžiu skirtingose naviko augimo greičio grupėse analizė. Genų metilinimo lygio koreliacija su naviko tūriu pirmo radiologo duomenimis: A – stabilaus augimo navikai, B – spartaus augimo navikai. Reikšmingos P reikšmės paryškintos.



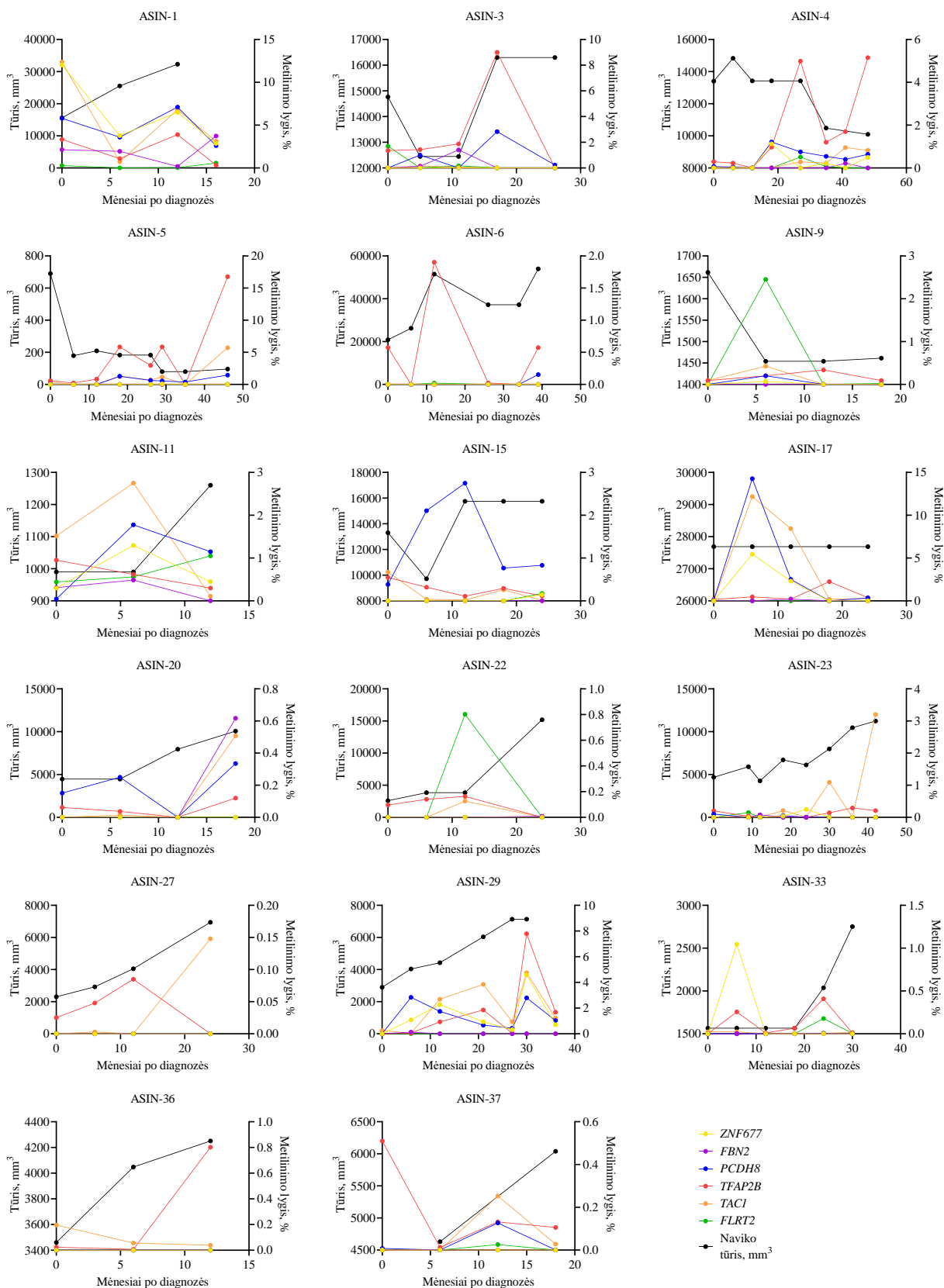
11 pav. Metilinimo lygio koreliacijos su naviko dydžiu skirtingose naviko augimo greičio grupėse analizė. Genų metilinimo lygio koreliacija su didžiausiu naviko skersmeniu pirmo radiologo duomenimis: A – stabilaus augimo navikai, B – spartaus augimo navikai. Reikšmingos P reikšmės paryškintos.



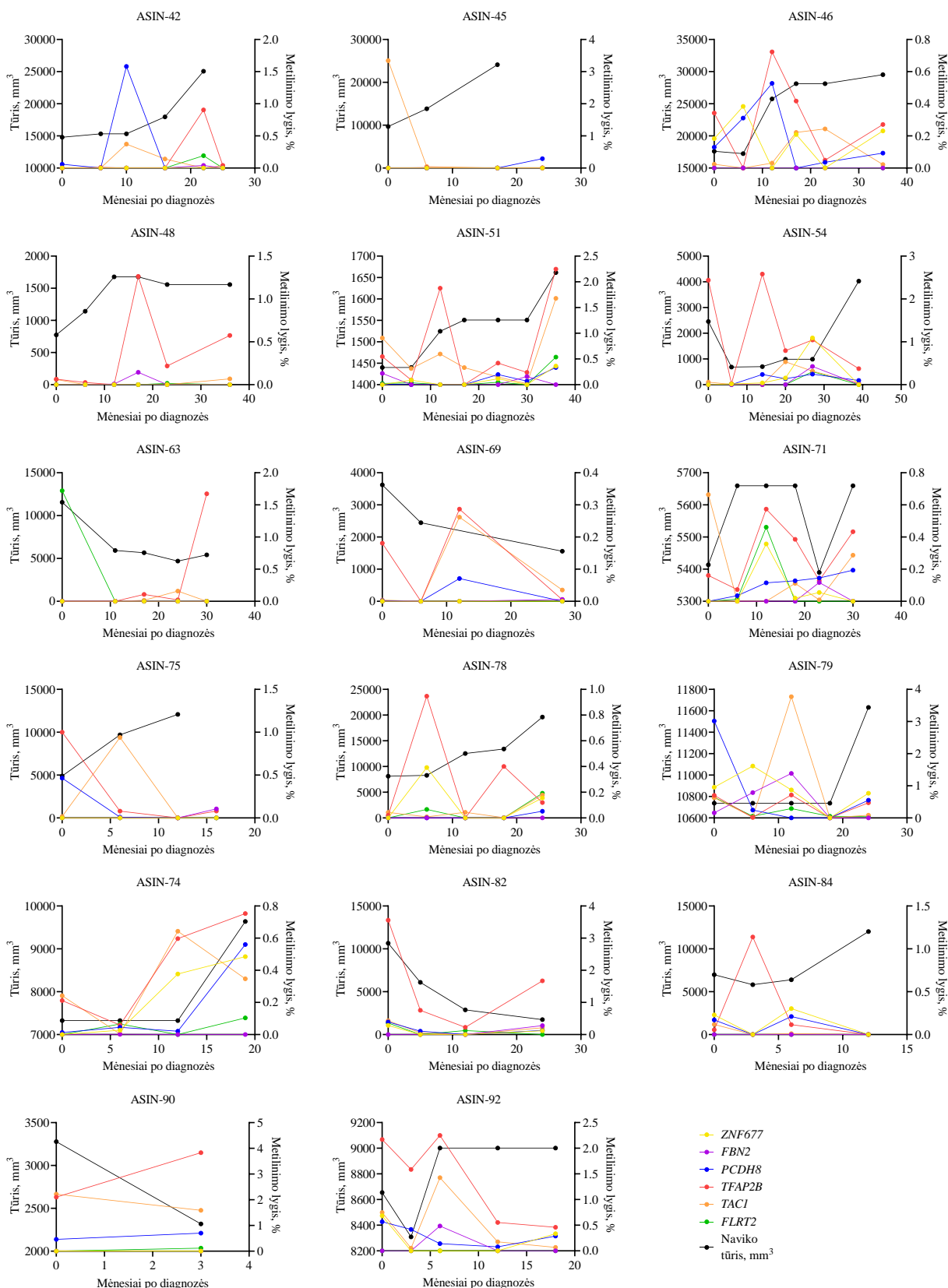
12 pav. Genų metilinimo lygio sąsajos su naviko tūriu skirtingose naviko augimo greičio grupėse analizė: A – stabilaus augimo navikai, B – spartaus augimo navikai. Antro radiologo matavimai. Reikšmingos P reikšmės (< 0,05) paryškintos.



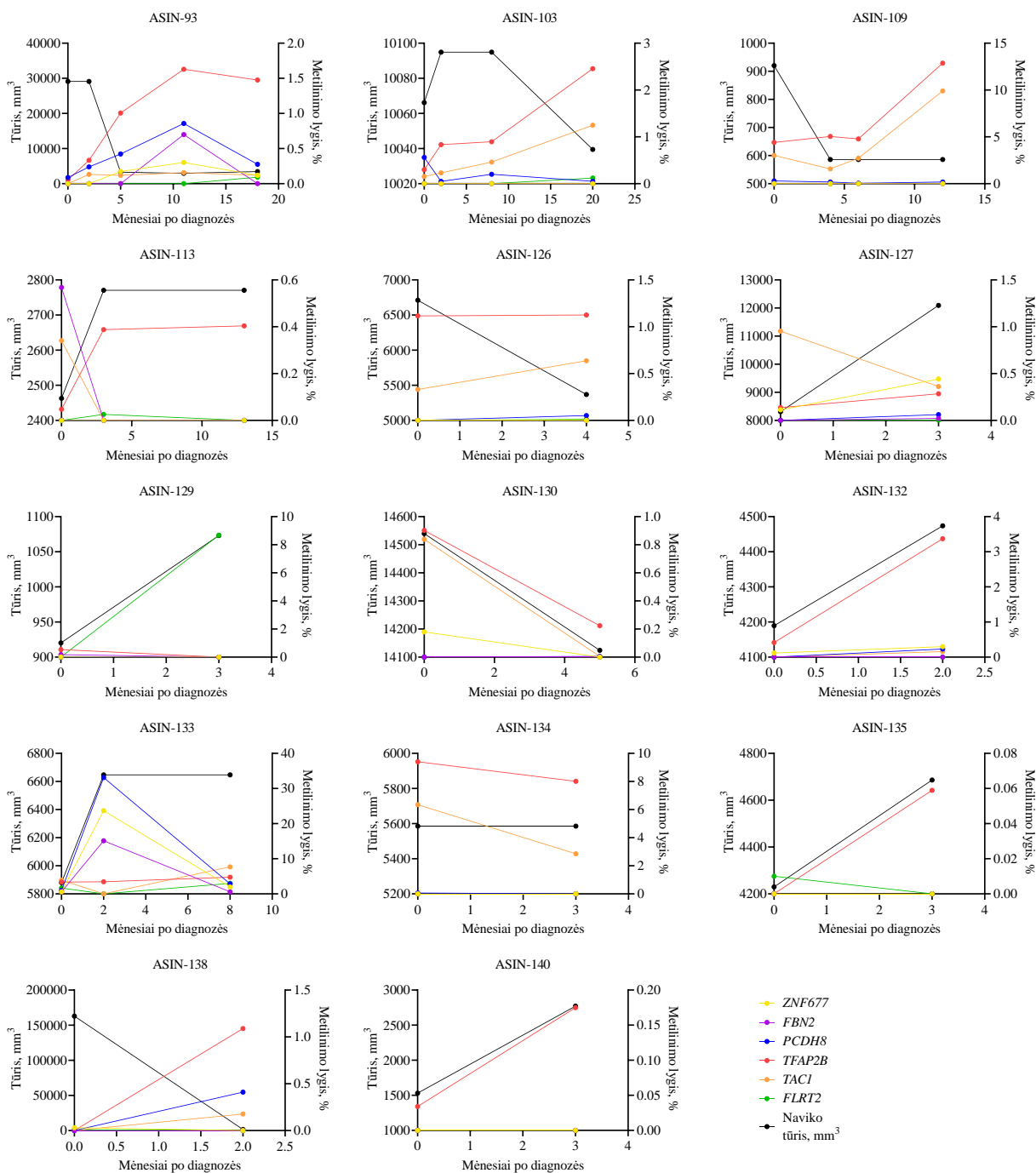
13 pav. Genų metilinimo lygio sąsajos su didžiausiu naviko skersmeniu skirtingose naviko augimo greičio grupėse analizė: A – stabilaus augimo navikai, B – spartaus augimo navikai. Antro radiologo matavimai. Reikšmingos P reikšmės (< 0,05) paryškintos.



14 pav. Individualių ligonių genų metilimo lygio sąsajos su naviko tūriu aktyvios stebėsenos metu. Antro radiologo matavimai. ASIN – ligonio kodas.



15 pav. Individualių ligonių genų metilinimo lygio sąsajos su naviko tūriu aktyvios stebėsenos metu. Antro radiologo matavimai. ASIN – ligonio kodas.



16 pav. Individualių ligonių genų metilinimo lygio sąsajos su naviko tūriu aktyvios stebėsenos metu. Antro radiologo matavimai. ASIN – ligonio kodas.