

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

JUSTAS BURAUSKAS

**STAT3 signalinio kelio genų raiškos tyrimas trejopai
neigiamo krūties vėžio ligonių kraujo plazmoje**

Magistro studijų baigiamasis darbas

Molekulinės biologijos studijų programa II kursas

Darbo vadovė:

Doc. Dr. Rasa Sabaliauskaitė

Darbo konsultantė:

Dokt. Agnė Šeštokaitė

2025

Turinys

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	4
IVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1 Krūties vėžys	8
1.1.1 Krūties vėžio epidemiologija	8
1.1.2 Krūties vėžio klasifikacija.....	9
1.2 Trejopai neigiamas krūties vėžys.....	11
1.3 Trejopai neigiamo krūties vėžio gydymas.....	13
1.4 STAT3 signalinis kelias.....	15
1.4.1 STAT3 genas ir jo aktyvacija.....	15
1.4.2 BCL-2 genas	17
1.4.3 R-RAS-2 genas.....	18
1.4.4 UPF3A genas.....	18
1.4.5 ALDH1A1 genas.....	19
1.4.6 NFIB genas.....	20
1.5 Genų raiškos tyrimo metodai skysčių biopsijoje	20
1.5.1 Atvirkštinės transkriptazės kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija	23
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	26
2.1 Medžiagos ir aparatūra.....	26
2.2 Tiriamoji pacienčių imtis.....	27
2.2.1 Tyrimo eiga	28
2.2.3 RNR skyrimas.....	28
2.2.4 Kopijinės DNR sintezė	28
2.2.5 AT-kPGR.....	30
2.2.6 Statistinė analizė	32
3.REZULTATAI.....	34
3.1 Genų raiška TKNV plazmos mėginiuose	34
3.2. Genų raiškos pokyčiai pacienčių gydymo eigoje	34
3.3 Genų raiškos skirtumų sąsajos su atsaku į gydymą ir klinikiniais rodikliais.....	35
3.3.1. Genų raiškos skirtumų ryšys su atsaku į gydymą	36
3.3.2. Genų raiškos skirtumų sąsajos su likutiniu naviku po gydymo NAC	36
3.3.3. Genų raiškos skirtumų sąsaja su diferenciacijos laipsniu	37
3.3.4 Genų raiškos pokyčių raiškos pokyčių sąsaja su CEA ir CA 15-3 rodikliais	38
3.4 Genų raiškos pokyčių sąsajos su pacienčių atsaku į gydymą.....	39
3.4.1. Genų raiškos pokyčių sąsaja su Ki67 % rodikliu	40
3.4.2. Genų raiškos pokyčiai atsaką į gydymą	40
3.4.3. Genų raiškos pokyčių sąsajos su likutiniu naviku prieš gydymą NAC	41
3.5 Genų raiškos pokyčių sąsaja su pacienčių išgyvenamumu.....	42
3.6 Genų raiškos pokytis gydymo eigoje TNKV progresijos atveju	45
3.7 TNKV biožymenų ROC kreivių analizė.....	46
4. REZULTATŲ APTARIMAS	48
5. Išvados	52
SANTRAUKA.....	53

SUMMARY.....	54
<i>Asmeninio indėlio aprašymas.....</i>	<i>55</i>
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	56

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ALDH1A1 – aldehido dehidrogenazės 1 šeimos narys A1 (angl. *Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1*)

AT-kPGR – atvirkštinės transkripcijos kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (angl. *reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction*)

BCL-2 – B ląstelių limfomos 2 genas (angl. *B-cell lymphoma 2*)

EMT – epitelinių ląstelių transformacija į mezenchimines (angl. *epithelial-to-mesenchymal transition*)

ER – estrogeno receptoriai (angl. *estrogen receptors*)

GRS – genų raiškos skirtumas

HER2 – žmogaus augimo faktoriaus 2 receptorių (angl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

kDNR – kopijinė DNR (angl. *copy DNA*)

KV – krūties vėžys (angl. *breast cancer*)

NA – nepilnas atsakas (angl. *Incomplete response*)

NFIB – branduolinio faktoriaus I transkripcijos faktorius B (angl. *nuclear factor 1 B-type*)

NMD – iRNR translacijos patikros mechanizmas (angl. *nonsense-mediated mRNA decay*)

NRD – nėra likutinio naviko (angl. *no residual disease*)

PR – progesterono receptorių (angl. *progesterone receptor*)

PA – pilnas atsakas (angl. *complete response*)

RD – likutinis navikas (angl. *residual disease*)

R-RAS-2 – su RAS susijusio baltymo 2 genas (angl. *RAS related 2*)

STAT3 – signalo keitiklis ir transkripcijos aktyvatorius 3 (angl. *signal transducer and activator of transcription 3*)

TNKV – trejopai neigiamas krūties vėžys (angl. *triple-negative breast cancer*)

UPF3A – iRNR translacijos patikros mechanizmo reguliatoriaus 3A genas (angl. *regulator of nonsense mediated mRNA decay*)

IVADAS

Krūties vėžys (KV) yra labiausiai paplitęs vėžinis susirgimas moterų grupėje ir užimantis antrą vietą tarp vėžinių susirgimų visame pasaulyje – 12 % visų vėžio atvejų – 2,3 mln. susirgimų (vyrų ir moterų grupėje; 2022 m. internetinė prieiga: <https://www.who.int/>).

Trejųpiai neigiamas krūties vėžys (TNKV) yra agresyviausias KV potipis pasižymintis ypač dideliu mirtingumo dažniu (iki 40 %), kuris sudaro 12–18 % visų krūties vėžio atvejų. Vėžiniai susirgimai pasireiškia jaunesniame nei 40 m. amžiuje, dideliu navikinių ląstelių diferenciacijos laipsniu, vėlyvesne diagnoze ir dideliu mitoziniu aktyvumu. TNKV taip pat greitai auga ir geba išplisti į gretimus audinius (krūtinplėvę, plaučius, kepenis bei kaulus). Svarbiausias TNKV požymis, lemiantis ribotą terapijų skaičių, yra estrogeno receptorių (ER), progesterono receptorių (PR), ir žmogaus epidermio augimo faktoriaus 2 receptorių (HER2) trūkumas, dėl ko negali būti taikoma hormonų terapija. Dėl šios priežasties, pagrindinis gydymas TNKV pacientėms išlieka chemoterapija, tačiau šis gydymas nėra visuomet veiksmingas, kadangi 30–50 % pacienčių pasireiškia atsparumas chemoterapijai (Kim et al. 2018).

Ankstyva atsparumo chemoterapiniams vaistams diagnostika gali padėti iš anksto nustatyti vėžinių ląstelių jautrumą tinkamiems vaistams ir optimizuoti klinikoje taikomą gydymą. Tobulėjant laboratoriniams metodams atsirado galimybė identifikuoti genus, biožymenis ir pagrindinius komponentus, kurie lemia navikinių ląstelių atsparumą chemoterapiniam gydymui. Atsparumo chemoterapijai tyrimai dažniausiai yra vykdomi su navikinių ląstelių kultūromis, kurie atliekami įvertinti, ar naviko augimas yra slopinamas chemoterapiniais vaistais, naudojant įvairius žymenis, kurie padeda įvertinti vaistų efektyvumą. Tačiau dėl didelio TNKV navikinių ląstelių heterogeniškumo yra sudėtinga atkartoti gautus rezultatus *in vivo* ir reikalinga chirurginė intervencija bei ilgos laiko sąnaudos. Tokiems tyrimams gali būti naudojama skysčių biopsija.

Skysčių biopsijos mėginiai yra laikomi visi kūno skysčiai, įskaitant ir kraujo mėginius. Kraujo skysčių biopsija yra ypač patrauklus metodas, kadangi mėginiai yra surenkami minimaliai invaziniu būdu, todėl juos galima naudoti sekant pacientų būseną viso gydymo kurso metu (Ulukaya et al., 2021; Ramos et al., 2021;). Serijinė skysčių biopsijos mėginių analizė yra vienas iš būdų leidžiantis įvertinti pacientų būklę ligos gydymo metu. Tokių serijinių mėginių ėmimas gydymo eigoje, naudingas, padedant gydytojams suprasti

molekulinius pokyčius vykstančius navikuose ir jų daromą poveikį gydymui, ligos progresijai ar atsinaujinimui. Labiausiai paplitęs skysčių biopsijos mėginys, kuris naudojamas molekulinių žymenų tyrimams, yra kraujo plazma (Mithraprabhu et al. 2021).

Genų raiškos pokyčiai yra vieni iš potencialių žymenų, kurie gali būti aptinkami skysčių biopsijoje ligos gydymo eigoje. *UPF3A* (angl. *regulator of nonsense transcripts 3A*), (angl. *B-cell lymphoma-2*), *R-RAS-2* (angl. *Ras-related protein 2*), *NFIB* (angl. *nuclear factor I B*) ir *ALDH1A1* (angl. *aldehyde dehydrogenase 1a1*) padidėjusi genų raiška siejama su prastesne ligos eiga, atsparumu chemoterapijai ir spartesniu vėžio vystymusi. Šie genai yra transkripcijos veiksniai, kurių raiškos pokyčiai dažnai pastebimi vėžiniuose susirgimuose įskaitant ir TNKV. *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *NFIB* ir *ALDH1A1* genai veikia *STAT3* (angl. *signal transducer and activator of transcription 3*) signaliniame kelyje, o *STAT3* yra vienas iš labiausiai ištirtų onkogeninių transkripcijos faktorių, kurio raiškos pokyčiai, siejami su atsparumu chemoterapijai. *STAT3* geba tiesiogiai ir netiesiogiai reguliuoti daugelio genų susijusių su ląstelių išgyvenamumu raišką, įskaitant *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *NFIB* ir *ALDH1A1* (Kim et al. 2018). Dėl minėtų priežasčių, šių genų raiškos pokyčiai kraujo plazmos mėginiuose galėtų būti naudojami kaip neinvaziniai molekuliniai žymenys, leidžiantys įvertinti atsaką į gydymą, ligos progresijos riziką.

Darbo tikslas – įvertinti su *STAT3* signaliniu keliu susijusių genų raiškos pokyčius TNKV pacienčių kraujo plazmoje gydymo chemoterapija eigoje ir įvertinti jų tinkamumą atsako į gydymą vertinimui bei ligos progresijos prognozavimui.

Darbo uždaviniai:

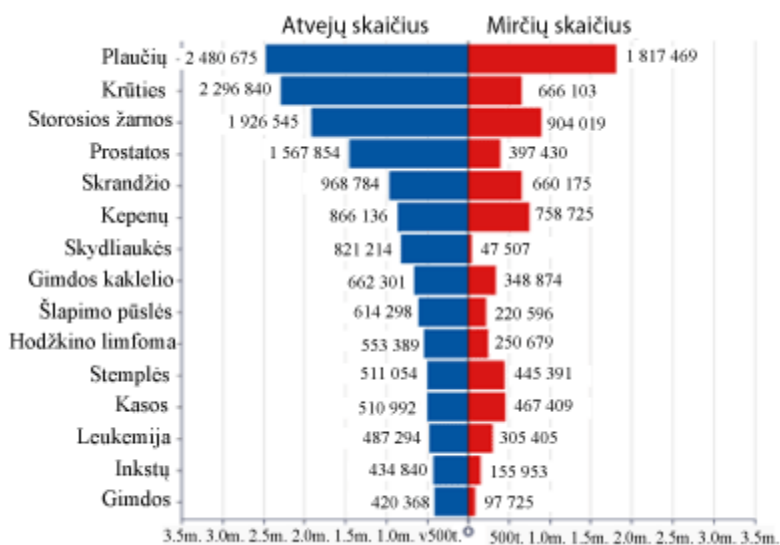
1. Nustatyti ar *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB*, *ALDH1A1* genų raišką kinta gydymo eigoje TNKV pacienčių kraujo plazmos mėginiuose;
2. Įvertinti genų raiškos skirtumų sąsajas su TNKV pacienčių atsaku į gydymą;
3. Nustatyti genų raiškos pokyčių sąsajas su TNKV pacienčių klinikiniais rodikliais;
4. Susieti genų raiškos pokyčius su TNKV pacienčių ligos prognoze.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Krūties vėžys

1.1.1 Krūties vėžio epidemiologija

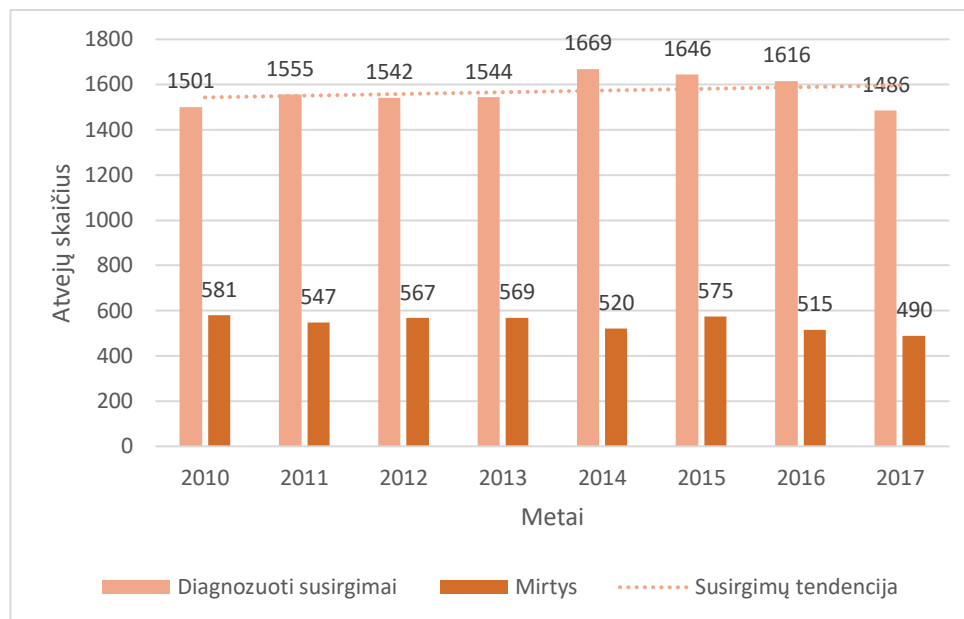
Krūties vėžys yra vienas dažniausiai diagnozuojamų vėžinių susirgimų, užimantis antrą vietą po plaučių vėžio. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO, <https://gco.iarc.fr/today/home>) duomenimis 2022 m. buvo nustatyta 2,3 mln. krūties vėžio (KV) susirgimų, tuo tarpu mirčių fiksuota 4-is kartus mažiau (666 tūkst.). Mirtingumas nuo krūties vėžio, pagal PSO duomenis, yra 4-oje vietoje po plaučių, storosios žarnos ir kepenų (1.1 pav.) (Anon n.d.-c; Sung et al. 2021). Tačiau, moterų grupėje KV yra dažniausias ir daugiausiai mirčių lemiantis onkologinis susirgimas.



1.1 pav. Dažniausiai nustatomų vėžio susirgimų ir mirčių pasiskirstymas pasaulyje vyrų ir moterų grupėse 2022 m. (pritaikyta pagal: *International Agency for Research on Cancer (Cancer, n. d.)*)

Nacionalinio Vėžio Instituto Vėžio registro duomenimis (2017 m.) Lietuvoje KV buvo trečias (9 %) pagal dažnumą ir šeštas (6 %) pagal mirtingumą visose vyrų ir moterų amžiaus grupėse. Tačiau visose moterų amžiaus grupėse KV užėmė pirmąją vietą pagal dažnumą

(19,5 %) ir pagal mirtingumą (14 %) kaip ir pasaulyje (1.2 pav.) (Nacionalinio Vėžio Instituto Vėžio registras, pagal internetinę prieigą: <http://www.nvi.lt/>).



1.2 pav. Diagnozuotų krūties vėžio susirgimų ir mirčių skaičius 2010–2017 m. Lietuvoje (standartizuotas pagal amžių) (parengta pagal Nacionalinio vėžio instituto vėžio registrą, internetinė prieiga: <https://www.nvi.lt/naujausi-duomenys/>)

1.1.2 Krūties vėžio klasifikacija

Molekulinė klasifikacija yra pažangus KV klasifikavimo būdas pagrįstas naviko biologija, genų raiškos profiliais ir specifinių baltymų nustatymu (+) arba ne (-) KV audiniuose. Estrogeno receptoriai (toliau – ER), progesterono receptoriai (toliau – PR) ir tirozino kinazė – HER-2 (nuo angl. *human epidermal growth factor receptor 2*) yra pagrindiniai žymenys, kurie naudojami įvertinti naviko molekulinį potipį (Eliyatkin et al. 2015). Toks klasifikavimo būdas, padeda geriau suprasti ligos eigą ir parinkti tikslią terapiją, o krūties vėžys išskiriamas į keturias grupes: luminalinis A, luminalinis B, HER-2 ir trejopai neigiamas krūties vėžys (TNKV)).

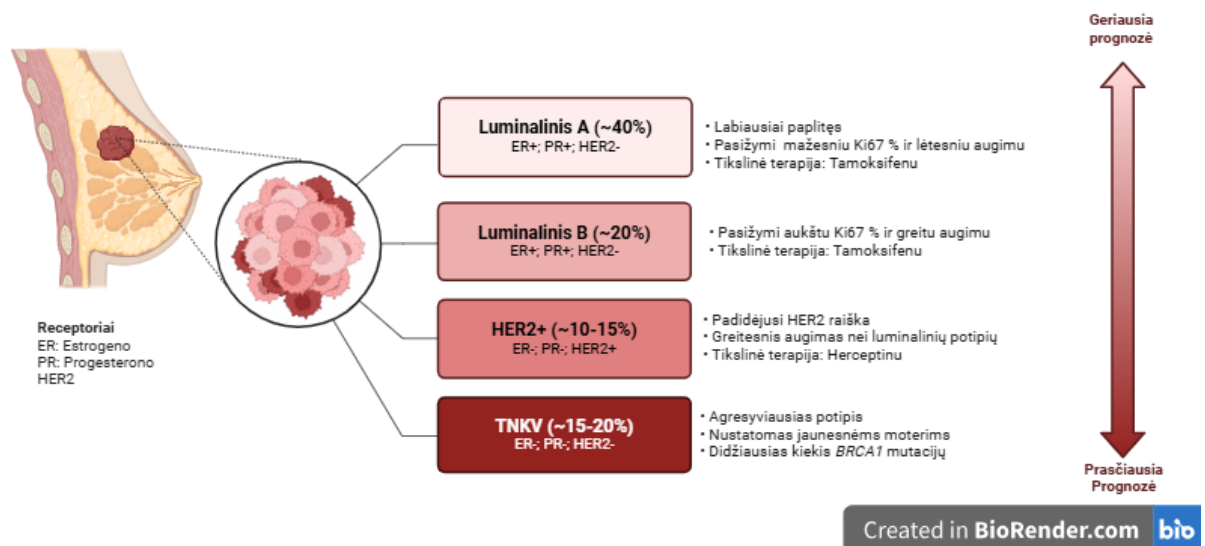
Luminalinis A (ER+; PR+ ir HER-2-) labiausiai paplitęs KV potipis, kuris yra linkęs lėtai augti ir yra mažai agresyvus. Navikai dažniausiai reaguoja į hormoninę terapiją, dėl išreikštų receptorių, kuriuos galima veikti vaistiniais preparatais pvz., tamoksifenu. Pacientai

sergantys šiuo potipiu pasižymi geresniu išgyvenamumu ir mažesniu Ki67 % (< 14 %) (80 – 85 % 5 m. išgyvenamumo tikimybė) (Zubair, Wang, and Ali 2021; Feeley et al. 2014).

Luminalinis B (ER+; PR+ ir HER-2-) sudaro apie 20 % visų KV atvejų. Šio tipo navikai pasižymi greitesniu augimu ir yra agresyvesni. Luminalinis B potipis yra siejamas su prastesne ligos prognoze ir dideliu Ki67 % (≥ 14 %) lyginant su luminaliniu A potipiu. Kadangi pacientai yra mažiau jautrūs hormonų terapijai dėl ko dažniau taikomas kombinuotas gydymas, įskaitant chemoterapiją (Dwivedi et al. 2019).

HER-2 (+) (ER-; PR- ir HER-2+) sudaro 17 % visų KV atvejų ir yra siejamas su agresyvesne ligos vystymosi eiga, dėl perteklinio HER2 baltymo kiekio ant vėžinių ląstelių paviršiaus. Nors HER2 (+) yra agresyvesnis nei Luminalinis A ir B tipas, tikslinė terapija (pvz. herceptinas, pertuzamabas) pagerina pacientų išgyvenamumo rodiklius (Dwivedi et al. 2019).

Pagrindinis požymis kuriuo TNKV skiriasi nuo kitų krūties vėžinio susirgimų yra PR, ER ir HER-2 trūkumas, dėl ko pacientėms negali būti taikoma hormonų terapija (1.3 pav).



1.3 pav. Molekuliniai krūties vėžio potipiai (parengta naudojant „BioRender“) (Singh and Yadav 2021).

1.2 Trejopai neigiamas krūties vėžys

Trejopai neigiamas krūties vėžys yra vienas iš agresyviausių KV potipių, sudarantis nuo 15 % iki 20 % visų krūties vėžio atvejų ir pasižymintis ženkliai didesniu mirtingumo dažniu (~ 40 %) (Almansour 2022; Kim et al. 2018). TNKV dažnai diagnozuojamas jaunesnėms moterims (iki 40 m. amžiaus) ypač turinčioms *BRCA1* mutacijas, liga siejama su vėlyva diagnoze, didesne tikimybe metastazuoti ir didelius naviko diferenciacijos laipsniu. TNKV agresyvumą lemia, spartus vėžinių ląstelių augimas ir plitimas į gretimus audinius (plaučius, kepenis, krūtinplėvę ir kaulus) (Hon et al. 2016). TNKV pacientai yra nejautrūs hormonų ir į HER2 nukreiptą terapiją, kadangi navikinės ląstelės neturi estrogeno receptorių (ER–), progesterono receptorių (PR–) ir HER2 baltymo (HER2–). Todėl chemoterapija išlieka pagrindine gydymo forma, deja, bet gydymas pasireiškia ribotu efektyvumu, nes iki 50 % pacienčių išsivysto atsparumas gydymui, kas lemia didesnę mirtingumo dažnį (Kim et al. 2018).

TNKV nėra vienalytis vėžio tipas ir remiantis raiškos profiliais yra skirstomas į 6 potipius: bazalinio tipo 1 ir 2 (BT1 ir BT2), mezenchiminis (M), mezenchiminių kamieninių ląstelių tipo (MSL), luminalinis androgenų receptorių (LAR) ir imunomodulatorinis (IM) (Lehmann et al. 2011; Lehmann and Pietenpol 2015).

BT1 taip vadinamas dėl navikinių ląstelių panašumo į bazalinio sluoksnio ląsteles, kurios sudaro krūties latakus. Šis potipis yra itin agresyvus ir linkęs greitai progresuoti. Navikinės ląstelės pasižymi padidėjusia ląstelių ciklo ir DNR pažeidimų taisymo komponentų raiška, dėl kurios nustatomas padidėjęs ląstelių dalijimosi dažnis. BT1 potipis yra jautrus chemoterapinam gydymui taksanais (doksirubicinu ir paklitakseliu) dėl padidėjusios replikacijos genų raiškos (Lehmann et al. 2011; Lehmann and Pietenpol 2015).

BT2 potipyje nustatoma padidėjusi augimo faktorių NGF (angl. *nerve growth factor*) EGF (angl. *epidermal growth factor*) raiška ir pakitusi MET (angl. *mesenchymal–epithelial transition*) aktyvacija. Taip pat BT2 potipiui būdinga padidėjęs glikolizės ir gliukoneogenezės laipsnis. Būtent dėl pakitusios MET aktyvacijos navikas yra labiau linkęs progresuoti į kitus audinius ir metastazuoti, todėl manoma navikas yra mažiau linkęs reaguoti į chemoterapiją (Hon et al. 2016; Lehmann et al. 2011).

M potipis apibrėžiamas padidėjusiu ląstelių plastiškumu ir invazyvumu, dėl pokyčių siejamų su ląstelių judrumu (reguliuojamų RHO (angl. *ras homologous*) aktino). Šis potipis glaudžiai susijęs su EMT (angl. *epithelial–mesenchymal transition*), kas lemia vėžinių ląstelių agresyvumą ir atsparumą gydymui.

MSL potipis kaip ir M potipis, pasižymi pokyčiais genuose, siejamuose su ląstelės judrumu. MSL potipiui, būdingos mutacijos angiogenezę skatinančiuose genuose ir augimo faktorių receptoriuose, taip pat inozitolio fosfato (IP3) metabolizme. Tačiau MSL potipiui būdinga maža su ląstelės nevaldomu dalijimusi susijusių genų raiška, priešingai nei M potipiui.

LAR potipiui būdinga ženkliai didesnė (9 kartus) androgenų receptoriaus iRNR raiška lyginant su kitais potipiais. Taip pat padidėjusia hormoninių signalinių kelių aktyvacija, įskaitant steroidų ir porfirino sintezę, androgeno bei estrogeno metabolizmu. Skirtingai nuo kitų TNKV potipių LAR potipis pasižymi lėtesniu augimu ir mažesniu agresyvumu (Lehmann et al. 2011).

IM yra potipis pasižymintis stipresniu imuninio atsako reguliavimu. Navikinėse ląstelėse nustatomos mutacijos genų, dalyvaujančių imuniniame organizmo atsake. Šis potipis išsiskiria dėl aktyvaus imuninės sistemos komponentų tokių kaip T-limfocitų ir B-limfocitų aktyvacijos ir pokyčių.

Be receptorių trūkumo TNKV pacientai pasižymi dideliu somatinių mutacijų dažniu. Nustatomos dažnos *TP53* mutacijos (83 %) ir sudėtingi aneuploidiniai pertvarkymai (80 %), dėl kurių atsiranda didelis heterogeniškumas tarp sergančiųjų ir net skirtingose naviko zonose (J.J. Qin et al., 2019). Dėl šio heterogeniškumo dažnai pastebimas stiprus šalutinis poveikis chemoterapijai ar net atsparumas, dėl kurio manoma, yra ribotas chemoterapijos efektyvumas (Kim et al. 2018), todėl skiriama daug pastangų, siekiant nustatyti molekulinis prediktyvinius ir prognostinius žymenis TNKV pacientams. Vienas iš tokių žymenų yra *STAT3* (angl. *signal transducer and activator of transcription 3*) genas ir jo signaliniame kelyje dalyvaujantys komponentai, kuris pasižymi didele raiška KV navikiniuose mėginiuose bei pakitusiu aktyvavimu (J.-J. Qin et al. 2019).

1.3 Trejopai neigiamo krūties vėžio gydymas

TNKV gydymas išlieka sudėtingas dėl vėžio biologinių savybių (ER-, PR-, HER2-). Chemoterapija išlieka pagrindiniu gydymo metodu, ypač ankstyvosiose vėžio stadijoje, tačiau yra naudojami ir kiti gydymo būdai, pvz. imunoterapija. Abiem atvejais pacientai vartoja vaistus, norint sustabdyti vėžio augimą ir plitimą, tačiau tai pasiekama skirtingais būdais. Imunoterapija stiprina paciento, sergančio vėžiu, imuninės sistemos veikimą, tam kad ją nukreiptų į vėžines ląsteles, o tuo tarpu chemoterapija veikia visas organizmo ląsteles.

Chemoterpija veikia visą žmogaus kūną sukeliant pažaidas ir mirties procesus vėžinėse ląstelėse, taip slopinant jų dalijimąsi bei plitimą. Gydymas gali būti taikomas prieš operaciją siekiant sumažinti naviką prieš chirurginę intervenciją (neoadjuvantinė chemoterapija), arba po operacijos, siekiant sunaikinti likusias vėžines ląsteles (adjuvantinė terapija). Taip pat, chemoterapija gali būti kombinuojama ir cikliškai taikoma su priešvėžiniais vaistais, kaip pvz., doksirubicinu, paklitakseliu, ciklofosfamidu karboplatina, ir kt.

Doksorubicinas yra antraciklinų šeimos priešvėžinis preparatas, kuris šiuo metu yra veiksmingiausias chemoterapinis vaistas KV gydyti. Doksorubicinas pasižymi navikų vystymąsi slopinančiu aktyvumu. Šis junginys patekęs į ląstelės vidų keliauja į branduolį, kur gali jungtis su DNR ir užkirsti kelią replikacijai. Tačiau buvo įrodyta, kad doksorubicinas tam tikrais atvejais geba sukelti atsparumą vaistams ir net paskatinti navikų augimą, kas blogina pacientų išgyvenamumo prognozę. Manoma, jog PI3K / AKT (angl. *phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B*) ir MAPK (angl. *mitogen-activated protein kinase*) signalinių kelių sąveika geba skatinti atsparumą doksorubicinui dėl ko yra paskatinama ląstelių proliferacija, ląstelės ciklo progresavimas ir apoptozės kelio užkirtimas. Vienas iš manomų mechanizmų yra MAPK / ERK (angl. *extracellular-signal-regulated kinase*) signalinių kelių sąveika (Christowitz et al. 2019).

Paklitakselis vaistas, priklausantis taksanų šeimai. Veikimas nukreiptas skatinant vėžinių ląstelių apoptozę per poveikį tubulinui. Tubulinas yra baltymas, kuris geba polimerizuotis į ilgas grandines, kurios suformuoja mikrovamzdelius veikiančius kaip ląstelių citoskeletas. Taksanų šeimos vaistai gali jungtis prie tubulino ir blokuoti mikrovamzdelių išardymą. Tai sutrikdo jų dinamiką, sukelia mitozės sustojimą ir blokuoja ląstelių dalijimąsi, kas galiausiai sukelia apoptozę. Tačiau yra nustatyta, jog paklitakselis veikia ir mitochondrijas, slopindamas apoptozės slopiklio baltymą BCL-2. Paklitakselis, kaip ir

daugelis priešvėžinių vaistų, nėra visiškai efektyvus ir tam tikromis sąlygomis gydomiems šiuo cheminiu vaistu nustatomas atsparumas. Pavyzdžiui, žinoma, kad paklitakselis gali sukelti daugybinį atsparumą vaistams, veikdamas per šiuos ląstelių mechanizmus: skatindamas padidėjusią ABC baltymo (*angl. ATP-binding cassette transporter*) raišką tarpląstelinuose nešikliuose, sukeldamas pokyčius β -tubulino ir tubulino genų mutacijas surišimo regionuose bei slopindamas su apoptoze susijusių baltymų raišką (pvz., BCL-2 ir TP53) (Barbuti and Chen 2015).

Karboplatina yra „antrosios kartos“ (20 % mažesnis mirtingumas nuo KV, palyginti su pirmosios kartos vaistais) platinos junginys, pasižymintis mažesniu toksiškumu nei cisplatina. Cisplatina ir karboplatina, yra platinos analogai naudojami pacientams, sergantiems onkologinėmis ligoms gydyti. Abu preparatai turi platų klinikinio panaudojimo spektrą ir, nors abiejų junginių sukeliamas ląstelės apoptozės mechanizmas yra panašus, buvo įrodyta, jog cisplatina yra veiksmingesnė gydant konkrečius naviko tipus. Tuo tarpu karboplatina siejama su palankesniu toksiškumo profiliu, tačiau tai dažniausiai lemia, jog šis vaistas yra tik iš dalies veiksmingas specifiniams navikams (Ho, Woodward, and Coward 2016).

Karboplatina veikia kaip alkiliantis junginys, gebantis surišti ir sujungti DNR, todėl replikacijos metu DNR grandinėje yra sukeliamos pažaidos ir tokiu būdu ląstelėje slopinamas dalijimosi procesas. Šiuo metu tiksliai nėra išaiškinti biocheminiai mechanizmai susiję su karboplatina ir jautrumu šiam vaistui, bet manoma jog vienas iš šių mechanizmų veikia per TP53 šeimos baltymą TP63. Šis baltymas kontroliuoja nuo TP73 priklausomo karboplatinės jautrumo kelią. *In vivo* buvo pastebėta, jog TP63 ir TP73 izoformų (Δ Np63 ir TAp73, atitinkamai) raiška buvo išskirtinai TNKV ląstelėse, kurios pasižymėjo TP53 inaktyvacija. Vėžinės ląstelės, pasižyminčios Δ Np63 α ir TAp73 raiška, yra linkusios turėti jautrumą cisplatinai, kas priklauso nuo TAp73. Δ Np63 skatino KV ląstelių išgyvenimą, surišdama TAp73 ir taip slopindama jo apoptozę skatinantį aktyvumą. Cisplatina geba atskirti Δ Np63 nuo TAp73, kas lemia baltymo aktyvaciją ir apoptozę skatinančių Bcl-2 šeimos narių indukciją ir ląstelių apoptozę (Leong et al. 2007).

Ciklofosfamidą dar žinomas kaip citoksaną yra priešvėžinis preparatas, azoto garstyčių darinys (*angl. nitrogen mustard*), kuris yra DNR alkiliantis junginys. Vaistas nėra specifiškas ciklo fazėms ir metabolizmo metu yra skaidomas į aktyvią formą (aldofosfamidą), gebančią slopinti baltymų sintezę per DNR ir RNR suliejimą. Apoptozę reguliuojančių genų (TP53, CASP3 (*angl. caspase-3*), BCL-2, BCL-X (*angl. B-cell lymphoma-extra large*))

mutacijos yra siejamos su cheminiu atsparumu chemoterapiniams preparatams įskaitant: ciklofosfamidą ir doksorubiciną (O'Reilly et al. 2015).

1.4 STAT3 signalinis kelias

1.4.1 STAT3 genas ir jo aktyvacija

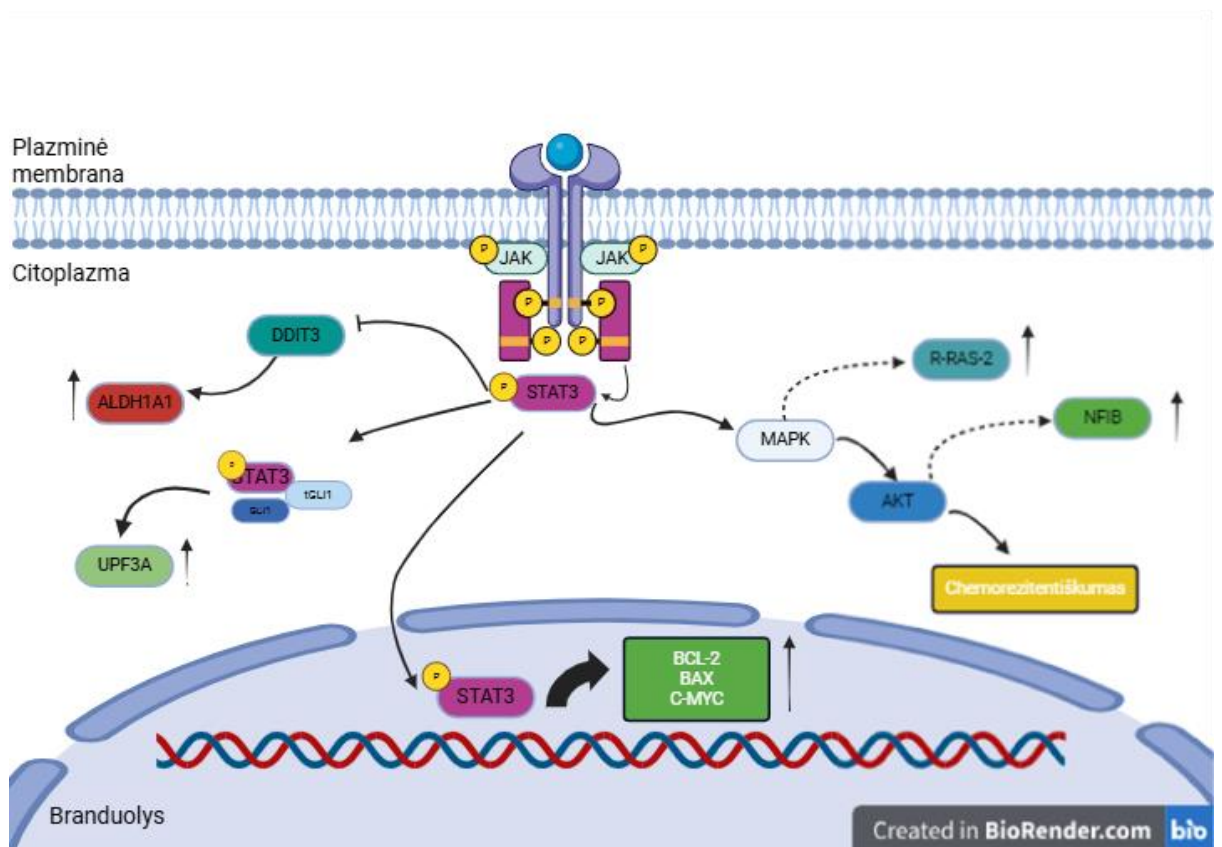
STAT3 genas priklauso transkripcijos reguliatorių ir aktyvatorių šeimai sudarytai iš 7 genų (*STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STAT4*, *STAT5a*, *STAT5b* ir *STAT6*). Šie genai koduoja baltymus, atsakingus už ląstelės signalų perdavimą ir transkripciją bei dalyvauja daugelyje biologinių procesų, tokių kaip ląstelių augimas, diferenciacija ir imuninės sistemos atsakas. STAT baltymų aktyvacija vyksta per Janus kinazių (JAK) signalus, kas skatina baltymų fosforilinimą ir tikslinių genų aktyvaciją. Ypač didelis dėmesys yra skiriamas *STAT3* genui, kadangi, moksliniuose ir klinikiniuose tyrimuose įrodyta, jog geno raiška yra per daug aktyvinta beveik visuose vėžiniuose susirgimuose (Darnell 1997; Tolomeo and Cascio 2021). Genas lokalizuotas 17 chromosomos ilgajame petyje, 4921 bp ilgio ir yra sudarytas iš 24 egzonų (*GRCh38.P14 - Hg38 - Genome - Assembly - NCBI*, n. d.) Pagrindinė *STAT3* geno funkcija – tiesiogiai ir netiesiogiai reguliuoti daugelio genų susijusių su ląstelių išgyvenamumu raišką (Kulesza et al. 2019).

Nustatyta, kad *STAT3* yra raiška yra pakitusi beveik visuose vėžio tipuose ir skatina chemoterapinių vaistų veiksmingumo sumažėjimą, bei prastesnę ligos prognozę (Ma, Qin, and Li 2020; J.-J. Qin et al. 2019; Yang et al. 2020), o *STAT3* aktyvumo blokavimas gali padidinti chemoterapijos poveikį (J. J. Qin et al. 2019; Yang et al. 2020). *STAT3* sukliamas cheminis atsparumas grindžiamas *NF-κB* (angl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) raiškos padidėjimu, kas suteikia TNKV navikinių ląstelių cheminį atsparumą (J. J. Qin et al. 2019). Taip pat, atsparumas chemoterapijai siejamas su hipoksinių sąlygų navikų mikroaplinkoje, sukėlimu, kas sumažina chemoterapinių vaistų, ypač cisplatinos, veikimą. Panašiai kaip ir *NF-κB*, *STAT3* padidina ir ABC nešiklių genų raišką, ypač *ABCC2* ir *ABCC6* raiškos lygius hipoksija gydomose TNKV ląstelėse, todėl suteikia atsparumą cisplatinai (J. J. Qin et al. 2019).

STAT3 signalinis kelias yra aktyvuojamas citokinių, kurie svarbūs ląstelių komunikacijai. Tokių kaip, interleukino 6 ir 10 (IL-6 ir 10) ir augimo veiksnių, kaip EGF, fibroblastų augimo veiksnių (FGF – angl. *fibroblast growth factor*) bei į insuliną panašių

augimo veiksnių (IGF – angl. *insulin-like growth factor*) (Ma et al. 2020). Šie veiksniai prisijungdami prie specifinių receptorių aktyvuoja JAK (angl. *janus activated kinase*) ir STAT3 fosforilinimą.

Fosforilintas STAT3 baltymas branduolyje gali aktyvinti genus, kurie susiję su KV progresija pvz. *BCL-2* (angl. *B-cell lymphoma-2*). Fosforilintas STAT3 jungiasi ir su kitais naviko augimą skatinančiais baltymais kaip, pvz., *GLI1* (angl. *glioma-associated oncogene homologue 1*) ir *tGLI1* (angl. *truncated glioma-associated oncogene homolog 1*) ir aktyvinti *UPF3A* (angl. *regulator of nonsense transcripts 3A*) geno raišką. Taip pat, STAT3 geba aktyvinti MAPK / AKT (angl. *mitogen-activated protein kinase / protein kinase B*) signalinį kelią, kas manoma, gali aktyvuoti *R-RAS-2* (angl. *Ras-related protein 2*) ir *NFIB* (angl. *nuclear factor I B*). Galiausiai STAT3 geba formuoti kompleksus su NFκB ir slopinti DDIT3 (angl. *DNA damage-inducible transcript 3*) kas aktyvina *ALDH1A1* (angl. *aldehyde dehydrogenase 1a1*) raišką (1.4 pav.). Visi šie procesai gali būti susiję su vėžio vystymusi ir atsparumu chemoterapijai (Liu et al. 2019; Poturnajova, Kozovska, and Matuskova 2021; J. J. Qin et al. 2019; Sirkisoon et al. 2018; Wu et al. 2018).



1.4 pav. STAT3 signaliniame kelyje dalyvaujantys baltymai: JAK (angl. *janus activated kinase*); *BCL-2* (angl. *B-cell lymphoma-2*); *GLI1* (angl. *glioma-associated oncogene*

homologue 1); tGL1 (angl. *truncated glioma-associated oncogene homolog 1*); UPF3A (angl. *regulator of nonsense transcripts 3A*); R-RAS-2 (angl. *Ras-related protein 2*); MAPK / AKT (angl. *mitogen-activated protein / protein kinase B*); DDIT3 (angl. *DNA damage-inducible transcript 3*); ALDH1A1 (angl. *aldehyde dehydrogenase 1a1*); NFIB (angl. *nuclear factor I B*) (parengta naudojant „BioRender“) (Ma et al. 2020; Nogueira et al. 2021; Poturnajova et al. 2021)

1.4.2 BCL-2 genas

BCL-2 baltymų šeima yra plati vidinio apoptozės kelio reguliatorių šeima, kurioje šiuo metu yra identifikuojami 25 nariai. Remiantis baltymų funkciniu aktyvumu, BCL-2 šeima yra suskirstyta į dvi dideles grupes: apoptozę skatinančius ir slopinančius BCL-2 tipo baltymus (Maji et al. 2018). BCL-2 baltymas priklauso apoptozę blokuojančių BCL-2 šeimos baltymų grupei. Genas yra 18 chromosomos ilgajame petyje, 1595 bp ilgio ir yra sudarytas iš 4 egzonų (*GRCh38.P14 - Hg38 - Genome - Assembly - NCBI*, n. d.). BCL-2 nustatomas išorinėje mitochondrijų membranoje, kur skatina ląstelių išgyvenamumą, palaiko mitochondrijos membranos integralumą ir slopina apoptozę skatinančių baltymų poveikį. BCL-2 baltymas blokuoja BAX / BAK (angl. *BCL2 associated X, apoptosis regulator / Bcl-2 homologous antagonist killer*) oligomerizaciją, kuri priešingu atveju pažeistų mitochondrijos membranos integralumą ir skatintų išskirti apoptotines molekules tokias kaip C-MYC. Taip pat BCL-2 geba jungtis ir inaktyvuoti BAX ir kitus apoptozę skatinančius baltymus, tokiu būdu slopindamas apoptozę (Tzifi et al. 2011).

Padidėjusi *BCL-2* raiška slopina apoptozę, kurią sukelia įvairūs dirgikliai, įskaitant: augimo faktorių trūkumą, hipoksiją ir oksidacinį stresą. Didžioji dalis šią dieną naudojamų priešvėžinių preparatų priklauso nuo *BCL-2 / BAX* mechanizmų, skirtų naikinti navikines ląsteles. Taigi, BCL-2 veikia centriniame konservatyvios ląstelių mirties taške nuo kurio priklauso daugumos vaistų nuo vėžio efektyvumas. Tokios sąveikos pavyzdys galėtų būti atliktas tyrimas, kuriame buvo parodyta, jog slopinant BCL-2 raišką TNKV ląstelės tampa jautresnės doksorubicinui (Inao et al. 2018; Yip and Reed 2008).

1.4.3 R-RAS-2 genas

RAS yra G-baltymų superšeima reguliuojanti įvairius signalo perdavimo procesus ir kelius. Baltymai yra konservatyvios mažos (maždaug 20–30 kDa) GTP-azės. Šie baltymai suriša guanino nukleotidus ir veikia kaip molekuliniai jungikliai, keisdami savo formą tarp surišto su GTP (angl. *guanosine-5'-triphosphate*) ar su GDP (angl. *guanosine diphosphate*). RAS superšeimą sudaro RAS (angl. *rat sarcoma virus*), RHO (angl. *rhodopsin*), RAB (angl. *ras-associated binding*), ARF (angl. *small ADP ribosylation factor*) ir RAN (angl. *ras-related nuclear protein*) pošeimiai. Šie baltymai kontroliuoja: signalo perdavimą, ląstelių augimą, transformaciją, transportavimą, migraciją ir adheziją (Parmar and Tamanoi 2010; Reuther and Der 2000).

R-RAS-2 (dar žinoma kaip TC21) kartu su R-RAS-1 ir R-RAS-3 sudaro RAS GTPazės pošeimį. R-RAS-2 yra transformuojanti GTPazė, turinti daug bendrų efektorių signalinėje kaskadoje su RAS baltymų pošeimiais. R-RAS-2 genas yra 11 chromosomos trumpajame petyje, 2186 bp ilgio ir yra sudarytas iš 11 egzonų (*GRCh38.P14 - Hg38 - Genome - Assembly - NCBI*, n. d.). Šis baltymas veikia kaip signalo perdavėjas ir aktyvuoja signalinius kelius reikalingus ląstelių proliferacijai vykti. Sergant onkologinėmis ligomis R-RAS-2 veikia tiek pirminėse KV ląstelėse, tiek vėlyvuose vėžio metastazavimo etapuose. RAS-2 skatina kancerogenezę nuo PI3K (angl. *phosphoinositide 3-kinase*) priklausomu ir autonominiu signalinės kaskados būdu (Larive et al. 2014). R-RAS-2 taip pat yra siejamas su atsparumu chemoterapijai. Atlikto tyrimo metu buvo įrodyta, jog padidėjusi R-RAS-2 geno raiška yra siejama su atsparumu chemoterapijai KV pacientuose. Nors tikslus mechanizmas nėra išaiškintas, manoma jog padidėjusi R-RAS-2 geno raiška sukelia didesnę augimo faktorių aktyvavimą, ir ER nestabilumą (Rokavec et al. 2008). R-RAS-2 taip pat skatina vėžinių ląstelių EMT (angl. *epithelial–mesenchymal transition*), kas yra siejama su atsparumu chemoterapijai (Wang et al. 2022).

1.4.4 UPF3A genas

UPF3A priklauso baltymų grupei reguliuojančiai NMD (angl. *nonsense-mediated mRNA decay*). NMD atlieka svarbią funkciją kontroliuojant potranskripcinę žmogaus genų raišką splaisingo metu. 75 % sugeneruotų pre-iRNR sintetinės alternatyvaus splaisingo

metu ir daugiau nei trečdalis tokių iRNR molekulių yra pašalinamos NMD keliu. Didžioji dalis tokių pašalintų iRNR atsiranda dėl netaisyklingos transkripcijos (Isken et al. 2008). *UPF3A* genas yra 14-osios žmogaus chromosomos ilgajame petyje, 2271 bp ilgio ir yra sudarytas iš 14 egzonų (*GRCh38.P14 - Hg38 - Genome - Assembly - NCBI*, n. d.). *UPF3A* genas koduoja baltymą, kuris yra potranskripcinio baltymų komplekso, veikiančio iRNR pernešimo iš branduolio ir iRNR patikroje procesuose. Taip pat, manoma, jog šis baltymas slopina NMD veikimą ir yra reguliuojamas *UPF3B* (angl. *regulator of nonsense transcripts 3B*) (Pawlicka, Kalathiya, and Alfaro 2020).

Pacientuose sergančiuose vėžiu NMD veikia kaip apsauginis mechanizmas, siekiantis pašalinti mutacijas, kurios perduodamos ligos progresijos metu. Tai ypač naudinga, kai iRNR koduoja dominuojančias naviką slopinančių genų mutacijas. Sutrikusi NMD veikla gali lemti, jog tokie netaisyklingi iRNR tranksiptai nėra pašalinami ir yra transliuojami. Šio reiškinių pavyzdys yra dominuojanti heterozigotinė naviką slopinančio geno *BRCA1* mutacija, kuri gali sukelti paveldimą KV ir kiaušidžių vėžį. Įrodyta, jog sutrumpėjusio *BRCA1* geno transkripto raiška gali sukelti atsparumą chemoterapijai, sumažinti jautrumą apoptozei ir mažinti naviko augimo slopinimą *in vivo* (Pawlicka et al. 2020).

1.4.5 *ALDH1A1* genas

Aldehidai yra reaktyvūs, kenksmingi, elektrofiliniai junginiai, kurie gali kauptis žmogaus organizme cheminių medžiagų ir vaistų metabolizmo metu. Aldehido dehidrogenazės (ALDH) yra fermentų šeima, katalizuojanti aldehido pavertimą į karboksirūgštį nuo NAD(P)⁺ priklausomos oksidacijos būdu. ALDH aktyvumas stebimas citozolyje, branduolyje, mitochondrijose ir endoplazminiame tinkle. Iš viso yra identifikuota 19 ALDH šeimos narių, įskaitant ALDH1 ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH2, ALDH3A1 ir ALDH1A1 (Liu et al. 2015).

ALDH1A1 genas lokalizuotas 9 chromosomos trumpajame petyje, 2096 bp ilgio ir sudarytas iš 13 egzonų. *ALDH1A1* koduojamo baltymo pagrindinė funkcija yra retinoinės rūgšties metabolizmas, paverčiant retinaldehidą į retinoinę rūgštį, kuri yra būtina ląstelių diferenciacijai, augimui ir vystymuisi. Taip pat baltymas atlieka svarbią funkciją saugant ląsteles, nuo oksidacinio streso, detoksikuojant aldehidus, susiformuojančius medžiagų apykaitos procesų metu, taip prisidedant prie atsparumo apoptozei (Liu et al. 2015; Wei et al.

2022; Yue et al. 2022). Įrodyta, jog ALDH1A1 raiška yra padidėjusi daugelyje vėžinių susirgimų įskaitant KV, TNKV, kiaušidžių, skrandžio, gaubtinės ir tiesiosios žarnos, stemplės vėžiniuose susirgimuose. ALDH1A1 svarbus cheminio atsparumo išsivystyme TNKV pacientuose, nes skatina vėžio kamieninių ląstelių formavimąsi ir jų palaikymą. Nors tikslus mechanizmas nėra žinomas manoma, jog ALDH1A1 aktyvuoja signalinius kelius tokius, kaip ALDH1A1 / HIF-1 α / VEGF, kur ir padeda naviko angiogenezei ir išgyvenimui streso sąlygomis, bei reguliuodamas vėžinių ląstelių išgyvenamumą didinančius kelius, tokius kaip Wnt/ β -kateninas ir STAT3. *ALDH1A1* geno slopinimas eksperimentiniuose modeliuose padidina chemoterapijos efektyvumą ir mažina naviko augimą (Wei et al. 2022).

1.4.6 *NFIB* genas

NFIB yra transkripcijos faktorius, dalyvaujantis reguliuojant genų raišką, svarbią ląstelių diferenciacijai, augimui ir išgyvenimui. Jis priklauso branduolio faktoriaus I (NFI) šeimai: NFIA, NFIB, NFIC, NFIX. Genas yra lokalizuotas 9 chromosomos, trumpajame petyje, 7825 bp ilgio ir sudarytas iš 22 egzonų. NFIB raiška yra padidėjusi TNKV pacientėse ir yra siejama su prastesne ligos prognoze, sumažėjusiu chemoterapijos efektyvumu dėl šio baltymo įtakos onkogeniniams keliams (tiesiogiai slopina p21), skatinantiems vėžio ląstelių dauginimąsi ir išgyvenimą. Taip pat NFIB genas chromosominės translokacijos metu gali susijungti su *MYB* (angl. *v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog*), genu reguliuojančiu ląstelių diferenciaciją ir proliferaciją. Susiformavęs chimerinis *MYB-NFIB* genas lemia netipiską *MYB* geno aktyvaciją skatinančią navikinių ląstelių nevaldomą dalijimąsi. Susiformavęs genas nėra dažnai nustatomas kituose vėžiniuose susirgimuose, todėl taip pat galėtų būti naudojamas kaip potencialus žymuo TNKV nustatymui (Wang et al. 2021).

1.5 Genų raiškos tyrimo metodai skysčių biopsijoje

Skysčių biopsija yra neinvazivus metodas, skirtas molekuliniais biožymenimis aptikti, nereikalaujant invazinių procedūrų. Kraujyje cirkuliuojančios vėžinės ląstelės arba vėžio

RNR ar DNR pėdsakai gali bėti aptinkami ir analizuojami pritaikant įvairius metodus (skaitmeninis PGR, naujos kartos sekoskaita (NKS), AT-kPGR (atvirkštinės transkripcijos kiekybinė polimerazės grandininė reakcija) ir t.t.). Genų raiškos tyrimų metu yra siekiama kiekybiškai įvertinti transkribuotos iRNR kiekį biologinėje medžiagoje. Dauguma baltymų po translacijos yra modifikuojami ir ląstelės būklės pokyčiai yra susiję su kai kurių genų iRNR lygio pokyčiais, todėl transkripto kiekį yra naudinga išmatuoti.

Genų kaip *STAT3*, *ALDH1A1*, *NFIB*, *R-RAS2*, *BCL-2* ir *UPF3A* raiškos padidėjimas gali daryti įtaką RNR lygiui kraujo plazmoje dėl jų vaidmens ląsteliniuose procesuose. Pavyzdžiui, *STAT3* reguliuoja nekoduojančių RNR ir citokinų raišką skatinančią ląstelių proliferaciją, uždegiminius procesus, kurie potencialiai gali skatinti RNR išskyrimą į plazmą, dėl imuninės sistemos veikimo, ypač vėžinių ląstelių atveju (Gil et al. 2023; Rezvani and Barrett 2014). Toliau, *BCL-2*, potencialiai gali padidinti RNR stabilumą ir gausą plazmoje, dėl anti-apoptotinių geno funkcijų. Dėl šios priežasties, vėžinių susirgimų atvejais genų aktyvumo pokyčiai galėtų lemti cirkuliuojančios RNR kiekio padidėjimą kraujo plazmoje.

Populiariausi genų raiškos matavimo metodai: skaitmeninis PGR, AT-kPGR, genų raiškos mikrogardelės, naujos kartos sekoskaita ir kt. (Parmigiani et al. 2003).

1.1 lentelė Genų raiškos tyrimo metodai ir jų palyginimas (Parengta pagal <https://www.thermofisher.com>; (Della Starza et al. 2018)) .

Metodas	Jautrumas	Kaina	Reikalingas pradinės medžiagos kiekis	Tyrimo trukmė	Vienu metu tiriamų genų kiekis
Skaitmeninis PGR	Aukštas (vienos molekulės aptikimas)	Vidutinė	~10 ng DNR/RNR	~2–3 valandos	1–10 taikinių viename bandyme
AT-kPGR	Aukštas	Žema arba vidutinė	~50–100 ng RNR	~2–4 valandos	1–100 taikinių
Naujos kartos sekoskaita	Labai aukštas	Aukšta	~100 ng–1 µg RNR	1–3 dienos	Visas transkriptomas (20 000 + genų)
Mikrogardelės	Vidutinis	Vidutinė	~500 ng RNR	1–2 dienos	10 000–40 000 iš anksto nustatytų genų

Vienas iš tiksliausių šiuo metu taikomų metodų klinikose genetiniams pokyčiams tirti skysčių biopsijos mėginiuose yra skaitmeninis PGR. Skaitmeninis PGR naudojamas

mutacijoms aptikti, kiekybiškai įvertinti kopijų skaičiaus variacijas, įvertinti cirkuliuojančios DNR ir / ar RNR / mikroRNR kiekį ar genų mutacijas. Metodas yra paremtas vandens–aliejaus emulsijos lašelių sukūrimu. Mėginys iš pradžių išfrakcionuojamas į didelį kiekį lašelių tuomet kiekviename atskirame lašelyje vyksta kopijinės DNR molekulių PGR amplifikacija. Po PGR reakcijos kiekvienas lašelis yra nuskaitymas, kad būtų nustatyta lašelių dalis, kuriuose sėkmingai įvyko reakcija. Tuomet šie duomenys yra išanalizuojami remiantis Puasono statistika, norint įvertinti tikslią kopijinės DNR koncentraciją pradiniam mėginyje. (Li et al. 2019b). Mėginių išfrakcionavimas yra pagrindinis skaitmeninio PGR metodo aspektas (Han, Wang, and Sun 2017; Li et al. 2019a).

Mikrogardelės yra laboratorinė priemonė, skirta vienu metu išmatuoti genų raišką dideliame kiekiui mėginių. Mikrogardelių skenavimo aparate yra nuskaityma plokštelė, kurioje atspausdinta tūkstančiai mažyčių įdubų nustatytose vietose, kurių kiekvienoje vietoje yra žinoma DNR seka. DNR molekulės, pritvirtintos prie plokštelės, veikia kaip zondai, skirti aptikti genų raiškai. Norint atlikti genų raiškos tyrimą mikrogardelėmis, iRNR molekulės paprastai analizuojamos iš eksperimentinio mėginio ir kontrolės. Toliau, iš dviejų iRNR mėginių susintetinama kDNR ir kiekvienas mėginys pažymimas skirtingos spalvos fluorescenciniu zondų. Tuomet mėginiai sumaišomi ir leidžiama prisijungti prie mikrogardelės stiklo hibridizacijos metu. Po hibridizacijos mikrogardelė nuskaityma, kad būtų išmatuota kiekvieno geno raiška. Jei konkretaus geno raiška eksperimento metu yra didesnė nei kontrolės atveju, tada atitinkamas mikrogardelės taškas atrodo raudonas ir priešingai, jei žemesnė – žalia spalva. Galiausiai, jei yra vienoda raiška, taškas atrodo geltonai (Slonim and Yanai 2009).

Naujos kartos sekoskaitos technologijos yra naudojamos visos transkripto sekos nustatymui. Sekoskaita pagrįsti metodai yra gera alternatyva genų raiškos analizei hibridizacija pagrįstiems metodams dėl didesnio proceso našumo ir jautrumo. NKS metodo jautrumas ir specifiškumas, leidžia mokslininkams nustatyti cirkuliuojančią RNR kraujyje kiekį, taip pat NKS gali būti naudojama vieno geno, genų rinkinių ar net genomo masto vėžio tyrimams. Būtent dėl didelio metodo jautrumo ir našumo NKS technologijos yra vienas plačiausiai naudojamų genų raiškos analizės metodų (Chen and Zhao 2019). Priklausomai nuo technologijos, NKS metu RNR yra hidrolizuojama į fragmentus, pagal kuriuos yra sintetinama kDNR arba vykdomas multipleksinis PGR. Toliau prie kDNR galo yra prijungiamos trumpos DNR molekulės – adapteriai. Vykdoma sekoskaita, kurios metu, pagal

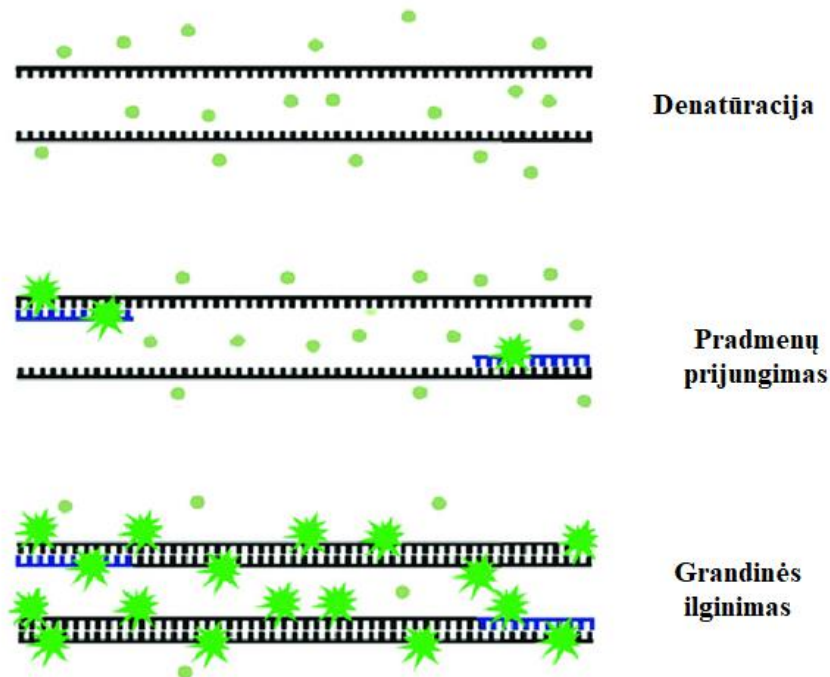
adapterius, fragmentai gali prisijungti prie šabloninės sekos su kuria lyginami tiriamajame fragmente esantys pakitimai (Jain 2012).

1.5.1 Atvirkštinės transkriptazės kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija

Atvirkštinės transkriptazės kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija (AT-kPGR) yra metodas tinkamas tikslinių genų raiškai tirti. Jis užtikrina greitą ir tikslinių DNR sekų aptikimą bei kiekybinį įvertinimą įvairiose biologinėse medžiagose. Taip pat, šiuo metodu vykdant tyrimus yra sunaudojama mažiau sąnaudų. Taikant AT-kPGR, kad kiekybiškai įvertintų genų raišką, RNR reikia išskirti iš eksperimentinio mėginio ir konvertuoti į kDNR per procesą, vadinamą atvirkštine transkripcija (Kuang et al. 2018).

Daugelis ląstelių procesų ir funkcijų yra reguliuojami genų raiškos pokyčiais. Todėl kiekybinis genų transkripcijos lygio nustatymas yra svarbus, siekiant suprasti genų funkcijas, reguliavimą ir pokyčius, kuriuos gali sukelti ligos. AT-kPGR yra plačiai naudojamas kiekybinio įvertinimo metodas, skirtas nustatyti genų raiškos pokyčius iš ląstelių, audinių arba kūno skysčių, tokių kaip kraujo plazma. Metodas leidžia tiesiogiai aptikti PGR produktus eksponentinių ciklinių reakcijų metu (Overbergh et al. 2003). AT-kPGR pagrįstas fluorescencija, siekiant išmatuoti DNR taikinio kiekį, esantį kiekviename amplifikacijos cikle PGR metu. Dažniausiai fluorescencijai gauti yra naudojami specifiniai hidrolizės zondai (*TaqMan* zondai) arba dažai įsiterpiančys į DNR (pvz. *SYBR® Green I*; (Pereira-Gómez et al. 2021)).

SYBR® Green I kPGR reakcijos metu naudojami komponentai: matrica su dominančia DNR seka, dNTP (deoksiribonukleotidai), polimerazė, specifiniai pradmenys ir fluorescenciniai dažai. Denatūravimas yra pirmasis PGR reakcijos žingsnis, kurio metu dvigrandė DNR yra denatūruojama į dvi viengrandes DNR sekas – 95 °C. Sekantis etapas yra hibridizacija. Šiame etape tirpalo temperatūra nuleidžiama iki 45–65 °C ir pradmenys komplementarumo principu prisitvirtina prie tikslinių sekos galų. Galiausiai, prailginimo fazėje temperatūra pakyla iki 65–75 °C. DNR polimerazė prisijungusi prie specifinio pradmens, prijungiami nukleotidai, kol susintetinamas amplikonas. *SYBR® Green I* dažas įsiterpia į visas naujai susintetintas dvigrandes DNR sekas ir fluoresuoja (1.5 pav.).

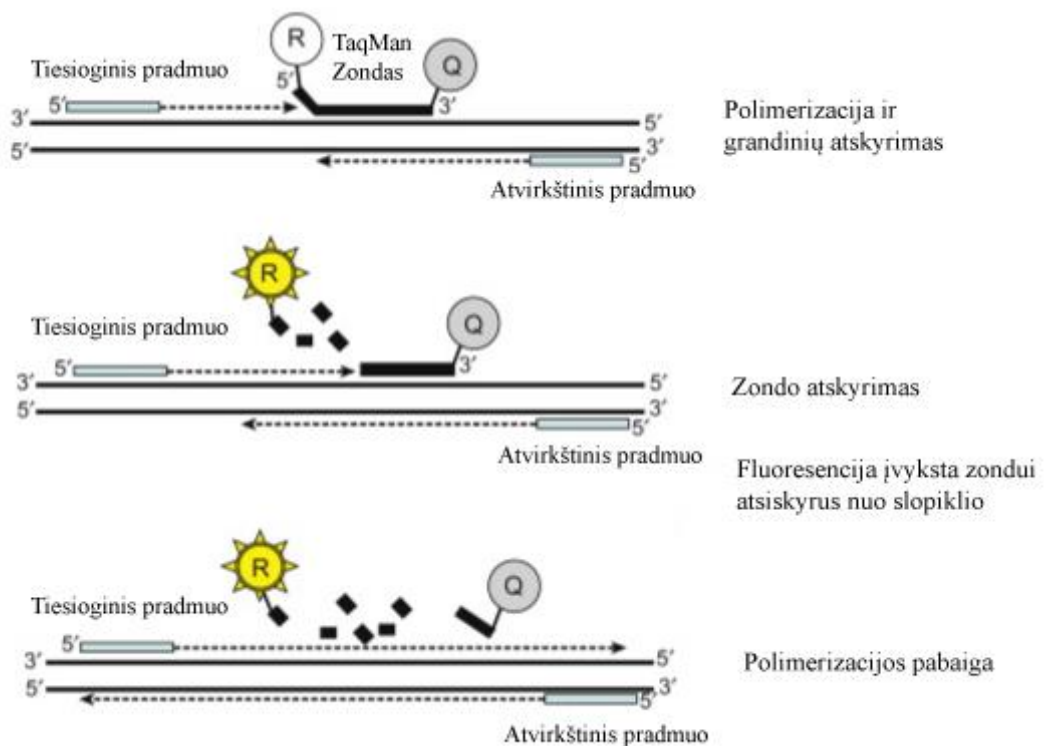


1.5 pav. SYBR® *Green I* dažo prisijungimas prie DNR taikinio PGR metu (Fraga, Meulia, and Fenster 2014)

Fluorescencija kaupiasi PGR ciklų metu ir yra matuojama kiekvieno PGR ciklo pabaigoje. Dažniausiai reakcija kartojama 40 ciklų. Siekiant išmatuoti DNR kiekį, išmatuojamas SYBR *Green I* generuojamos fluorescencijos intensyvumas, viršijantis fono lygį. SYBR® *Green I* kPGR reakcija yra paprastesnė ir pigesnė nei naudojant TaqMan®, nes nereikia fluorescuojančių zondų (*Essentials of Real-Time PCR - LT*, n. d.). Kreivių lydimosi analizė yra dvigrandinės DNR atsiskyrimo įvertinimas kaitinimo metu. Tyrėjai lydimosi kreivių analizę naudoja tam, kad nustatytų PGR tyrimo specifiškumą, kuomet interkalijuojantis dažas naudojamas kaip reporteris, kuris lieka susijęs su amplikonu. Jeigu diagramoje matoma viena ryški viršūnė, tai reiškia jog amplifikuoti DNR produktai yra artimi (didelis specifiškumas) (Lalonde, Reyes, and Gajadhar 2013).

TaqMan kPGR reakcijos metu naudojami komponentai: pora specifinių pradmenų, TaqMan zondas su FAM™ arba VIC™ dažais 5' gale. Veikimo principas yra pagrįstas polimerazės 5'–3' egzonukleaziniu aktyvumu, kas leidžia aptikti fluorescenciją realiu laiku. TaqMan zondo struktūroje yra fluorescencinis reporteris ir slopiklis (angl. *quencher*). Denatūravus DNR grandines PGR metu zondas prisijungia prie DNR sekos, tačiau

neskleidžia jokio fluorescencijos signalo dėl slopiklio, slopinančio fluorescencinį reporterį. Kuomet vyksta prailginimo fazė, Taq polimerazė sintetina naują grandinę, jos 5'–3' egzonukleazinis aktyvumas geba skaidyti zondą (1.6 pav.). Reporteris atskiriamas nuo slopiklio, ir signalas tampa matomas. Su kiekvienu PGR ciklu yra išskiriamas didesnis kiekis fluorescencinio dažo, todėl intensyvumas didėja proporcingai susintetinto amplikono kiekiui. TaqMan yra tikslesnis metodas, negu naudojant SYBR®, dėl didesnio naudojamų zondu specifškumo (Holland et al. 1991; Tajadini, Panjehpour, and Javanmard 2014).



1.6 pav. TaqMan zondo veikimo principas PGR metu (Marmiroli and Maestri 2007)

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos ir aparatūra

Magistrinio darbo metu naudoti reagentai pateikti 1 lentelėje, o naudota laboratorinė įranga 2 lentelėje.

1 lentelė. Tyrime naudoti reagentai ir rinkiniai

Medžiaga / rinkinio pavadinimas	Gamintojas
Etanolis 96 %	Gintarinė vaistinė
Chloroformas	Roth
QIAzol Lysis reagentas	QIAGEN
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase	Thermo Scientific
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), ROX Solution provided	Thermo Scientific
miRNeasy Serum/Plasma rinkinys	QIAGEN
UPF3A, BCL-2, R-RAS-2, STAT3, NFIB, ALDH1A1 ir GAPDH pradmenys	Metabion

2 lentelė. Tyrime naudota aparatūra

Aparatūra / priemonė	Gamintojas
Termomaišyklė TS-100C	Thermo Scientific
Centrifuga / purtyklė FVL-2400N Combi-Spin	Biosan
Laminarinė traukos spinta Herasafe KS 15	Thermo Scientific
Švaraus oro spinta UVT-S-AR	Biosan
Šaldoma centrifuga Heraeus Megafuge 8R	Thermo Scientific
Spektrofotometras NanoDrop 2000	Thermo Scientific
QuantStudio 5 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Termocikleris ProFlex™ 3 x 32-well PCR System	Applied Biosystems

2.2 Tiriamoji pacienčių imtis

Kraujo mėginiai surinkti iš TNKV sergančių pacienčių Nacionaliniame vėžio institute 2019–2023 m. Į baigiamąjį darbą iš viso įtrauktos 94 TNKV pacientės, kurių kraujo ėminiai buvo renkami prieš gydymą NAC (0 mėn.) ir po (vid. 6 mėn. (4–10 mėn.)) (**2.1 lentelė**). Pacienčių gydymas buvo sudarytas iš 4 ciklų, skiriant karboplatiną ir pakliltakselį, vėliau ciklofosamidą bei doksirubiciną. Magistriniame darbe pateikti 188 porinių mėginių rezultatai: 94 prieš ir 94 po gydymo NAC. Lietuvos bioetikos komiteto leidimas tyrimui buvo gautas 2019-02-26, leidimo Nr. 2019/02-1084-589.

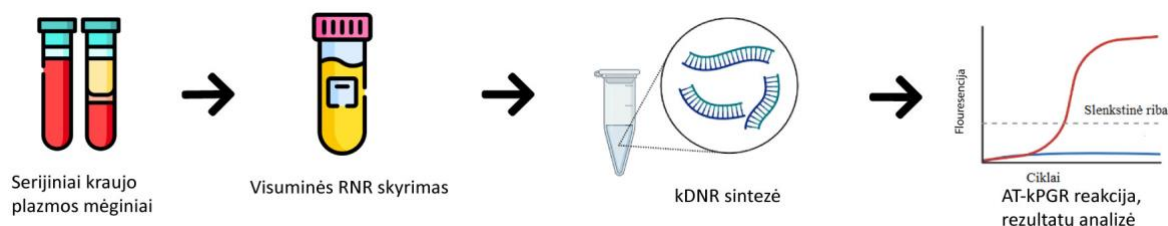
2.1 lentelė Visų tiriamų pacienčių klinikiniai rodikliai

Demografiniai ir klinikiniai rodikliai	TNKV pacientės (%)
TNKV pacientės (N):	94 (100 %)
Amžiaus mediana (intervalas):	55 m. (25–75 m.)
CEA (ng/ml) mediana (intervalas)	1,2 (0,2–5,8)
CA 15-3 (U/ml) mediana (intervalas)	21,4 (7,9–114,7)
CEA po chemoterapijos (ng/ml) mediana (intervalas)	1,3 (0,4–6,6)
CA 15-3 po ch/th (U/ml) mediana (intervalas)	25,3 (6,9–58,1)
Atsakas į gydymą NAC:	
Pilnas (PA)	62 (66 %)
Nepilnas (NA)	32 (34 %)
Likutinis navikas:	
Neigiama (NRD)	62 (66 %)
Teigiama (RD)	32 (34 %)
Diferenciacijos laipsnis:	
G1 / 2	14 (15 %)
G3	80 (85 %)
Ki67 % rodiklis*:	
Ki67 % ≥ 60	61 (66 %)
Ki67 % < 60	31 (34%)

CA 15-3 – krūties vėžio žymuo; CEA – karcinoembrioninis antigenas; Ki67 % – proliferacijos žymens Ki67 kiekis; *2 pacienčių Ki67 % žymuo nepateiktas.

2.2.1 Tyrimo eiga

Magistrinio darbo metu buvo siekiama įvertinti *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB*, *ALDH1A1* genų ir kontrolinio *GAPDH* geno raišką TNKV pacienčių kraujo plazmos mėginiuose. Tyrimas pradėtas nuo RNR išskyrimo, vėliau, kopijinės DNR (kDNR) sintezės ir AT-kPGR (2.1 pav.).



2.1 pav. Tyrimo schema (Parenpta naudojant „Adobe Illustrator“ programą)

2.2.3 RNR skyrimas

Tyrimo metu naudotas naudojant *miRNeasy Serum/Plasma Kit* (QIAGEN) rinkinys. RNR išskirta iš 200 µL kraujo plazmos mėginių pagal gamintojo rekomendacijas (*MiRNeasy Serum/Plasma Handbook* - QIAGEN, n. d.). RNR kokybė įvertinta *NanoDrop™ 2000* (RNR ištirpinta 20 µL vandenyje be nukleazų) (*Thermo Fisher Scientific*, TFS). RNR saugoma -80 °C temperatūroje.

2.2.4 Kopijinės DNR sintezė

kDNR sintezė atlikta naudojant *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase* (TFS) rinkinį, remiantis gamintojo rekomendacijomis. Sintezei naudojama 18 µL RNR ~ vid. 18,3 ng/µL. Pradžioje RNR paveikiama DNaze (2 µL) ir DNazės buferiu (2 µL), pilstoma žemoje temperatūroje (4 °C). Toliau mėginiai inkubuojami 5 min. 37 °C. Reakcijos mišinio sudėtis ir mėginių inkubavimo sąlygos pateiktos 2.2 lentelėje. Po inkubacijos, mišinys naudojamas RT+ (tiriamieji mėginiai, kuriuose yra įpilta mišinio su atvirkštine transkriptaze) ir RT- (tyrimo kontrolė, kurioje neturi vykti reakcija t. y. įpilamas reakcijos mišinys be atvirkštinės transkriptazės) paruošimui. Mišiniai reakcijoms išpilstomi

po 11 μL į atskirus mėgintuvėlius ir 9 μL RNR. Galutinis reakcijos tūris 20 μL . Vykdoma inkubacija (2.2 lentelė).

2.2 lentelė RNR veikimo DNaze ir kDNR sintezės reakcijų komponentai, jų kiekiai ir inkubacijos sąlygos

Komponentai	Tūris		Inkubacija
Veikimas DNaze			
RNR	18 μL		37 °C, 5 min.
DNazė	2 μL		
10 × DNazės buferis	2 μL		
kDNR sintezė			
	RT+	RT-	25 °C, 10 min.
5 × Reaction Mix	4 μL	4 μL	
Vanduo be RNazių	3 μL	5 μL	50 °C, 30 min.
Enzyme Mix	2 μL	-	85 °C, 5 min.

2.2.5 AT-kPGR

AT-kPGR metodu genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB*, *ALDH1A1* ir pastovios raiškos geno kontrolės *GAPDH* raiška tirta naudojant *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)*, *ROX Solution provided* (TFS) rinkinį ir pradmenis (2.3 lentelė). Reakcija atliekama 20 µL tūryje, 96 šulinėlių *MicroAmp®* (ABI (*Applied Biosystems*), TFS) plokštelėje. Reakcijos mišinio komponentai ir jų kiekiai vienai reakcijai pateikti 2.4 lentelėje. Tiriamiesiems genams ir pastovios raiškos geno kontrolei reakcijos mišiniai ruošiami atskirai ir išpilstomi po 18 µL, į kiekvieną šulinėlį įpilant po 2 µL kDNR. Reakcijos metu naudojama taršos kontrolė, kurioje įpilama vandens be nukleazijų vietoje kopijinės DNR. Galiausiai naudojama 5 µM ROX dažo mišinio. Kiekvienai reakcijai atliekami 3 pakartojimai. AT-kPGR atliekamas, naudojant *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System* (ABI, TFS), reakcijos sąlygos nurodytos 2.5 lentelėje. Remiantis DNR lydymosi kreivėmis, nustatyti nespecifiniai produktai ir pradmenų dimerai, buvo atmesti iš tolimesnės rezultatų analizės.

2.3 lentelė Pradmenų tiesioginės ir atvirkštinės sekos ir jų ilgiai

	<i>GAPDH</i>	<i>BCL-2</i>	<i>R-RAS-2</i>	<i>UPF3A 3'</i>	<i>STAT3</i>	<i>NFIB</i>	<i>ALDH1A1</i>
Tiesioginis pradmuo 5' – 3'	GAAGGTC GGAGTCA ACGGATT T	ATAACGG AGGCTGG GATGC	ACATGGA GGCATCA GCAAAGA	CGCCGAC CTGAGTC TTTATCC	TTCTGGG CACAAAC ACAAAAG	GAGAAAT CCCAAGC CAACCA	CCGTGGC GTACTAT GGATGC
Tiesioginio pradmes ilgis, bp	22	19	21	21	21	20	20
GC %	50	58	48	57	43	48	48
Atvirkštinis pradmuo 5' – 3'	ATGGGTG GAATCAT ATTGGAA C	TGACTGG AATCCTG GGGTTT	TCACTTGT GGCCCAG ATAGG	CGTGTTG GTTCTGG TGAAGG	TCAGTCA CAATCAG GGAAGC	GATGCAG AGCTGAA CAATG	CGCAATG TTTTGATG CAGCCT
Atvirkštinio pradmes ilgis, bp	22	20	20	20	20	20	21
GC %	41	50	55	55	50	50	55
Amplifikuojamo fragmento ilgis, bp	148	149	115	122	145	259	167

2.4 lentelė PGR mišinys vienai reakcijai

Komponentas	Reakcijos tūris 20 µL
<i>Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2×)</i>	12,5 µL
Vanduo be nukleazių	3,95 µL
100 nM Pradmenys (-s ir -as)*	0,75 µL + 0,75 µL
5 µM ROX	0,05 µL
kDNR	2 µL

*-s – tiesioginis pradmuo; -as – atvirkštinis pradmuo

2.5 lentelė Temperatūrinio režimo programa AT-kPGR reakcijai.

Reakcijos stadija	Etapas	Temperatūra	Trukmė
Pradinė denatūracija	Denatūracija ir fermento aktyvinimas	95 °C	10 min.
Amplifikacija (45 ciklų)	DNR grandinių atskyrimas	95 °C	15 sek.
	Pradmenų prijungimas / grandinės ilginimas	60 °C	1 min.

DNR grandinių lydimas	DNR grandinių atskyrimas	95 °C	15 sek.
	Fluorescencinio dažo pašalinimas	60 °C	1 min.
	DNR grandinių atskyrimas	95 °C	30 sek.
	Fluorescencinio dažo pašalinimas	60 °C	15 sek.

2.2.6 Statistinė analizė

Magistrinio darbo metu buvo tirta *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB*, *ALDH1A1* ir *GAPDH* genų raiška TNKV pacienčių poriniuose kraujo plazmos mėginiuose. Duomenys gauti Ct (ciklo slenkstis) reikšmėmis buvo normalizuoti naudojant ΔCt (pastovios raiškos geno (*GAPDH*) Ct ir tiriamojo geno Ct reikšmių skirtumas tam tikram mėginiui). Normalizuota $\log_2$ raiška gauta pagal $\log_2(2^{(-\Delta Ct)})$ formulę. Genų raiškos mediana ir intervalas prieš ir po gydymo NAC pateikti 2.6 lentelėje.

Prieš duomenų analizę, siekiant panaikinti rezultatus, kurie gauti dėl netikslumų atliekant tyrimą, mėginiai buvo neanalizuojami, kurie 2 kartus $>$ ir $<$ buvo nutolę nuo geno raiškos vidurkio standartinio nuokrypio. Kiekybiniam genų raiškos įvertinimui naudotos $\log_2$ normalizuotos genų raiškos vertės.

Duomenų normalumo pasiskirstymui įvertinti buvo atliktas Shapiro-Wilk testas (angl. *Shapiro-Wilk test*). Statistinėje duomenų analizėje naudotas nepriklausomų imčių Mann-Whitney kriterijus (angl. *Mann Whitney rank-sum test*) taip pat koreliacijų analizei įvertinti naudotas Spearmano koreliacijos koeficientas (angl. *Spearman's rank correlation coefficient*). Apskaičiuotas genų raiškos skirtumas (GRS): – iš $\log_2$ normalizuoto genų raiškos kiekio po gydymo NAC atimtas $\log_2$ normalizuotas genų raiškos kiekis prieš NAC. Naudotas gydymo efektyvumui įvertinti. Raiškos pokytis buvo apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{Raiškos pokytis \%} = \frac{\text{Raiškos pokytis A grupėje}}{\text{Raiškos pokytis B grupėje}} \times 100.$$

Skaičiavimuose naudotas genų raiškos vidurkis. Rezultatai laikomi statistiškai reikšmingi, kuomet $P < 0,05$. Skaičiavimuose naudotas genų raiškos vidurkis. Rezultatai laikomi statistiškai reikšmingi, kuomet $P < 0,05$. TNKV pacienčių bendram išgyvenamumui (OS) ir išgyvenamumui be progresijos (PFS) įvertinti buvo atlikta *Kaplan Maeier* išgyvenamumo analizė pacientės suskirsčius grupėmis pagal kiekvieno iš genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos medianą: aukšta arba žema. Apskaičiuoti 95 % CI (pasikliautinieji intervalai) ir HR (santykinė rizika) grupių palyginimui naudotas *log-rank (Mantel-Cox)* testas. Rezultatai buvo

laikyti statistiškai reikšmingais, kai $P < 0,05$. Siekiant nustatyti genų jautrumą ir specifiškumą tarp pacienčių mėginių prieš ir po gydymo NAC buvo atlikta ROC analizė (angl. *receiver operating characteristic*). Apskaičiuotas jautrumas (JAU) ir specifiškumas (SPEC), taip pat, jam įvertinti dar buvo apskaičiuotas plotas po ROC (AUC, nuo angl. *area under the curve*). *BCL-2* ir *R-RAS-2* genų raiška ROC analizei buvo apjungta naudojant logistinės regresijos modelį.

Duomenų analizei ir vaizdavimui naudota *QuantStudio Design and Analysis Software* v. 2.5.0 (ABI, TFS), *Excel 2013* (Microsoft), *Graphpad Prism* v. 8.0.1 (Dotmatics), *MedCalc statistical software* v.14 (MedCalc Software Ltd) bei *Adobe Illustrator*, 2019 (Adobe).

3. REZULTATAI

3.1 Genų raiška TKNV plazmos mėginiuose

Magistrinio darbo metu *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* genų raiška buvo ištirta 184 poriniuose plazmos mėginiuose (94 – prieš ir 94 – po gydymo NAC TKNV pacienčių). Genų Ct duomenys pateikti **3.1 lentelėje**.

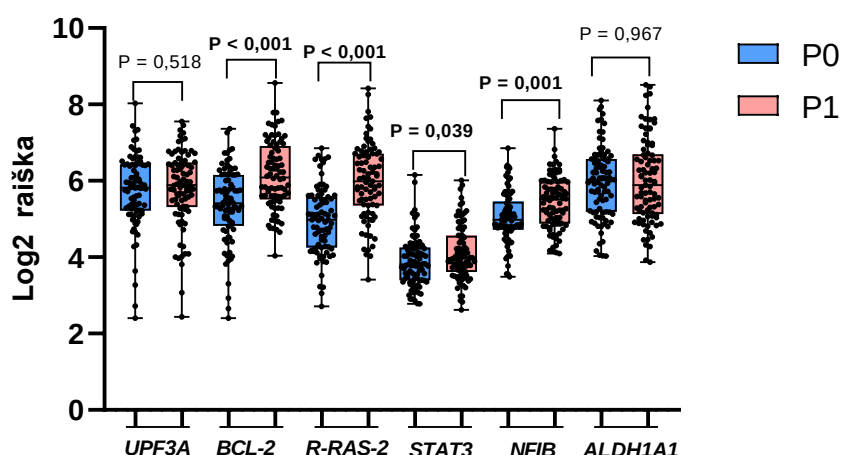
3.1 lentelė Tiriamųjų genų raiškos minimumas, maksimumas ir mediana, normalizuota pagal *GAPDH* geną prieš ir po gydymo NAC. NZ – mėginių, kuriuose nenustatyta genų raiška, skaičius

Genai	Prieš gydymą NAC				Po 6 mėn. gydymo NAC			
	Ct min	Ct max	Mediana	NZ	Ct min	Ct max	Mediana	NZ
<i>UPF3A</i>	37,059	29,076	33,229	3	38,794	30,349	33,253	2
<i>BCL-2</i>	34,325	28,757	32,866-	3	36,262	31,951	33,366	3
<i>R-RAS-2</i>	37,186	27,941	32,564	3	36,342	30,568	33,286	4
<i>STAT3</i>	34,218	27,440	30,422	0	34,901	26,487	30,396	0
<i>NFIB</i>	34,996	26,786	31,825	6	34,741	27,419	32,035	2
<i>ALDH1A1</i>	35,840	29,485	32,930	6	37,339	30,126	32,734	2

3.2. Genų raiškos pokyčiai pacienčių gydymo eigoje

Norėdami nustatyti ar genų raiška skiriasi poriniuose mėginiuose gydymo eigoje prieš (P0) ir po (P1) gydymo NAC, buvo atlikta genų raiškos analizė poriniuose TKNV pacienčių plazmos mėginiuose. Visų tiriamųjų genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* išskyrus *ALDH1A1* raiškos mediana nustatyta tendencingai padidėjusi iki 1,2 kartų P1 grupėje lyginant su P0. Specifiškai, nustatyta, kad *R-RAS-2* geno 1,2 didesnė P1 grupėje lyginant su P0 ($P < 0,001$), *BCL-2* geno raiška padidėjo 1,14 karto ($P < 0,001$). O *STAT3* ir *NFIB* genų nustatyti nežymus iki 1 karto raiškos pokytis P1 vs P0 grupėje ($P = 0,039$, $P = 0,001$,

atitinkamai). *UPF3A* ir *ALDH1A1* genų raiška statistiškai patikimai nesiskyrė tarp analizuojamų grupių ($P = 0,518$, $P = 0,967$, atitinkamai) (**3.1 pav.**).



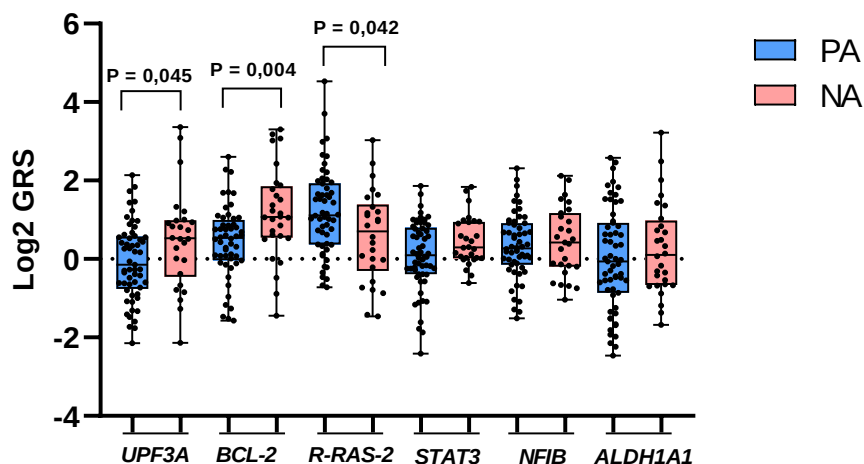
3.1 pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos pokyčiai TNKV pacienčių poriniuose plazmos mėginiuose prieš ir po gydymo NAC. Pateikta mediana, minimali / maksimali vertės. X ašyje – tiriami genai; Y ašyje – $\log_2$ normalizuota genų raiška.

3.3 Genų raiškos skirtumų sąsajos su atsaku į gydymą ir klinikiniais rodikliais

Klinikiniai rodikliai bei gydymo efektyvumo stebėjimas rodo suteiktos priežiūros kokybę pacientėms ir gydymo efektyvumą. Tyrėjai naudoja šiuos rodiklius siekiant įvertinti kaip pacientai reaguoja į gydymą, kas padeda spręsti koks gydymas turėtų būti taikomas pacientėms. Dėl šios priežasties tirtų genų raiškos skirtumas buvo palygintas palyginta pacienčių grupėse, suskirstytose pagal klinikinius rodiklius, kaip, pvz, diferenciacijos laipsnis, siekiant, išsiaiškinti ar *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* genų raiškos skirtumai galėtų būti naudojami kaip rodikliai leidžiantys įvertinti gydymo efektyvumą. Analizė atlikta atskirai naudojant GRS ir genų raiškos pokyčius norint įvertinti genų tinkamumą gydymo prognozės efektyvumui vertinti bei potencialą naudojant kaip biožymenis.

3.3.1. Genų raiškos skirtumų ryšys su atsaku į gydymą

Norėdami įvertinti ar genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos skirtumas gali būti naudojamas gydymo efektyvumui įvertinti, atlikta analizė pacienčių grupėse pagal atsaką į gydymą. GRS lyginamas pilno atsako (PA) (N = 62) ir nepilno atsako (NA) (N = 32) TNKV pacienčių grupėse. GRS iki 7 kartų didesnis NA grupėje visų tiriamųjų genų, išskyrus, *R-RAS-2*. Specifiškai, nustatyta 7 ir 3 kartus didesnis *UPF3A* ir *BCL-2* genų raiškos skirtumas NA vs PA grupėse ($P = 0,045$, $P = 0,004$; atitinkamai). Tuo tarpu *R-RAS-2* genų raiškos skirtumas nustatytas 2 kartus didesnis PA vs NA grupėse ($P = 0,042$) (3.2 pav.).

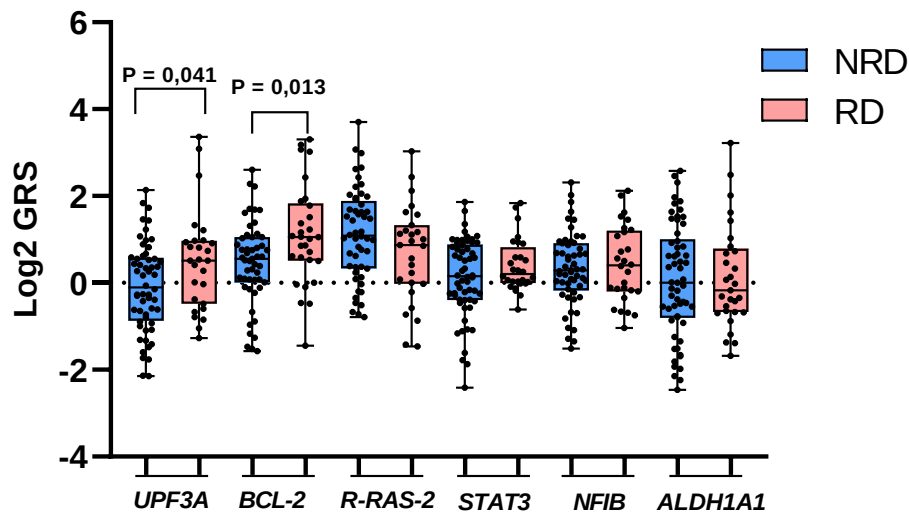


3.2 pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos skirtumo palyginimas PA (pilno atsako) vs NA (nepilno atsako). Pateikta mediana, minimali / maksimali vertės X ašyje – tiriami genai; Y ašyje – log₂ normalizuota genų raiškos skirtumas.

3.3.2. Genų raiškos skirtumų sąsajos su likutiniu naviku po gydymo NAC

Po NAC kurso atliekama rutininė operacija, kuria siekiama pašalinti galimai likusį naviką po chemoterapijos. Jei operacijos metu yra nustatomas likęs navikinis audinys, tai, taip pat, yra chemoterapijos efektyvumo rodiklis. Įvertinti ar genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos skirtumas yra susijęs su likutinio naviko radimu, buvo lyginamos TNKV pacienčių grupės be likutinio naviko (NRD) (N = 62) ir su likutiniu naviku (RD) (N = 32). Įvertinta, jog RD grupėje *UPF3A* GRS yra 6 kartus didesnis ($P = 0,041$), o

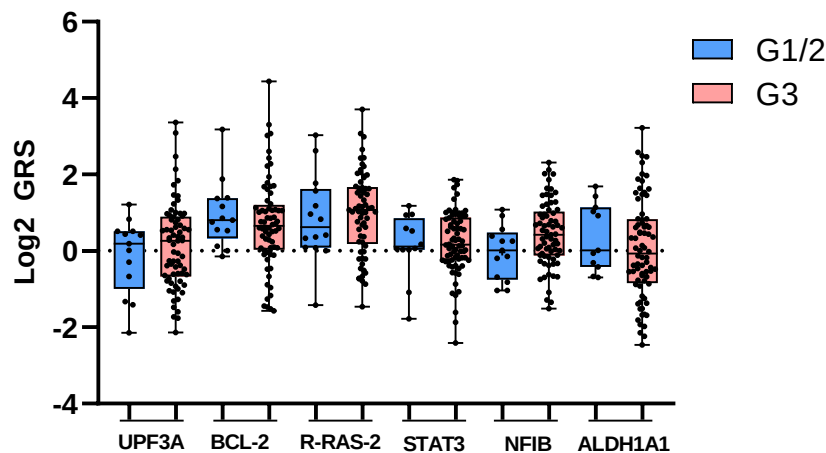
BCL-2 geno raiškos skirtumas 2 kartus didesnis lyginant su NRD ($P = 0,013$). Statistiškai reikšmingos padidėjusios kitų genų raiškos nenustatyta ($P > 0,05$) (**3.3 pav.**).



3.3 pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos skirtumo palyginimas RD (su likutiniu naviku) vs NRD (be likutinio naviko) TNKV pacienčių grupėse. Pateikta mediana, minimali / maksimali vertės. X ašyje – tiriami genai; Y ašyje – $\log_2$ normalizuota genų raiška

3.3.3. Genų raiškos skirtumų sąsaja su diferenciacijos laipsniu

Toliau, norint įvertinti ar GRS pokyčiai skiriasi priklausomai nuo diferenciacijos laipsnio (G). Diferenciacijos laipsnis parodo kiek skiriasi navikinės ląstelės nuo normalių ląstelių, taip leidžiant įvertinti ligos agresyvumą ir prognoze. Atlikta analizė TNKV pacienčių grupėse susiskirstytose pagal G1/2 ($N = 14$) vs G3 ($N = 80$). Nebuvo identifikuota statistiškai patikimų pakitimų bei jokios bendros tendencijos tarp pacienčių grupių (**3.4 pav.**).



3.4 pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* GRS palyginimas G1/2 ir G3 TNKV pacienčių grupėse. Pateikta mediana, minimali / maksimali vertės. X ašyje – tiriami genai; Y ašyje – $\log_2$ normalizuota genų raiška.

3.3.5 Genų raiškos pokyčių raiškos pokyčių sąsaja su CEA ir CA 15-3 rodikliais

Atlikta genų raiškos skirtumo koreliacija su TNKV pacientų klinikiniais rodikliais: CEA ir CA 15-3 prieš bei po gydymo NAC. Karcinoembrioninis antigenas (**CEA**) naudojamas įvertinti ar efektyviai veikia gydymas vėžinio susirgimo atveju ir jo specifinis kiekio kitimas po gydymo gali nurodyti, ar liga atsinaujino ar progresuoja ($\text{CEA} > 2,5 \text{ ng/ml}$). Nustatyta statistiškai reikšminga *R-RAS-2* geno koreliacija su CEA rodikliu prieš ir po gydymo chemoterapija ($R = 0,238$, $P = 0,036$; $R = 0,293$, $P = 0,046$, atitinkamai) (**3.1 lentelė**). Taip pat nustatyta *ALDH1A1* geno koreliacija su CEA prieš ir po NAC ($R = 0,233$ $P = 0,033$ $R = 0,269$ $P = 0,041$, atitinkamai). Galiausiai nustatyta teigiama *UPF3A* koreliacija su CEA po chemoterapijos ($R = 0,313$ $P = 0,024$). **CA 15-3** (angl. *Carcinoma Antigen 15-3*) pagrindinis krūties vėžio žymuo svarbus norint įvertinti gydymo sėkmę ir sekti ligos eigą. Aukštas CA 15-3 ($>30 \text{ U/mL}$) taip pat gali parodyti vėžio agresyvumą, gebėjimą plisti į gretimus audinius. Nebuvo nustatyta reikšminga genų koreliacijų su CA 15-3 tiek prieš, tiek po chemoterapijos.

3.1 lentelė. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* GRS koreliacija su TNKV žymenimis

<i>UPF3A</i>	<i>BCL-2</i>	<i>R-RAS-2</i>	<i>STAT3</i>	<i>NFIB</i>	<i>ALDH1A1</i>
Spearman R koeficientas (P reikšmė)					
CEA (ng/ml)					
0,164 (0,143)	0,090 (0,433)	0,238 (0,036)	0,014 (0,895)	-0,030 (0,793)	0,233 (0,033)
CA 15-3 (U/ml)					
-0,053 (0,638)	-0,074 (0,517)	-0,020 (0,856)	0,014 (0,895)	0,165 (0,144)	-0,014 (0,893)
CEA po chemoterapijos (ng/ml)¹					
0,313 (0,024)	0,734 (0,613)	0,293 (0,046)	0,112 (0,405)	-0,014 (0,919)	0,269 (0,041)
CA 15-3 po chemoterapijos (U/ml)²					
-0,014 (0,921)	-0,067 (0,633)	-0,002 (0,985)	0,096 (0,463)	0,197 (0,149)	-0,082 (0,536)

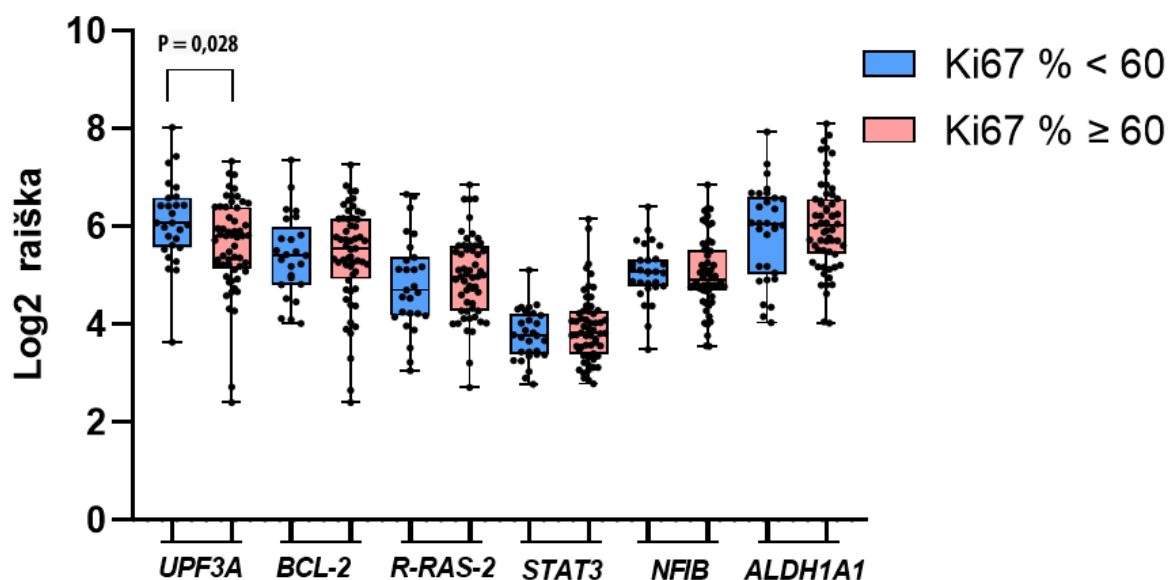
¹ dviems pacientams nepateiktas CEA po chemoterapijos rodiklis; ² vienam pacientui nepateiktas CA 15-3 po chemoterapijos rodiklis; CEA – karcinoembrioninis antigenas; CA 15-3 – krūties vėžio žymuo

3.4 Genų raiškos pokyčių sąsajos su pacienčių atsaku į gydymą

Genų raiškos sąsajų su atsaku į gydymą tyrimai prieš NAC padeda nustatyti, kaip efektyviai konkrečiam pacientui veiks jam pritaikytas gydymas ir konkretūs vaistai, taip leidžiant sukurti personalizuotą, efektyvesnį gydymą. Tai tai pat leidžia identifikuoti potencialius biožymenis leidžiančius potencialiai prognozuoti ligos eigą ir vystyti naujus, tikslesnius gydymo metodus. Dėl šios priežasties siekiant, išsiaiškinti ar *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* genų raiškos pokyčiai koreliuoja su atsaku į gydymą rodikliais, pvz. likutinio naviko būseną.

3.4.1. Genų raiškos pokyčių sąsaja su Ki67 % rodikliu

Ki67 % raiška yra siejama su vėžinių ląstelių dalijimusi, augimu ir yra ląstelių proliferacijos žymuo ligos progresijos metu. Ki67 % koreliuoja su vėžio metastazių atsiradimu ir navikų stadija. Taip pat Ki67 % raiška yra didesnė piktybiniuose naviko audiniuose lyginant su sveikais audiniais. Tyrimo metu dėl aukšto TNKV agresyvumo, pacientės buvo suskirstytos į 2 grupes: Ki67 % ≥ 60 % (N = 61) ir Ki67 % < 60 % (N = 33), siekiant įvertinti genų raiškos pokyčius priklausomai nuo Ki67 % didelės ir mažos raiškos TNKV pacienčių poriniuose mėginiuose. Nustatyta iki 1 karto didesnė *UPF3A* geno raiška Ki67 < 60 % pacientų grupėje ($P = 0,028$). Likusių genų raiškos skirtumų tarp pacienčių grupių nenustatyta ($P > 0,05$) (3.5 pav.).

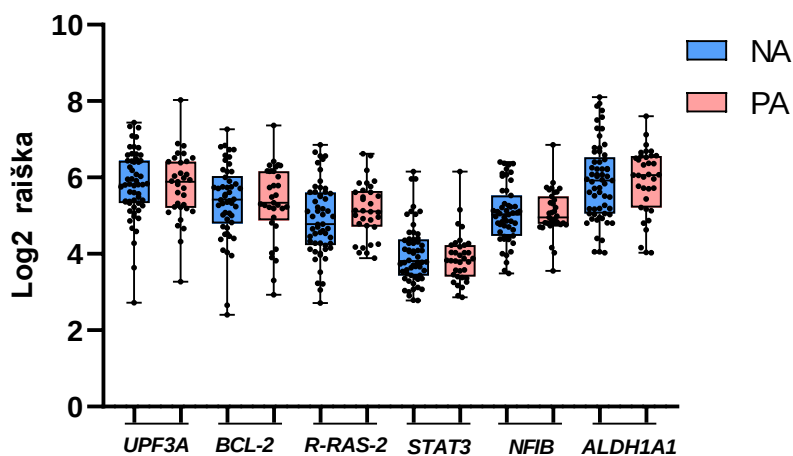


3.5 pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos pokyčių palyginimas Ki67 % ≥ 60 % ir Ki67 % < 60 TNKV pacienčių grupėse prieš gydymą NAC. Pateikta mediana, minimali / maksimali vertės. X ašyje – tiriami genai; Y ašyje – $\log_2$ normalizuota genų raiška.

3.4.2. Genų raiškos pokyčiai atsaką į gydymą

Norint įvertinti, ar genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos pokyčiai gali būti naudojami atsakui į gydymą NAC prognozei, atlikta analizė pacienčių grupėse pagal atsaką į gydymą. Buvo lyginama genų raiška PA ir NA grupėse. Nebuvo

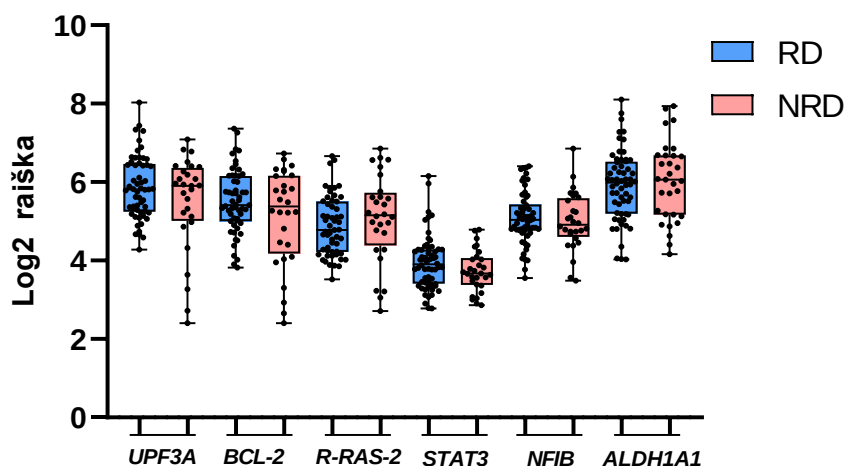
identifikuota jokios bendros tendencijos, taip pat nebuvo nustatyta reikšmingai pakitusios genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos (3.6 pav.).



3.6. pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos pokyčių palyginimas NA vs PA TNKV pacienčių grupėse prieš gydymą NAC. Pateikta mediana, minimali / maksimali vertės X ašyje – tiriami genai; Y ašyje – log₂ normalizuota genų raiška.

3.4.3. Genų raiškos pokyčių sąsajos su likutiniu naviku prieš gydymą NAC

Siekiant įvertinti ar genų raiška skiriasi priklausomai likutinio naviko identifikavimu po NAC kurso, atlikta analizė RD (angl. *residual disease*) ir NRD(angl. *no residual disease*) pacienčių grupėse. Nebuvo nustatyta jokios bendros tendencijos, taip pat nerasta jokio statistiškai reikšmingo pokyčio ($P > 0,05$) (3.7 pav.).



3.7. pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos pokyčių palyginimas RD (su likutiniu naviku) vs NRD (be likutinio naviko) TNKV pacienčių grupėse prieš gydymą NAC. Pateikta mediana, minimali / maksimali vertės. X ašyje – tiriami genai; Y ašyje – $\log_2$ normalizuota genų raiška.

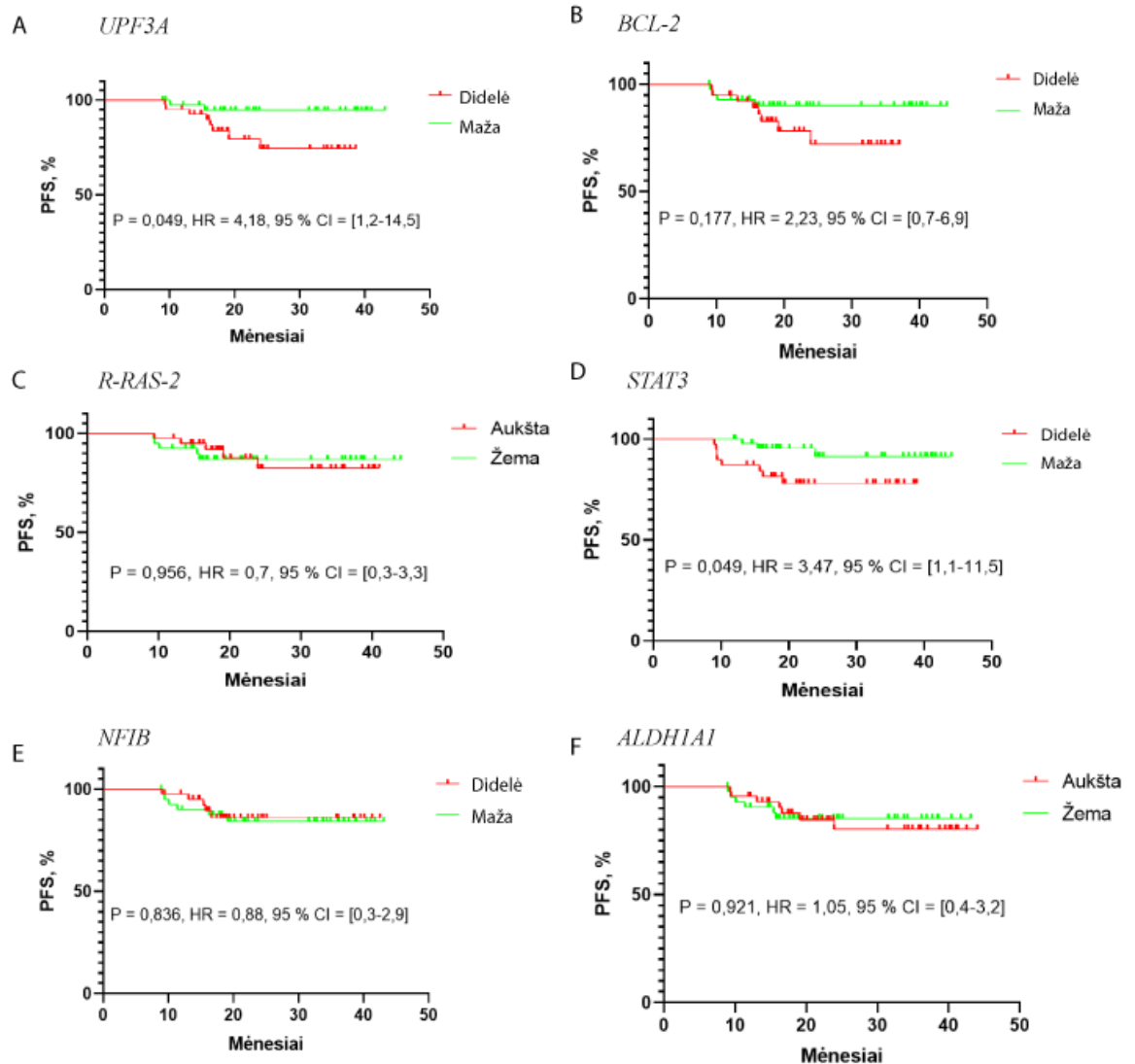
3.5 Genų raiškos pokyčių sąsaja su pacienčių išgyvenamumu

Siekiant įvertinti *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* genų raiškos sąsajas su pacienčių bendru išgyvenamumu (OS) ir išgyvenamumu be progresijos (PFS), pacientės buvo suskirstytos į aukštos arba žemos raiškos grupes, pagal raiškos medianą (**3.2 lentelė**) ir atlikta *Kaplan-Meier* kreivių išgyvenamumo analizė.

3.2 lentelė TNKV pacienčių grupės ir mediana, naudota *Kaplan-Meier* analizėje.

Genai	Didelė raiška, n	Maža raiška, N	Mediana, $\log_2$
<i>UPF3A</i>	43	41	5,82
<i>BCL-2</i>	40	40	5,40
<i>R-RAS-2</i>	51	39	4,98
<i>STAT3</i>	44	42	3,81
<i>NFIB</i>	42	41	4,97
<i>ALDH1A1</i>	44	43	6,02

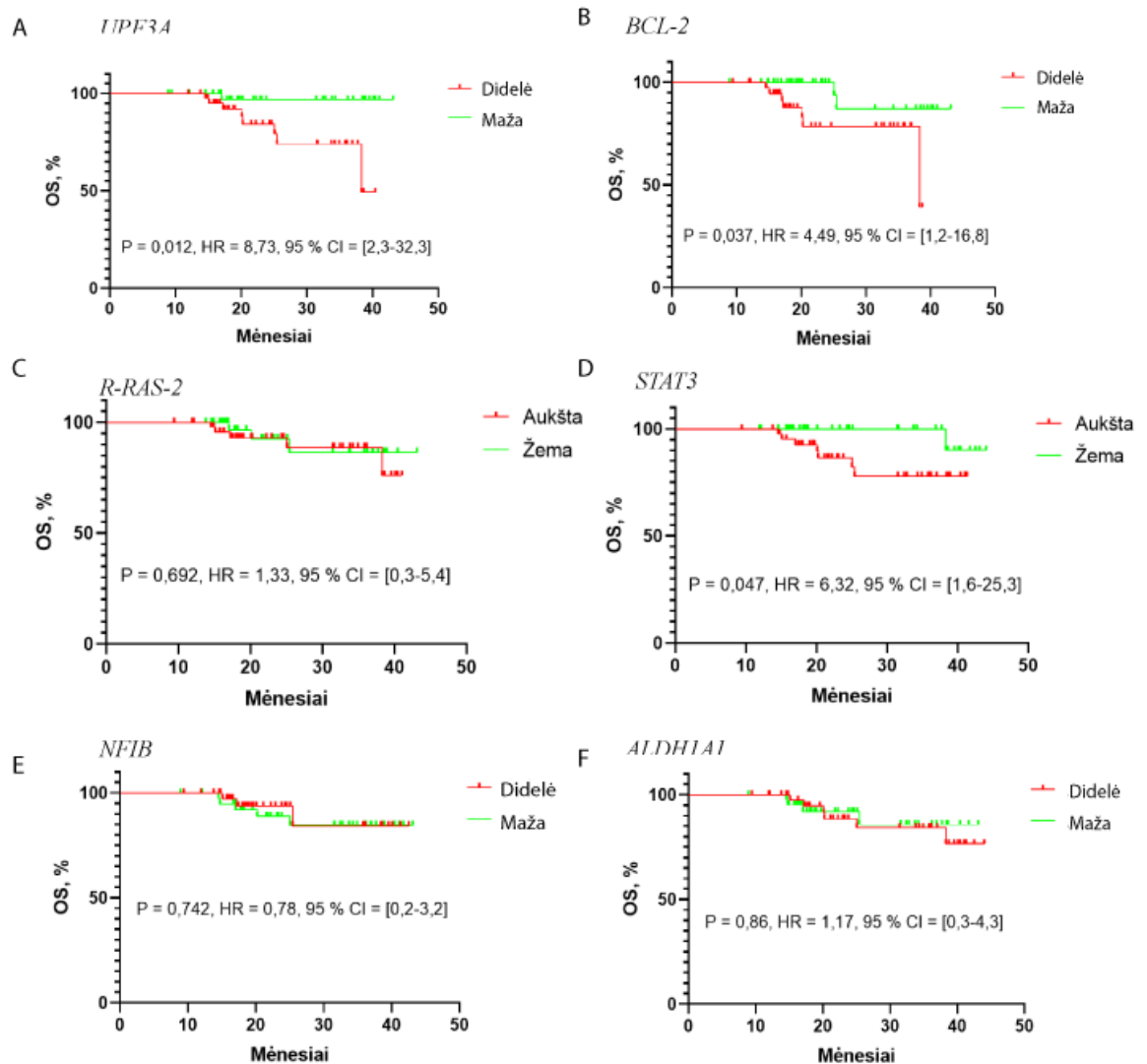
Nustatyta, kad pacienčių, kurioms nustatyta aukšta vs žema genų raiška, PFS buvo trumpesnis iki 7 mėnesių. Specifiškai nustatytas 7 mėnesiais trumpesnis PFS pacienčių grupėje su aukšta *UPF3A* raiška ($P = 0,049$, HR = 4,18, 95 % CI = [1,2–14,5]) (**3.8 pav. A**). Taip pat nustatytas 5 mėn. trumpesnis PFS pacienčių grupėje su aukšta *STAT3* raiška ($P = 0,047$, HR = 6,32, 95 % CI = [1,6–25,3]) (**3.8 pav. D**). Nenustatyta patikimų sąsajų tarp aukštos *R-RAS-2*, *NFIB* bei *ALDH1A1* genų raiškos ir trumpesnio PFS ($P > 0,05$).



3.8 pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* Kaplan-Meier išgyvenamumo kreivės, vaizduojančios ir PFS (išgyvenamumas be ligos progresijos) TNKV pacienčių grupėse pagal didelę vs mažą A) *UPF3A*; B) *BCL-2*; C) *R-RAS-2*; D) *STAT3*; E) *NFIB*; F) *ALDH1A1* genų raišką. X ašyje – išgyvenamumo laikotarpis mėnesiais; Y ašyje – išgyvenamumo procentas

Toliau, nustatyta jog pacientėms, kurioms nustatyta aukšta vs žema genų raiška, bendras išgyvenamumas buvo iki 5 mėn trumpesnis. Specifiškai pacientės su aukšta *UPF3A*, *BCL-2* raiška pasižymėjo 4 ir 5 mėn trumpesniu OS ($P = 0,012$, HR = 8,73, 95 % CI = [2,3–32,3], $P = 0,037$, HR = 4,49, 95 % CI = [1,2–16,8], atitinkamai) (3.9 pav. A, 3.9 pav. B).

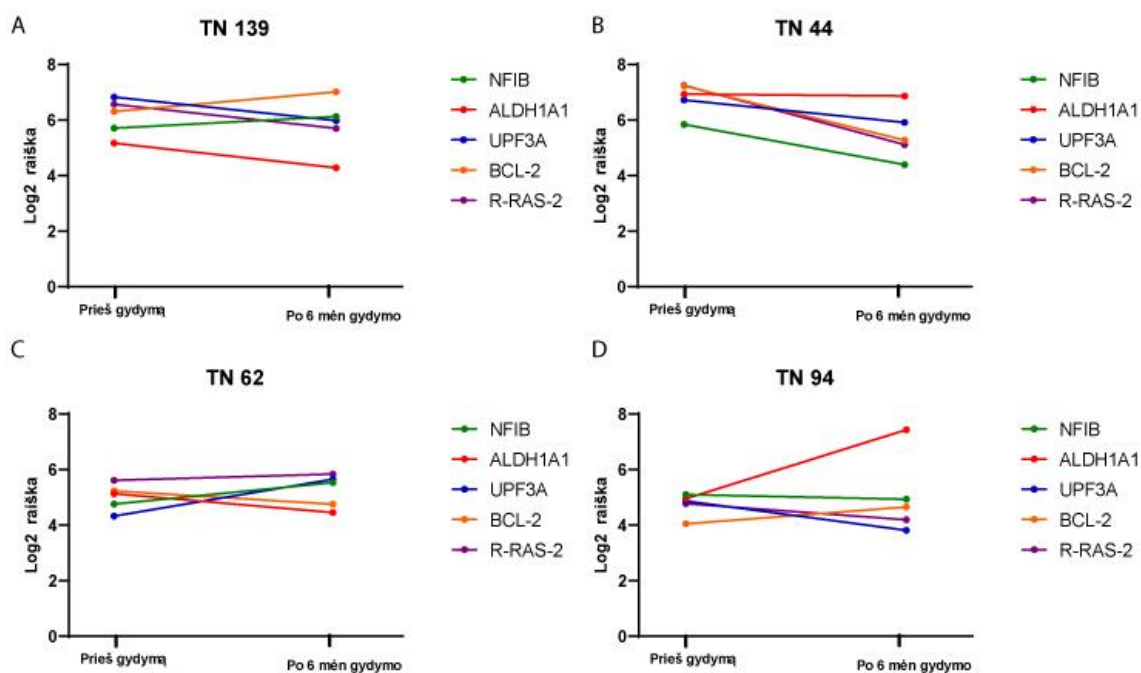
Taip pat pacientų su aukšta *STAT3* raiška OS buvo 3 mėn. trumpesnis ($P = 0,049$, $HR = 3,47$, $95\% \text{ CI} = [1,1-11,5]$) (3.9 pav. D).



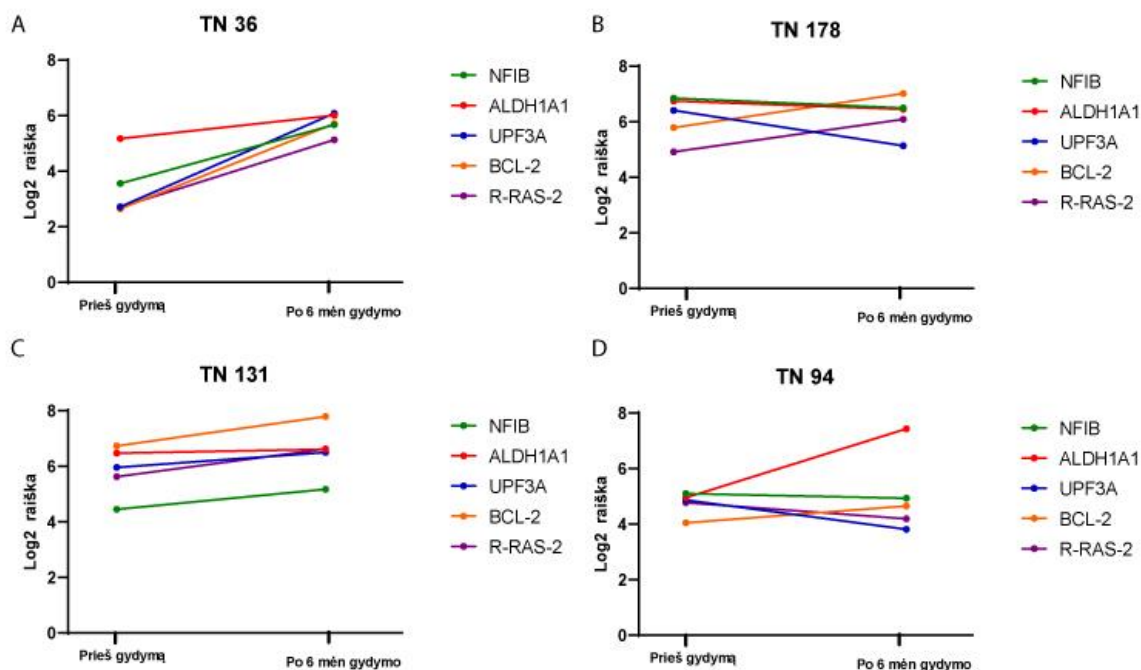
3.9 pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* Kaplan-Meier išgyvenamumo kreivės, vaizduojančios OS (bendras išgyvenamumas) TNKV pacientų grupėse pagal didelę vs mažą A) *UPF3A*; B) *BCL-2*; C) *R-RAS-2*; D) *STAT3*; E) *NFIB*; F) *ALDH1A1* genų raišką. X ašyje – išgyvenamumo laikotarpis mėnesiais; Y ašyje – išgyvenamumo procentas.

3.6 Genų raiškos pokytis gydymo eigoje TNKV progresijos atveju

Taip pat atlikta analizė su vėžio progresija. Atsitiktinai atrinkti 4 pacientės (TN 139, TN 44, TN 62, TN 94), kurių liga progresavo gydymo metu (**3.10 pav.**) ir 4 pacientės, kurioms, pasireiškė nepilnas atsakas gydymo metu (**3.11 pav.**). Tačiau, nepavyko nustatyti jokios bendros tendencijos lyginant genų raišką pacienčių gydymo eigoje.



3.10 pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos pokyčių analizė pacienčių mėginiuose, kuriuose buvo nustatyta ligos progresija gydymo eigoje. Y – ašyje Log₂ normalizuota genų raiška; X – ašyje taiškai prieš gydymą, ir po 6 mėn. NAC.



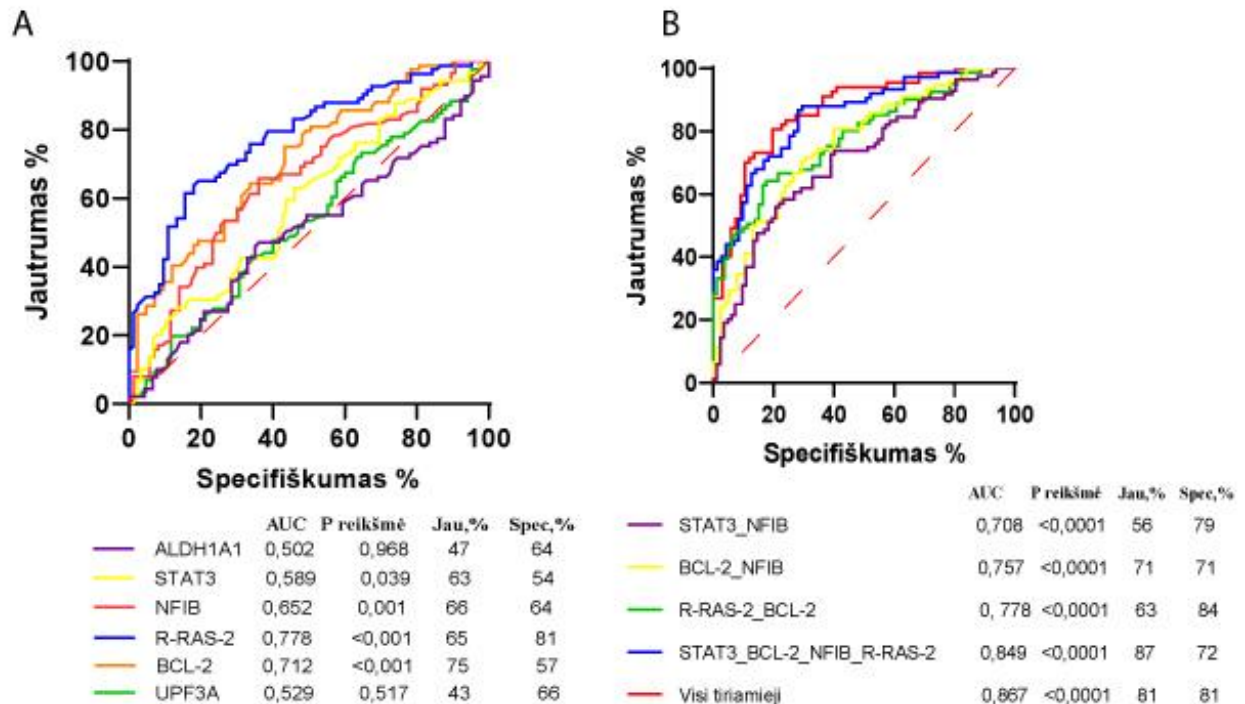
3.11 pav. Genų *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* raiškos pokyčių analizė pacienčių mėginiuose, kurioms nustatytas nepilnas atsakas gydymo eigoje. Y – ašyje Log₂ normalizuota genų raiška; X – ašyje taiškai prieš gydymą, ir po 6 mėn. NAC.

3.7 TNKV biožymenų ROC kreivių analizė

Magistrinio darbo metu atlikta *STAT3* signalino kelio genų raiškos pokyčių jautrumo ir specifiškumo ROC kreivių (angl. *receiver operating characteristic*) analizė siekiant įvertinti biožymenų jautrumą ir specifiškumą nustatyti NAC efektyvumą. Analizė atlikta *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* genuose atskirai (**3.12 pav. A**). Nustatyta jog *STAT3*, *NFIB*, *BCL-2* ir *R-RAS-2* patikimai atskiria pacienčių porinius mėginius prieš ir po gydymo NAC. Tačiau didžiausiu jautrumu (JAU %) bei specifiškumu (SPEC %) pasižymėjo *R-RAS-2* bei *BCL-2* genai (AUC = 0,778, P < 0,001, JAU = 65 %, SPEC = 81 %; AUC = 0,712, P < 0,001, JAU = 75 %, SPEC = 57 %, atitinkamai).

Toliau, sugrupuoti tiriamieji genai pasižymėję didžiausiu jautrumu ir specifiškumu ir kombinacijos su patikimiausiais rezultatais pateiktos (**3.12 pav. B**). Matyti, jog geriausi rezultatai pasiekiami sugrupavus visus tiriamuosius genus ir 4 genus su aukščiausiu

specifiškumu bei jautrumu (*STAT3*, *NFIB*, *R-RAS-2* ir *BCL-2*) ($AUC = 0,867$ $P < 0,001$, $JAU = 81\%$, $SPEC = 81\%$; $AUC = 0,849$, $P < 0,001$, $JAU = 87\%$, $SPEC = 72\%$, atitinkamai).



3.12 pav. ROC analizės kreivės vaizduojančios *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1* genų (A) ir jų kombinacijų (B), jautrumą ir specifiškumą TNKV pacienčių gydymo eigoje prieš ir po gydymo NAC.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Krūties vėžys yra dažniausiai nustatomas ir daugiausiai mirčių lemiantis moterų onkologinis susirgimas, o TNKV – agresyviausias ir didžiausiu mirtingumu pasižymintis KV potipis. Didelis mirtingumo dažnis yra lemiamas riboto gydymo galimybių, nes hormoninės ir į HER2 nutaikytos terapijos prasto efektyvumo. Todėl iki šiol pagrindiniu gydymo standartu išlieka chemoterapija, tačiau dėl didelio TNKV navikų heterogeniškumo ir sunkių šalutinių poveikių, pacientams gali išsivystyti atsparumas chemoterapijai (Kim et al. 2018; J. J. Qin et al. 2019). Dėl šios priežasties yra poreikis ieškoti naujų potencialių taikinių ir biožymenų TNKV, kurių pagalba galima būtų identifikuoti bei sekti ligos progresiją.

Vienas iš potencialių taikinių yra *STAT3* genas ir jo signalinis kelias, kuris potencialiai veikia kaip TNKV molekulinis taikinyss ir biožymuo. *STAT3* yra žinomas transkripcijos faktorius, kurio raiška yra pakitusi beveik visuose vėžiniuose susirgimuose įskaitant TNKV ir yra siejama su greitesne vėžio progresija bei prastesne ligos prognoze (J. J. Qin et al. 2019). Taip pat *STAT3* genas ir jo signalinio kelio dalyviai, manoma, jog gali atsakingi dėl padidėjusio pacientų atsparumu chemoterapijai bei prastesnės ligos eigos ir prognozės. Todėl *STAT3* signalinis kelias galėtų būtų potencialus molekulinis taikinyss TNKV leidžiantis įvertinti atsaką į gydymą, ligos progresijos riziką.

Magistrinio darbo metu buvo siekiama ištirti su *STAT3* signaliniu keliu siejamus genus ir įvertinti jų raiškos pokyčių sąsajas su klinikiniais bei demografiniais rodikliais. Atrinkti 6 tiriamieji genai: *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* ir *ALDH1A1*. Pirmiausia išsiaiškinta, jog genų *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3*, *NFIB* raiška padidėjo kraujo plazmos mėginiuose po 6 mėn. gydymo NAC. Tai galėtų reikšti, jog tiriamieji genai dalyvauja navikinių ląstelių atsparumo vystymesi, slopinant apoptozę ar skatinant DNR pažaidų taisymą. Dar galima teigti, jog genai potencialiai siejami su adaptaciniu atsaku į chemoterapijos sukeltą stresą. Panašius rezultatus nustatė ir Ellis bei kolegų atliktame tyrime, kur tyrėjų duomenimis, *BCL-2* geno raiška taip pat buvo įvertinta reikšmingai padidėjusi (iki 50 %) po vs prieš gydymo epirubicinu ir cisplatina ($P = 0,030$) (Ellis et al. 1998). Tačiau, verta paminėti jog šiame tyrime buvo analizuotas KV audinys imunohistocheminiu metodu, o ne skysčių biopsija. Taip pat, kitų tyrėjų analizuota *R-RAS-2* geno raiška skirtinguose vėžiniuose susirgimuose: stemplės ir centrinės nervų sistemos, kur buvo parodyta, kad *R-*

RAS-2 geno raiška buvo padidėjusi nuo 3 iki 7 kartų ($P < 0,05$) vėžiu sergančiuose pacientuose lyginant su kontrolėmis (Gutierrez Erlandsson et al. 2013; Sharma et al. 2005).

Magistrinio darbo metu buvo tiriama genų raiškos skirtumų sąsajos su pacienčių klinikiniais rodikliais: atsaku į gydymą, likutinio naviko nustatymu po gydymo (RD), diferenciacijos laipsniu ir Ki67 % rodikliu. Naudojant GRS galima įvertinti, parinkto gydymo efektyvumą ir tinkamumą, kadangi didesnis GRS rodo potencialiai prastesnę atsaką į terapiją (Schmittgen and Livak 2008). Baigiamojo darbo metu nustatytas didesnis *UPF3A* ir *BCL-2* GRS PA atsako grupėje lyginant su NA. Ir atvirkščiai gautas didesnis *R-RAS-2* GRS NA grupėje lyginant su PA. Gauti rezultatai yra prieštaringi, kadangi, didesnis GRS pilno atsako pacientų grupėje, potencialiai reiškia, jog gydymas buvo efektyvus ir neaktyvavo kompensacinių mechanizmus, padedančių vėžinėms ląstelėms išgyventi. Tuo tarpu didesnis GRS NA grupėje, rodo jog chemoterapija nebuvo visiškai efektyvi ir gali reikšti atsparumo mechanizmų aktyvavimą, leidžiantį vėžinėms ląstelėms prisitaikyti. Skirtingi rezultatai reiškia, jog genai dalyvauja skirtinguose molekuliniuose procesuose atsako į chemoterapiją metu, kas gali suteikti naudingos informacijos apie mechanizmus lemiančius atsaką į gydymą ir leisti optimizuoti gydymo strategijas.

RD reiškia, jog organizme yra likę vėžinių ląstelių, po pradinio gydymo NAC. Tai padidina vėžio atsinaujinimo riziką ir gali reikšti tolimesnio gydymo pvz., chemoterapijos poreikį. Dėl šios priežasties yra reikalingi potencialūs prognostiniai biožymenys, kurie padėtų iš anksto įvertinti chemoterapijos veiksmingumą ir likutinio naviko tikimybę. Baigiamojo darbo metu buvo nustatytas didesnis GRS skirtumas *UPF3A* ir *BCL-2* genų pacienčių RD grupėje. Šie rezultatai, sutampa su kitų mokslininkų duomenimis, jog *BCL-2* ir *UPF3A* genai yra svarbūs navikinių ląstelių išgyvenamumui bei prisitaikymui. *BCL-2* yra anti-apoptotinis baltymas dalyvaujantis reguliuojant mitochondrijų sukeltą apoptozę ir jo padidėjusi raiška siejama su prasta ligos prognoze bei sumažėjusiu chemoterapijos efektyvumu (Nedeljković and Damjanović 2019). Tuo tarpu *UPF3A* genas, dalyvauja NMD reguliacijoje ir jo padidėjusi raiška siejama su NMD funkcijos sutrikimu, ir navikų augimu bei ligos agresyvumu (Yang et al., 2013). Panašūs rezultatai gauti ir kitų autorių, Yang bei kolegos tyrė *BCL-2* geno raiškos pokyčius KV navikų mėginiuose ($N = 1285$) ir nustatė, jog neigiama *BCL-2* geno raiška yra siejama su chemoterapijos efektyvumu, nes pacienčių grupėje nebuvo nustatytas likutinis navikas ($P < 0,010$).

CEA ir CA 15-3 serumo biožymenys yra baltymai kurių koncentracija, gali padidėti tam tikrų vėžinių susirgimų atvejais. Jų koncentracijos kiekio pokytis klinikinėje praktikoje yra naudojamas stebėti vėžio eigai, progresijai ir gydymo atsakui. GRS naudojimas kartu su serumo žymenimis galėtų sukurti tikslesnę diagnostikos priemonę siekiant įvertinti vėžio agresyvumą (Shao et al. 2015). Baigiamojo darbo metu buvo nustatyta silpna *R-RAS-2* ir *ALDH1A1* GRS koreliacija su CEA žymeniu prieš ir po chemoterapijos bei *UPF3A* vidutinė genų raiškos skirtumo koreliacija su CEA žymeniu prieš chemoterapiją. Specifiškai koreliacija sutapo su aukštesniais CEA rodikliais žyminčiais agresyviais vėžines formas (CEA > 2,5 ng/ml) Tačiau, nenustatyta nustatyta *BCL-2* geno raiškos koreliacija su CEA biožymeniu nesmulkiąstelinio plaučių vėžio atveju ($R = 0,361$ $P = 0,010$) lyginant su sveikais asmenimis (Elnaggar et al. 2021). Šie rezultatai nesutampa su baigiamojo darbo metu gautais duomenimis.

Baigiamojo darbo metu, kaip ir Sirkisoon ir kolegos nustatėme, jog didelė *UPF3A* geno raiška yra siejama su prastesniu PFS (Sirkisoon et al. 2018), atliktame tyrime, analizuota TNKV ir tirta *UPF3A* bei *R-RAS-2* genų raiškos sąsajos su atsaku į gydymą. Magistro metu gavome iš dalies panašius rezultatus, kadangi nepavyko nustatyti reikšmingos sąsajos tarp *R-RAS-2* geno padidėjusios raiškos ir prastesnio PFS. Tačiau šie skirtumai galėjo atsirasti dėl to, nes Sirkisoon bei kolegų tyrime genų raiška buvo analizuota KV ląstelių linijose bei KV navikuose ($N = 710$) ir buvo didelis imčių skirtumas. Toliau lyginant gautus rezultatus, kaip ir Bao bei kolegų tyrimo metu nustatyta, jog didelė *UPF3A* raiška yra siejama su prastesniu bendru išgyvenamumu (OS) ($P < 0,001$) (Bao et al. 2020). Bao ir kt. publikacijoje analizuota baltymo raiška storosios žarnos vėžio navikuose ($N = 158$) imunohistocheminiu metodu. Todėl, norint pritaikyti *UPF3A* raiškos pokytį, kaip potencialų prognostinį ligos eigos žymenį TNKV pacientėms, reiktų išsamesnių tyrimų TNKV imtyje. Taip pat Megan ir kolegų atliktame tyrime, buvo nustatyta, jog padidėjusi *STAT3* geno raiška yra siejama su prastesniu PFS pacientėse sergančiose bazaliniu KV potipiu ($P = 0,025$) (Conway et al. 2020). Tačiau, verta paminėti, jog tyrime buvo analizuotos ląstelių linijos ir naudotas NKS metodas. Galiausiai, magistrinio darbo metu, kaip ir Daniel bei kolegoms, pavyko nustatyti jog didelė *BCL-2* geno raiška yra siejama su prastesniu OS ($P = 0,002$) (Westaby et al. 2024). Tačiau šiame tyrime, buvo analizuotas prostatos vėžys, ir naudoti biopsijos mėginiai tiriant geno raišką.

Atlikta genų raiškos pokyčių ROC kreivių analizė TNKV pacientėse, siekiant įvertinti tiriamųjų genų gebėjimą atskirti mėginius prieš gydymą ir po. Baigiamojo darbo metu

nustatyta, jog *STAT3*, *R-RAS-2*, *UPF3A* ir *BCL-2* genų raiška geba jautriai ir specifiskai atskirti mėginius prieš ir po gydymo NAC. Didžiausia AUC reikšmė pasižymėjo *R-RAS-2* genas (0,778), taip pat jautrumo ir specifiskumo vertės irgi buvo didžiausios (JAU = 65 %, SPEC = 81 %). Toliau biožymenys buvo bandoma apjungti ir įvertinti kokios genų kombinacijos pasižymi geriausiomis AUC reikšmėmis. Naudojant genų kombinacijas gautas vidutiniškai geresnės AUC reikšmės ir didesnis jautrumas bei specifiskumas. Genų kombinacijos geriau atskiria pacientės dėl to, jog kombinuojant yra apimami papildomi molekuliniai mechanizmai ir taip geriau atsižvelgiama į TNKV navikų heterogeniškumą. Todėl toks kombinacijos būdas gali tiksliau numatyti prognozę ar gydymo atsaką.

STAT3 genas bei jo signaliniame kelyje dalyvaujantys genai *UPF3A*, *BCL-2*, *R-RAS-2*, *NFIB* ir *ALDH1A1* galeėtų būti potencialūs biožymenys naudojami ligos progresijai ir gydymo efektyvumui įvertinti. Tačiau dėl riboto publikacijų kiekio tiriančių šio signalinio kelio genu poveikį TNKV pacientėse yra reikalingi išsamesni tyrimai norint tai patvirtinti.

5. IŠVADOS

1. *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3* ir *NFIB* genų raiškos padidėjimas iki 1,2 kartų po gydymo neoadjuvantine chemoterapija, gali būti siejamas su atsparumu kombinuotam gydymui taikant pakliltakseliu su karboplatina bei doksirubicinu ir ciklofosfavidinu. ($P < 0,05$)
2. Skirtingose pacienčių atsako grupėse, iki 7 kartų didesnis *UPF3A* ir *BCL-2* genų raiškos skirtumas gali būti siejamas su nepilnu atsaku į gydymą ir, atitinkamai, likutiniu naviku, o iki 2 kartų didesnis *R-RAS-2* raiškos skirtumas gali būti siejamas su pilnu atsaku į gydymą ($P < 0,05$).
3. Lyginant klinikinių žymenų koncentracijų ir jų kiekio sąsajas su tirtų genų raiškos pokyčiais nustatyta, jog *R-RAS-2*, *ALDH1A1* bei *UPF3A* galėtų būti pritaikomi naviko agresyvumui nustatyti kartu su CEA žymeniu ir Ki67 % rodikliu prieš bei po NAC ($P < 0,05$).
4. Po gydymo NAC nustatytos sąsajos tarp didelės *UPF3A* ir *STAT3* raiškos bei iki 7 ir 5 mėn. trumpesniu OS ir PFS ($P < 0,05$); didelės *BCL-2* geno raiškos ir 7 mėn. trumpesniu PFS ($P < 0,05$).

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Justas Burauskas

STAT3 signalinio kelio genų raiškos tyrimas trejopai neigiamo krūties
vėžio ligonių kraujo plazmoje

Molekulinės biologijos magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Trejopai neigiamas krūties vėžys (TNKV) yra agresyviausias krūties vėžio potipis, lemiantis 15–20 % krūties vėžio atvejų. Pagrindinis TNKV požymis yra progesterono (PR), estrogenų receptorių (ER) ir žmogaus augimo faktoriaus 2 receptorių (HER2) trūkumas. TNKV pacientams gydyti yra taikoma neoadjuvantinė chemoterapija (NAC), kuri yra skirta sumažinti naviką prieš operaciją. Tačiau ~ 50 % pacienčių išsivysto atsparumas taikomam gydymui. Serijinių skysčių biopsijos ėminių tyrimas vėžio gydymo eigoje, gali padėti neinvaziniu būdu suprasti ir įvertinti gydymo efektyvumą. Dažniausiai skysčių biopsijos tyrimuose yra naudojama kraujo plazma. *R-RAS-2*, *BCL-2*, *UPF3A*, *NFIB* ir *ALDH1A1* veikia STAT3 signaliniame kelyje, o STAT3 sąsaja su atsparumu chemoterapijai yra žinoma. Šių genų raiškos pokyčių nustatymas kraujo plazmoje galėtų būti naudojamas kaip neinvazinis metodas leidžiantis sekti atsaką į NAC ir ligos progresiją TNKV pacienčių gydymo eigoje. Todėl šio tyrimo tikslas buvo įvertinti STAT3 signalinio kelio genų raiškos pokyčius TNKV pacienčių kraujo plazmoje gydymo NAC eigoje ir nustatyti jų tinkamumą atsako į gydymą, ligos progresijos prognozavimui AT-kPGR metodu.

Nustatyta jog *BCL-2*, *R-RAS-2*, *STAT3* ir *NFIB* genų raiška padidėjo po gydymo NAC ($P < 0,001$; $P < 0,001$; $P = 0,039$; $P = 0,001$, atitinkamai). Iki 7 ir 3 kartų didesnis *UPF3A* ir *BCL-2* genų raiškos skirtumas gali būti susijęs su nepilnu atsaku į gydymą ($P = 0,045$, $P = 0,004$) ir, atitinkamai likutiniu naviku po gydymo ($P = 0,041$, $P = 0,013$) bei iki 2 kartų didesnė *R-RAS-2* geno raiška susijusi su geresniu atsaku į gydymą ($P = 0,042$). Taip pat nustatytos teigiamos sąsajos su Ki67 ir CEA prieš NAC. Po gydymo NAC nustatytos sąsajos tarp didelės *UPF3A* ir *STAT3* genų raiškos, ir iki trumpesnio OS; (5 ir 4 mėn. $P = 0,012$, ir $P = 0,047$, atitinkamai) ir trumpesniu PFS (iki 7 mėn; $P = 0,049$ ir $P = 0,049$, atitinkamai), taip pat didelės *BCL-2* geno raiškos ir 7 mėn trumpesnio PFS (48 %; $P = 0,037$). Šie genai galėtų būti naudojami kaip prediktyviniai žymenys atsakui į NAC ir išgyvenamumo prognozei, tačiau reikalingi išsamesni tyrimai.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Justas Burauskas

STAT3 signaling pathway gene expression change analysis in blood plasma of
triple negative breast cancer patients

Master thesis

SUMMARY

Triple-negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive subtype of breast cancer, accounting for 15-20% of all breast cancer cases. The main feature of TNBC is the lack of estrogen (ER), progesterone receptor (PR) and human growth factor 2 receptor (HER2) receptors. Neoadjuvant chemotherapy (NAC) is used to treat patients with TNBC. However, ~50% of patients develop resistance. Examination of serial liquid biopsy samples during cancer treatment can help to non-invasively understand and monitor the effectiveness of treatment. Blood plasma is most commonly used in liquid biopsy studies. *R-RAS-2*, *BCL-2*, *NFIB*, *ALDH1A1* and *UPF3A* act in the STAT3 signaling pathway, and STAT3 is associated with chemotherapy resistance. Detection of these gene expression changes in blood plasma could be used as a non-invasive method to monitor the response to NAC and disease progression during treatment of TNBC patients. Therefore, the aim of this study was to evaluate gene expression changes in the STAT3 signaling pathway in the blood plasma of TNBC patients during NAC treatment to determine their suitability for predicting response to treatment and disease progression by RT-qPCR method.

BCL-2, *R-RAS-2*, *STAT3* and *NFIB* gene expression increased after neoadjuvant chemotherapy ($P < 0.001$; $P < 0.001$; $P = 0.039$; $P = 0.001$, respectively). Up to 7 and 3 times higher *UPF3A* and *BCL-2* gene expression differences may be associated with incomplete response to treatment and, respectively, residual tumors after treatment ($P = 0.045$ $P = 0.004$ and $P = 0.041$, $P = 0.013$, respectively) also, up to 2 times higher *R-RAS-2* is associated with better response to treatment ($P = 0.042$). Associations with Ki67 % and CEA before NAC were also found. Also, it was found that high expression of *UPF3A* and *STAT3* after was associated with a shorter OS (up to 5 months; $P = 0.012$, and $P = 0.047$, respectively) and shorter PFS (up to 7 months; $P = 0.049$, and $P = 0.049$, respectively), as well as high *BCL-2* expression and a 7-month shorter PFS ($P = 0.037$). These genes could be used as predictive markers for response to NAC and survival prognosis however more detailed studies are needed.

Asmeninio indėlio aprašymas

Magistrinio darbo tyrimo idėją formulavo darbo vadovė (dr. R. Sabaliauskaitė) kartu su konsultante (dakt. A. Šeštokaitė). Su tyrimu visą susijusią literatūrą analizavo ir STAT3 signalinio kelio taikinius atrinko bei kūrė genų pradmenis J. Buraukas, kuris atliko eksperimentų planavimą, rezultatų analizę (statistinė analizė) ir jų pateikimą bei aprašymą. Magistrinio darbo metu imtis papildyta 27 pacientėmis, ir papildomai ištirti 3 tiriamieji genai (*STAT3*, *NFIB*, *ALDH1A1*)(33 pacientai). Dalis eksperimentų buvo atlikti komandos narės Aistės Gerulaitytės, jos baigiamojo darbo metu („STAT3 signalinio kelio genų raiškos pokyčių įvertinimas trejopai neigiamo krūties vėžio pacientų kraujyje“) (RNR gryninimas, kDNR sintezė ir AT-kPGR). Išvados suformuluotos kartu su tyrimo komanda.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Internetiniai šaltiniai:

1. *Breast Anatomy: Breast Cancer, Breastfeeding, Conditions*. (n.d.). Cleveland Clinic. Retrieved June 11, 2022, from <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/8330-breast-anatomy>
2. *Cancer*. (n.d.). Retrieved April 26, 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
3. *Cancer*. (n.d.). Retrieved April 26, 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
4. *Essentials of Real-Time PCR - LT*. (n.d.). Retrieved May 5, 2022, from <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>
5. *GRCh38.p14—Hg38—Genome—Assembly—NCBI*. (n.d.). Retrieved May 6, 2022, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.40/
6. *Immunotherapy for Breast Cancer | Breast Cancer Treatment*. (n.d.). Retrieved April 12, 2023, from <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/immunotherapy.html>
7. <https://www.biorender.com/>
8. *miRNeasy Serum/Plasma Handbook—QIAGEN*. (n.d.). Retrieved June 4, 2022, from <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=46286f7e-0bee-4820-9af1-654b578c98c8&lang=en>

Literatūriniai šaltiniai:

1. Alard, Emilie, Aura-Bianca Butnariu, Marta Grillo, Charlotte Kirkham, Dmitry Aleksandrovich Zinovkin, Louise Newnham, Jenna Macciochi, and Md Zahidul Islam Pranjol. 2020. "Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets." *Cancers* 12(7):1826. doi: 10.3390/cancers12071826.
2. Almansour, Nahlah Makki. 2022. "Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence." *Frontiers in Molecular Biosciences* 9:836417. doi: 10.3389/fmolb.2022.836417.
3. Anon. n.d.-a. "Cancer." Retrieved April 26, 2022 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>).
4. Anon. n.d.-b. "Essentials of Real-Time PCR - LT." Retrieved May 5, 2022 (<http://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>).
5. Anon. n.d.-c. "Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries - Bray - 2024 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library." Retrieved December 11, 2024 (<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21834>).
6. Anon. n.d.-d. "GRCh38.P14 - Hg38 - Genome - Assembly - NCBI." Retrieved May 6, 2022 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.40/).
7. Anon. n.d.-e. "Immunotherapy for Breast Cancer | Breast Cancer Treatment." Retrieved April 12, 2023 (<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/immunotherapy.html>).
8. Anon. n.d.-f. "miRNeasy Serum/Plasma Handbook - QIAGEN." Retrieved June 4, 2022 (<https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=46286f7e-0bee-4820-9af1-654b578c98c8&lang=en>).
9. Bao, Xinmin, Yuji Huang, Weimin Xu, and Gongyou Xiong. 2020. "Functions and Clinical Significance of UPF3a Expression in Human Colorectal Cancer." *Cancer Management and Research* 12:4271–81. doi: 10.2147/CMAR.S244486.
10. Barbuti, Anna Maria, and Zhe-Sheng Chen. 2015. "Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy." *Cancers* 7(4):2360–71. doi: 10.3390/cancers7040897.
11. Chen, Aileen, Chikezie O. Madu, and Yi Lu. 2019. "The Functional Role of Bcl-2 Family of Proteins in the Immune System and Cancer." *Oncomedicine* 4:17–26. doi: 10.7150/oncm.27020.
12. Chen, Ming, and Hongyu Zhao. 2019. "Next-Generation Sequencing in Liquid Biopsy: Cancer Screening and Early Detection." *Human Genomics* 13(1):34. doi: 10.1186/s40246-019-0220-8.

13. Christowitz, Claudia, Tanja Davis, Ashwin Isaacs, Gustav van Niekerk, Suzel Hattingh, and Anna-Mart Engelbrecht. 2019. "Mechanisms of Doxorubicin-Induced Drug Resistance and Drug Resistant Tumour Growth in a Murine Breast Tumour Model." *BMC Cancer* 19(1):757. doi: 10.1186/s12885-019-5939-z.
14. Conway, Megan E., Joy M. McDaniel, James M. Graham, Katrin P. Guillen, Patsy G. Oliver, Stephanie L. Parker, Peibin Yue, James Turkson, Donald J. Buchsbaum, Bryan E. Welm, Richard M. Myers, and Katherine E. Varley. 2020. "STAT3 and GR Cooperate to Drive Gene Expression and Growth of Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer." *Cancer Research* 80(20):4355–70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1379.
15. Darnell, James E. 1997. "STATs and Gene Regulation." *Science (New York, N.Y.)* 277(5332):1630–35. doi: 10.1126/SCIENCE.277.5332.1630.
16. Della Starza, Irene, Lucia Anna De Novi, Alessandra Santoro, Salemi Domenico, Marzia Cavalli, Roberta Soscia, Francesca Paoloni, Lucia Menale, Valerio Apicella, Caterina Ilari, Antonella Vitale, Marco Vignetti, Renato Bassan, Sabina Chiaretti, Anna Guarini, and Robin Foà. 2018. "Comparative Analysis between RQ-PCR, Digital-Droplet-PCR and Next-Generation-Sequencing (NGS) of Immunoglobulin/T-Cell Receptor Gene Rearrangements to Monitor Minimal Residual Disease in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Patients." *Blood* 132(Supplement 1):2828. doi: 10.1182/blood-2018-99-118219.
17. Dwivedi, Shailendra, Purvi Purohit, Radhieka Misra, Malavika Lingeswaran, Jeewan Ram Vishnoi, Puneet Pareek, Sanjeev Misra, and Praveen Sharma. 2019. "Single Cell Omics of Breast Cancer: An Update on Characterization and Diagnosis." *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 34(1):3–18. doi: 10.1007/s12291-019-0811-0.
18. Eliyatkin, Nuket, Evrim Yalçın, Baha Zengel, Safiye Aktaş, and Enver Vardar. 2015. "Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way." *The Journal of Breast Health* 11(2):59–66. doi: 10.5152/tjbh.2015.1669.
19. Ellis, P. A., I. E. Smith, S. Detre, S. A. Burton, J. Salter, R. A'Hern, G. Walsh, S. R. D. Johnston, and M. Dowsett. 1998. "Reduced Apoptosis and Proliferation and Increased Bcl-2 in Residual Breast Cancer Following Preoperative Chemotherapy." *Breast Cancer Research and Treatment* 48(2):107–16. doi: 10.1023/A:1005933815809.
20. Elnaggar, Ghada Nabil, Niveen M. El-Hifnawi, Abeer Ismail, Maha Yahia, and Reham A. A. Elshimy. 2021. "Micro RNA-148a Targets Bcl-2 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 22(6):1949–55. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.6.1949.
21. Feeley, Linda P., Anna M. Mulligan, Dushanthi Pinnaduwege, Shelley B. Bull, and Irene L. Andrulis. 2014. "Distinguishing Luminal Breast Cancer Subtypes by Ki67, Progesterone Receptor or TP53 Status Provides Prognostic Information." *Modern Pathology* 27(4):554–61. doi: 10.1038/modpathol.2013.153.

22. Fraga, Dean, Tea Meulia, and Steven Fenster. 2014. "Current Protocols Essential Laboratory Techniques." P. 10.3.1-10.3.40 in *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Vol. 8.
23. Gil, Kellen, Jamie Borg, Anagha Inguva Sheth, Rosana Pereira, Jeremy Rahkola, and Maria L. Amaya. 2023. "Mitochondrial STAT3 Plays a Critical Role in Survival of AML Cells." *Blood* 142(Supplement 1):4170. doi: 10.1182/blood-2023-179453.
24. Gonzalez-Angulo, Ana M., Jaime Ferrer-Lozano, Katherine Stemke-Hale, Aysegul Sahin, Shuying Liu, Juan A. Barrera, Octavio Burgues, Ana M. Lluch, Huiqin Chen, Gabriel N. Hortobagyi, Gordon B. Mills, and Funda Meric-Bernstam. 2011. "PI3K Pathway Mutations and PTEN Levels in Primary and Metastatic Breast Cancer." *Molecular Cancer Therapeutics* 10(6):1093–1101. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1089.
25. Gutierrez Erlandsson, Sylvia, Pedro Herrero-Vidal, Marcos Fernandez-Alfara, Susana Hernandez-Garcia, Sandra Gonzalo-Flores, Alberto Mudarra-Rubio, Manuel Fresno, and Beatriz Cubelos. 2013. "R-RAS2 Overexpression in Tumors of the Human Central Nervous System." *Molecular Cancer* 12:127. doi: 10.1186/1476-4598-12-127.
26. Han, Xiao, Junyun Wang, and Yingli Sun. 2017. "Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection." *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 15(2):59–72. doi: 10.1016/j.gpb.2016.12.004.
27. Ho, Gwo Yaw, Natasha Woodward, and Jermaine I. G. Coward. 2016. "Cisplatin versus Carboplatin: Comparative Review of Therapeutic Management in Solid Malignancies." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 102:37–46. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.03.014.
28. Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand. 1991. "Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'----3' Exonuclease Activity of *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(16):7276–80.
29. Hon, Jane Date C., Baljit Singh, Aysegul Sahin, Gang Du, Jinhua Wang, Vincent Y. Wang, Fang-Ming Deng, David Y. Zhang, Marie E. Monaco, and Peng Lee. 2016. "Breast Cancer Molecular Subtypes: From TNBC to QNBC." *American Journal of Cancer Research* 6(9):1864–72.
30. Inao, Touko, Yuichi Iida, Tamami Moritani, Tamio Okimoto, Ryosuke Tanino, Hitoshi Kotani, and Mamoru Harada. 2018. "Bcl-2 Inhibition Sensitizes Triple-Negative Human Breast Cancer Cells to Doxorubicin." *Oncotarget* 9(39):25545–56. doi: 10.18632/oncotarget.25370.
31. Isken, Olaf, Yoon Ki Kim, Nao Hosoda, Greg L. Mayeur, John W. B. Hershey, and Lynne E. Maquat. 2008. "Upf1 Phosphorylation Triggers Translational Repression during Nonsense-Mediated mRNA Decay." *Cell* 133(2):314–27. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.030.

32. Jain, Mukesh. 2012. "Next-Generation Sequencing Technologies for Gene Expression Profiling in Plants." *Briefings in Functional Genomics* 11(1):63–70. doi: 10.1093/bfpg/elr038.
33. Kim, Charissa, Ruli Gao, Emi Sei, Rachel Brandt, Johan Hartman, Thomas Hatschek, Nicola Crosetto, Theodoros Foukakis, and Nicholas E. Navin. 2018. "Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing." *Cell* 173(4):879-893.e13. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.041.
34. Kuang, Jujiao, Xu Yan, Amanda J. Genders, Cesare Granata, and David J. Bishop. 2018. "An Overview of Technical Considerations When Using Quantitative Real-Time PCR Analysis of Gene Expression in Human Exercise Research." *PLoS ONE* 13(5):e0196438. doi: 10.1371/journal.pone.0196438.
35. Kulesza, Dorota W., Kavita Ramji, Marta Maleszewska, Jakub Mieczkowski, Michal Dabrowski, Salem Chouaib, and Bozena Kaminska. 2019. "Search for Novel STAT3-Dependent Genes Reveals SERPINA3 as a New STAT3 Target That Regulates Invasion of Human Melanoma Cells." *Laboratory Investigation* 2019 99:11 99(11):1607–21. doi: 10.1038/s41374-019-0288-8.
36. Lalonde, Laura F., Julissa Reyes, and Alvin A. Gajadhar. 2013. "Application of a qPCR Assay with Melting Curve Analysis for Detection and Differentiation of Protozoan Oocysts in Human Fecal Samples from Dominican Republic." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 89(5):892–98. doi: 10.4269/ajtmh.13-0106.
37. Larive, Romain M., Giulia Moriggi, Mauricio Menacho-Márquez, Marta Cañamero, Enrique de Álava, Balbino Alarcón, Mercedes Dosil, and Xosé R. Bustelo. 2014. "Contribution of the R-Ras2 GTP-Binding Protein to Primary Breast Tumorigenesis and Late-Stage Metastatic Disease." *Nature Communications* 5(1):3881. doi: 10.1038/ncomms4881.
38. Lehmann, Brian D., Joshua A. Bauer, Xi Chen, Melinda E. Sanders, A. Bapsi Chakravarthy, Yu Shyr, and Jennifer A. Pietenpol. 2011. "Identification of Human Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies." *The Journal of Clinical Investigation* 121(7):2750–67. doi: 10.1172/JCI45014.
39. Lehmann, Brian D., and Jennifer A. Pietenpol. 2015. "Clinical Implications of Molecular Heterogeneity in Triple Negative Breast Cancer." *Breast (Edinburgh, Scotland)* 24 Suppl 2(0 2):S36-40. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.009.
40. Leong, Chee-Onn, Nick Vidnovic, Maurice Phillip DeYoung, Dennis Sgroi, and Leif W. Ellisen. 2007. "The P63/P73 Network Mediates Chemosensitivity to Cisplatin in a Biologically Defined Subset of Primary Breast Cancers." *The Journal of Clinical Investigation* 117(5):1370–80. doi: 10.1172/JCI30866.
41. Li, Huizi, Changwen Jing, Jianzhong Wu, Jie Ni, Huanhuan Sha, Xiaoyue Xu, Yuanyuan Du, Rui Lou, Shuchen Dong, and Jifeng Feng. 2019a. "Circulating Tumor DNA Detection: A Potential Tool for Colorectal Cancer Management." *Oncology Letters* 17(2):1409–16. doi: 10.3892/ol.2018.9794.

42. Li, Huizi, Changwen Jing, Jianzhong Wu, Jie Ni, Huanhuan Sha, Xiaoyue Xu, Yuanyuan Du, Rui Lou, Shuchen Dong, and Jifeng Feng. 2019b. "Circulating Tumor DNA Detection: A Potential Tool for Colorectal Cancer Management (Review)." *Oncology Letters* 17(2):1409–16. doi: 10.3892/ol.2018.9794.
43. Li, Xiao-shan, Qing Xu, Xiang-yang Fu, and Wei-sheng Luo. 2014. "ALDH1A1 Overexpression Is Associated with the Progression and Prognosis in Gastric Cancer." *BMC Cancer* 14(1):705. doi: 10.1186/1471-2407-14-705.
44. Liu, Rong-Zong, The M. Vo, Saket Jain, Won-Shik Choi, Elizabeth Garcia, Elizabeth A. Monckton, John R. Mackey, and Roseline Godbout. 2019. "NFIB Promotes Cell Survival by Directly Suppressing P21 Transcription in TP53-Mutated Triple-Negative Breast Cancer." *The Journal of Pathology* 247(2):186–98. doi: 10.1002/path.5182.
45. Liu, Yan, Michelle Baglia, Ying Zheng, William Blot, Ping-Ping Bao, Hui Cai, Sarah Nechuta, Wei Zheng, Qiuyin Cai, and Xiao Ou Shu. 2015. "ALDH1A1 mRNA Expression in Association with Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer." *Oncotarget* 6(38):41360–69.
46. Ma, Jia Hui, Li Qin, and Xia Li. 2020. "Role of STAT3 Signaling Pathway in Breast Cancer." *Cell Communication and Signaling* 18(1):1–13. doi: 10.1186/S12964-020-0527-Z/FIGURES/5.
47. Maji, Santanu, Sanjay Panda, Sabindra K. Samal, Omprakash Shriwas, Rachna Rath, Maurizio Pellecchia, Luni Emdad, Swadesh K. Das, Paul B. Fisher, and Rupesh Dash. 2018. "Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer." *Advances in Cancer Research* 137:37–75. doi: 10.1016/bs.acr.2017.11.001.
48. Majidpoor, Jamal, and Keywan Mortezaee. 2021. "The Efficacy of PD-1/PD-L1 Blockade in Cold Cancers and Future Perspectives." *Clinical Immunology* 226:108707. doi: 10.1016/j.clim.2021.108707.
49. Marmiroli, Nelson, and Elena Maestri. 2007. "Chapter 6 - Polymerase Chain Reaction (PCR)." Pp. 147–87 in *Food Toxicants Analysis*, edited by Y. Picó. Amsterdam: Elsevier.
50. Mithraprabhu, Sridurga, Maoshan Chen, Ioanna Savvidou, Antonia Reale, and Andrew Spencer. 2021. "Liquid Biopsy: An Evolving Paradigm for the Biological Characterisation of Plasma Cell Disorders." *Leukemia* 35(10):2771–83. doi: 10.1038/s41375-021-01339-6.
51. Mittendorf, Elizabeth A., Anne V. Philips, Funda Meric-Bernstam, Na Qiao, Yun Wu, Susan Harrington, Xiaoping Su, Ying Wang, Ana M. Gonzalez-Angulo, Argun Akcakanat, Akhil Chawla, Michael Curran, Patrick Hwu, Padmanee Sharma, Jennifer K. Litton, Jeffrey J. Molldrem, and Gheath Alatrash. 2014. "PD-L1 Expression in Triple Negative Breast Cancer." *Cancer Immunology Research* 2(4):361–70. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0127.
52. Nedeljković, Milica, and Ana Damjanović. 2019. "Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge." *Cells* 8(9):957. doi: 10.3390/cells8090957.

53. Newton, Emma E., Lauren E. Mueller, Scout M. Treadwell, Cindy A. Morris, and Heather L. Machado. 2022. "Molecular Targets of Triple-Negative Breast Cancer: Where Do We Stand?" *Cancers* 14(3):482. doi: 10.3390/cancers14030482.
54. Nogueira, Gonçalo, Rafael Fernandes, Juan García-Moreno, and Luísa Romão. 2021. "Nonsense-Mediated RNA Decay and Its Bipolar Function in Cancer." *Molecular Cancer* 20. doi: 10.1186/s12943-021-01364-0.
55. Olsson, Niclas, Petter Carlsson, Peter James, Karin Hansson, Sofia Waldemarson, Per Malmström, Mårten Fernö, Lisa Ryden, Christer Wingren, and Carl A. K. Borrebaeck. 2013. "Grading Breast Cancer Tissues Using Molecular Portraits *." *Molecular & Cellular Proteomics* 12(12):3612–23. doi: 10.1074/mcp.M113.030379.
56. O'Reilly, Elma A., Luke Gubbins, Shiva Sharma, Riona Tully, Matthew Ho Zhing Guang, Karolina Weiner-Gorzel, John McCaffrey, Michele Harrison, Fiona Furlong, Malcolm Kell, and Amanda McCann. 2015. "The Fate of Chemoresistance in Triple Negative Breast Cancer (TNBC)." *BBA Clinical* 3:257–75. doi: 10.1016/j.bbacli.2015.03.003.
57. Overbergh, L., A. Giulietti, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon, and C. Mathieu. 2003. "The Use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the Quantification of Cytokine Gene Expression." *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* 14(1):33–43.
58. Parmar, Nitika, and Fuyuhiko Tamanoi. 2010. "Chapter 3 - Rheb G-Proteins and the Activation of mTORC1." Pp. 39–56 in *The Enzymes*. Vol. 27, *The Enzymes*. Academic Press.
59. Parmigiani, Giovanni, Elizabeth S. Garrett, Rafael A. Irizarry, and Scott L. Zeger. 2003. "The Analysis of Gene Expression Data: An Overview of Methods and Software." Pp. 1–45 in *The Analysis of Gene Expression Data: Methods and Software, Statistics for Biology and Health*, edited by G. Parmigiani, E. S. Garrett, R. A. Irizarry, and S. L. Zeger. New York, NY: Springer.
60. Pawlicka, Kamila, Umesh Kalathiya, and Javier Alfaro. 2020. "Nonsense-Mediated mRNA Decay: Pathologies and the Potential for Novel Therapeutics." *Cancers* 12(3):765. doi: 10.3390/cancers12030765.
61. Pereira-Gómez, Marianoel, Álvaro Fajardo, Natalia Echeverría, Fernando López-Tort, Paula Perbolianachis, Alicia Costábile, Fabián Aldunate, Pilar Moreno, and Gonzalo Moratorio. 2021. "Evaluation of SYBR Green Real Time PCR for Detecting SARS-CoV-2 from Clinical Samples." *Journal of Virological Methods* 289:114035. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114035.
62. Poturnajova, M., Z. Kozovska, and M. Matuskova. 2021. "Aldehyde Dehydrogenase 1A1 and 1A3 Isoforms – Mechanism of Activation and Regulation in Cancer." *Cellular Signalling* 87:110120. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110120.
63. Qin, Jiang Jiang, Li Yan, Jia Zhang, and Wei Dong Zhang. 2019. "STAT3 as a Potential Therapeutic Target in Triple Negative Breast Cancer: A Systematic Review." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2019 38:1 38(1):1–16. doi: 10.1186/S13046-019-1206-Z.

64. Qin, Jiang-Jiang, Li Yan, Jia Zhang, and Wei-Dong Zhang. 2019. "STAT3 as a Potential Therapeutic Target in Triple Negative Breast Cancer: A Systematic Review." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 38(1):195. doi: 10.1186/s13046-019-1206-z.
65. Ramos, Alisha, Samira Sadeghi, and Hossein Tabatabaeian. 2021. "Battling Chemoresistance in Cancer: Root Causes and Strategies to Uproot Them." *International Journal of Molecular Sciences* 22(17):9451. doi: 10.3390/ijms22179451.
66. Reuther, G. W., and C. J. Der. 2000. "The Ras Branch of Small GTPases: Ras Family Members Don't Fall Far from the Tree." *Current Opinion in Cell Biology* 12(2):157–65. doi: 10.1016/s0955-0674(99)00071-x.
67. Rezvani, Katayoun, and John Barrett. 2014. "STAT3: The 'Achilles' Heel for AML?" *Blood* 123(1):1–2. doi: 10.1182/blood-2013-11-537092.
68. Rokavec, Matjaz, Werner Schroth, Sandra M. C. Amaral, Peter Fritz, Lydia Antoniadou, Damjan Glavac, Wolfgang Simon, Matthias Schwab, Michel Eichelbaum, and Hiltrud Brauch. 2008. "A Polymorphism in the TC21 Promoter Associates with an Unfavorable Tamoxifen Treatment Outcome in Breast Cancer." *Cancer Research* 68(23):9799–9808. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0247.
69. Schmittgen, Thomas D., and Kenneth J. Livak. 2008. "Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method." *Nature Protocols* 3(6):1101–8. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
70. Shao, Yingbo, Xianfu Sun, Yaning He, Chaojun Liu, and Hui Liu. 2015. "Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer." *PLOS ONE* 10(7):e0133830. doi: 10.1371/journal.pone.0133830.
71. Sharma, Rinu, Neetu Sud, Tushar Kant Chattopadhyay, and Ranju Ralhan. 2005. "TC21/R-Ras2 Upregulation in Esophageal Tumorigenesis: Potential Diagnostic Implications." *Oncology* 69(1):10–18. doi: 10.1159/000087283.
72. Singh, Desh Deepak, and Dharmendra Kumar Yadav. 2021. "TNBC: Potential Targeting of Multiple Receptors for a Therapeutic Breakthrough, Nanomedicine, and Immunotherapy." *Biomedicines* 9(8):876. doi: 10.3390/biomedicines9080876.
73. Sirkisoon, Sherona R., Richard L. Carpenter, Tadas Rimkus, Ashley Anderson, Alexandria Harrison, Allison M. Lange, Guangxu Jin, Kounosuke Watabe, and Hui-Wen Lo. 2018. "Interaction between STAT3 and GLI1/tGLI1 Oncogenic Transcription Factors Promotes the Aggressiveness of Triple-Negative Breast Cancers and HER2-Enriched Breast Cancer." *Oncogene* 37(19):2502–14. doi: 10.1038/s41388-018-0132-4.
74. Slonim, Donna K., and Itai Yanai. 2009. "Getting Started in Gene Expression Microarray Analysis." *PLoS Computational Biology* 5(10):e1000543. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000543.

75. Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, and Freddie Bray. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71(3):209–49. doi: 10.3322/caac.21660.
76. Tajadini, Mohamadhasan, Mojtaba Panjehpour, and Shaghayegh Haghjooy Javanmard. 2014. "Comparison of SYBR Green and TaqMan Methods in Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Four Adenosine Receptor Subtypes." *Advanced Biomedical Research* 3:85. doi: 10.4103/2277-9175.127998.
77. Tolomeo, Manlio, and Antonio Cascio. 2021. "The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy." *International Journal of Molecular Sciences* 22(2):1–25. doi: 10.3390/IJMS22020603.
78. Tzifi, Flora, Christina Economopoulou, Dimitrios Gourgiotis, Alexandros Ardavanis, Sotirios Papageorgiou, and Andreas Scorilas. 2011. "The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias." *Advances in Hematology* 2012:e524308. doi: 10.1155/2012/524308.
79. Ulukaya, Engin, Didem Karakas, and Konstantinos Dimas. 2021. "Tumor Chemosensitivity Assays Are Helpful for Personalized Cytotoxic Treatments in Cancer Patients." *Medicina* 57(6):636. doi: 10.3390/medicina57060636.
80. Valencia, Guillermo Arturo, Patricia Rioja, Zaida Morante, Rossana Ruiz, Hugo Fuentes, Carlos A. Castaneda, Tatiana Vidaurre, Silvia Neciosup, and Henry L. Gomez. 2022. "Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer: A Literature Review and New Advances." *World Journal of Clinical Oncology* 13(3):219–36. doi: 10.5306/wjco.v13.i3.219.
81. Wang, Meng-Yuan, Man Huang, Chao-Yi Wang, Xiao-Ying Tang, Jian-Gen Wang, Yong-De Yang, Xin Xiong, and Chao-Wei Gao. 2021. "Transcriptome Analysis Reveals MFG8-HAPLN3 Fusion as a Novel Biomarker in Triple-Negative Breast Cancer." *Frontiers in Oncology* 11. doi: 10.3389/fonc.2021.682021.
82. Wang, Yongqiang, Qi Li, Xiaochen Yang, Weidong Zhang, Runpeng Zhou, Zhenjin Su, Hengtong Wan, and Xinyu Hong. 2022. *LncRNA SNHG1 Facilitates the Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasiveness in Glioblastoma Multiforme via Regulation of the miR-128- 3p/RRAS2 Axis. preprint.* In Review. doi: 10.21203/rs.3.rs-1562267/v1.
83. Wei, Yaolu, Yan Li, Yenan Chen, Pei Liu, Sheng Huang, Yuping Zhang, Yanling Sun, Zhe Wu, Meichun Hu, Qian Wu, Hongnian Wu, Fuxing Liu, Tonghui She, and Zhifeng Ning. 2022. "ALDH1: A Potential Therapeutic Target for Cancer Stem Cells in Solid Tumors." *Frontiers in Oncology* 12. doi: 10.3389/fonc.2022.1026278.
84. Westaby, Daniel, Juan M. Jiménez-Vacas, Ines Figueiredo, Jan Rekowski, Claire Pettinger, Bora Gurel, Arian Lundberg, Denisa Bogdan, Lorenzo Buroni, Antje Neeb, Ana Padilha, Joe Taylor, Wanting Zeng, Souvik Das, Emily Hobern, Ruth Riisnaes, Mateus Crespo, Susana Miranda, Ana Ferreira, Brian P. Hanratty, Daniel Nava Rodrigues, Claudia Bertan, George Seed, Maria de Los Dolores Fenor de La Maza,

Christina Guo, Juliet Carmichael, Rafael Grochot, Khobe Chandran, Anastasia Stavridi, Andreas Varkaris, Nataly Stylianou, Brett G. Hollier, Nina Tunariu, Steven P. Balk, Suzanne Carreira, Wei Yuan, Peter S. Nelson, Eva Corey, Michael Haffner, Johann de Bono, and Adam Sharp. 2024. “BCL2 Expression Is Enriched in Advanced Prostate Cancer with Features of Lineage Plasticity.” *The Journal of Clinical Investigation* 134(18). doi: 10.1172/JCI1179998.

85. Wu, Chuanqing, Xiaojie Zhu, Weizhen Liu, Tuo Ruan, Wenzhe Wan, and Kaixiong Tao. 2018. “NFIB Promotes Cell Growth, Aggressiveness, Metastasis and EMT of Gastric Cancer through the Akt/Stat3 Signaling Pathway.” *Oncology Reports* 40(3):1565–73. doi: 10.3892/or.2018.6574.
86. Yang, D., Chen, M.-B., Wang, L.-Q., Yang, L., Liu, C.-Y., & Lu, P.-H. (2013). Bcl-2 expression predicts sensitivity to chemotherapy in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 32(1), 105. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-105>
87. Yang, Ping Lian, Lu Xin Liu, En Min Li, and Li Yan Xu. 2020. “STAT3, the Challenge for Chemotherapeutic and Radiotherapeutic Efficacy.” *Cancers* 12(9):1–31. doi: 10.3390/CANCERS12092459.
88. Yip, K. W., and J. C. Reed. 2008. “Bcl-2 Family Proteins and Cancer.” *Oncogene* 27(50):6398–6406. doi: 10.1038/onc.2008.307.
89. Yue, Hanxun, Zenan Hu, Rui Hu, Zeying Guo, Ya Zheng, Yuping Wang, and Yongning Zhou. 2022. “ALDH1A1 in Cancers: Bidirectional Function, Drug Resistance, and Regulatory Mechanism.” *Frontiers in Oncology* 12:918778. doi: 10.3389/fonc.2022.918778.
90. Zhu, Haiying, Chengyong Du, Meng Yuan, Peifen Fu, Qiaojun He, Bo Yang, and Ji Cao. 2020. “PD-1/PD-L1 Counterattack Alliance: Multiple Strategies for Treating Triple-Negative Breast Cancer.” *Drug Discovery Today* 25(9):1762–71. doi: 10.1016/j.drudis.2020.07.006.
91. Zubair, M., S. Wang, and N. Ali. 2021. “Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis.” *Frontiers in Pharmacology* 11.