https://doi.org/10.15388/vu.thesis.896
https://orcid.org/0000-0003-3536-4384

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Ieva Vaicekauskaitė

Naujų biožymenų paieška onkoginekologinių ligų diagnostikai ir eigos prognozei

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2026

Disertacija rengta 2021–2025 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute ir Nacionalinio vėžio instituto Genetinės diagnostikos laboratorijoje. Mokslinius tyrimus rėmė Nacionalinis vėžio institutas ir Vilniaus universitetas.

Moksliniai vadovai:
doc. dr. Rasa Sabaliauskaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010). Nuo 2022-12-01 iki 2025-09-30;
prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010). Nuo 2021-10-01 iki 2022-11-30.
Moksliniai konsultai:
prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010). Nuo 2022-12-01 iki 2025-09-30;
doc. dr. Rasa Sabaliauskaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010. Nuo 2021-10-01 iki 2022-11-30.

Gynimo taryba:
Pirmininkė – prof. dr. Daiva Baltriukienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).
Nariai:
dr. Edvardas Bagdonas (Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biologija, N 010),
dr. Veronika Borutinskaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004),
dr. Pol Solé-Navais (Geteborgo universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010),
prof. dr. Rasa Ugenskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina, M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. kovo mėn. 20 d. 13 val. Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 223 4377; el. paštas info@gmc.vu.lt

https://doi.org/10.15388/vu.thesis.896
https://orcid.org/0000-0003-3536-4384

VILNIUS UNIVERSITY

Ieva Vaicekauskaitė

Search of New Biomarkers for Oncogynecologic Disease Diagnosis and Prognosis

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2026

The dissertation was prepared between 2021 and 2025 at the Vilnius University Life Sciences Center, Institute of Biosciences and the National Cancer Institute, Laboratory of Genetic Diagnostic. The research was supported by National Cancer Institute and Vilnius University.

Academic Supervisors:
Doc. Dr. Rasa Sabaliauskaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010). From 2022-12-01 to 2025-09-30;
Prof. Habil. Dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010). From 2021-10-01 to 2022-11-30.
Academic Consultants:
Prof. Habil. Dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010). From 2022-12-01 to 2025-09-30;
Associate Prof. Dr. Rasa Sabaliauskaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010). From 2021-10-01 to 2022-11-30.

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Daiva Baltriukienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).
Members:
Dr. Edvardas Bagdonas (Centre for Innovative medicine, Natural Sciences, Biology, N 010),
Dr. Veronika Borutinskaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004),
Dr. Pol Solé-Navais (University of Gothenburg, Natural Sciences, Biology, N 010),
Prof. Dr. Rasa Ugenskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medicine and Health Sciences, Medicine, M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 1 pm on March 20th in Room R401 of the Life sciences center, Vilnius University. Adress: Sauletekio ave. 7, Vilnius, Lithuania, Phone: +370 5 223 4377; E-mail: info@gmc.vu.lt

TURINYS

SANTRUMPOS 8
ĮVADAS 9
MOKSLINIS NAUJUMAS 11
GINAMIEJI TEIGINIAI 12
1. LITERATŪROS APŽVALGA 13
1.1 Kiaušidžių navikų patogenezė ir histologiniai tipai 13
1.2 Kiaušidžių vėžio epidemiologija ir rizikos veiksniai 16
1.3 Kiaušidžių vėžio diagnostika 19
1.4 Klinikinėje praktikoje taikomi kiaušidžių vėžio biožymenys 20
1.5 Kiaušidžių vėžio prognostiniai veiksniai 21
1.6 Kiaušidžių vėžio gydymas 22
1.7 Su kiaušidžių vėžiu susiję genetiniai pakitimai 23
1.7.1 Notch ir Wnt signalinių kelių genų raiška kiaušidžių vėžio atvejais 23
1.7.2 *ARID1A* geno pakitimai kiaušidžių navikuose 25
1.8 Su kiaušidžių vėžiu susiję epigenetiniai mechanizmai 26
1.8.1 HOX šeimos genų promotorių metilinimas 28
1.9 Vėžio genomo atlaso projekto kiaušidžių vėžio molekuliniai tyrimai 29
1.9.1 Potencialių vėžio biožymenų atrinkimo metodai ir kiaušidžių vėžio prognostiniai modeliai 30
2. MEDŽIAGOS IR METODAI 34
2.1 Tiriamoji grupė ir jos klinikiniai ir demografiniai rodikliai 37
2.2 Nukleorūgščių gryninimas 39
2.3 Genų sekų pakitimų tyrimas 40
2.4 Genų raiškos profilio tyrimas 40
2.5 Genų promotorių metilinimo statuso tyrimas 42
2.6 Vėžio genomo atlaso ir Genotipo – audinio raiškos projektų kiaušidžių audinių duomenų analizė 44
2.7 Statistinė analizė 48
3. REZULTATAI 50

3.1 Su Notch, Wnt ir chromatino remodeliacija susijusių genų raiškos bei genų sekų, *ARID1A* ir HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso tyrimas kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose 50

3.1.1 Su Notch, Wnt ir chromatino remodeliacija susijusių genų raiškos analizė kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose..... 50

3.1.2 *ARID1A*, *HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* genų promotorių metilinimo statuso tyrimas kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose 54

3.1.3 Genų mutacijų, raiškos ir *ARID1A* promotoriaus metilinimo statuso palyginimas 58

3.1.4 Su Notch, Wnt ir chromatino remodeliacija susijusių genų raiškos ir *ARID1A* bei HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso diagnostinio potencialo įvertinimas 61

3.1.5 Su Notch, Wnt ir chromatino remodeliacija susijusių genų raiškos ir *ARID1A* bei HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso kombinacijų diagnostinio potencialo įvertinimas..... 63

3.1.6 Su Notch, Wnt ir chromatino remodeliacija susijusių genų raiškos ir *ARID1A* bei HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso kombinacijų prognostinio potencialo įvertinimas 67

3.2 10–ties su įvairiomis vėžio funkcijomis susijusių genų raiškos tyrimas kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose statistiniais ir eksperimentiniais metodais 73

3.2.1 Genų raiškos žymenų parinkimas taikant statistinius metodus 73

3.2.2 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų tyrimas kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose 78

3.2.3 10–ties genų raiškos biožymenų diagnostinio potencialo įvertinimas 83

3.2.4 10–ties genų raiškos biožymenų kombinacijų diagnostinio potencialo įvertinimas..... 85

3.2.5 10–ties genų raiškos biožymenų kombinacijų prognostinio potencialo įvertinimas..... 86

4. REZULTATŲ APTARIMAS..... 90

4.1 Notch ir Wnt signalinių kelių genų raiškos ir mutacijų palyginimas su kitais tyrimais 90

4.2 Geno *ARID1A* raiškos ir mutacijų bei promotoriaus metilinimo palyginimas su kitais tyrimais 92

4.3 HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso palyginimas su kitais tyrimais..... 94

4.4 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų palyginimas su kitais tyrimais 96

4.5 Biožymenų kombinacijų palyginimas su kitais tyrimais 99
IŠVADOS 103
LITERATŪROS SĄRAŠAS 104
PRIEDAI 118
SUMMARY 140
AUTORĖS INDĖLIS 181
PADĖKA 182
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS 183
KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS 185
TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĘ 189
Užrašams 191

SANTRUMPOS

5hmC – 5–hidroksi–metil–citozinas
AT–kPGR – atvirkštinės transkriptazės – kiekybinė polimerazės grandininė reakcija
AUC – plotas po kreive (angl. *area under the curve*)
CA125 – karbohidrato antigenas 125 (angl. *Carbohydrate Antigen 125*)
EMT – epitelinė–mezenchiminė tranzicija
FIGO – Tarptautinė ginekologijos ir akušerijos federacija (angl. *International federation of gynecology and obstetrics*)
GTEx – Genotipo–audinio raiškos portalas (angl. *genotype–tissue expression portal* – GTEx)
HE4 – žmogaus antsėklidžio baltymas 4 (angl. *Human Epididymis Protein 4*)
HGSOC – aukšto piktybiškumo laipsnio serozinė kiaušidžių karcinoma (angl. *high–grade serous ovarian carcinoma*)
KV – kiaušidžių vėžys
LGSOC – žemo piktybiškumo laipsnio serozinė kiaušidžių karcinoma (angl. *low–grade serous ovarian carcinoma*)
MSP – metilinimui specifinė PGR reakcija (angl. *methylation specific PCR*).
NKS – naujos kartos sekoskaita
PFS – išgyvenamumas iki ligos atkryčio (angl. *progression–free survival*)
PI – pasikliautinàsis intervalas (angl. *confidence interval* – CI)
PR – pavojaus rizika (angl. *hazard ratio* – HR)
ROC – grafiko kreivė, parodanti jautrumo ir specifiškumo ryšį (angl. *received operating characteristic*)
SR – santykinė rizika (angl. *risk ratio* – RR)
STIC – serozinė tubulinė intraepitelinė karcinoma
ŠS – šansų santykis (angl. *odds ratio* – OR)
TCGA – vėžio genomo atlasas (angl. *The Cancer Genome Atlas* – TCGA)

Pastaba. Tarptautiniai visuotinai priimtų terminų trumpiniai į lietuvių kalbą nebuvo verčiami.

ĮVADAS

Kiaušidžių vėžys (KV) yra aštunta dažniausia ir daugiausiai mirčių sukelianti onkoginekologinė liga Lietuvoje ir pasaulyje (Allemani *et al*., 2018). KV yra labai heterogeniška liga: pagal klinikinius, molekulinius ir histologinius požymius yra išskiriami epiteliniai navikai (sudarantys apie 90 % KV atvejų) bei germinalinių ląstelių ir lytinės drūžės – stromos ląstelių KV. Epiteliniai navikai toliau yra skirstomi į I ir II tipo navikus. I tipo navikams priskiriami įvairių histologijų (endometrioidiniai, šviesių ląstelių, muciniai ir kiti) navikai, kurie dažniausiai pasižymi geru išgyvenamumu (5 metų išgyvenamumas 47–90 %). II tipo navikams priskiriami aukšto piktybiškumo laipsnio seroziniai navikai (HGSOC, angl. *high−grade serous ovarian carcinoma*), pasižymintys prastu išgyvenamumu (5 metų išgyvenamumas 32–48 %) (Cabasag *et al*., 2023).

Šiuo metu vieninteliai klinikinėje praktikoje taikomi KV biožymenys yra serumo baltymų HE4 ir CA125 koncentracijos žymenys, tačiau jų jautrumas ir specifiškumas diagnozuojant KV yra ribotas (Colombo *et al*., 2019). KV sergančioms moterims nepasireiškia jokie specifiniai simptomai, todėl dažniausiai nustatoma pažengusi (III–IV stadijos) ligos forma, ypač II tipo KV atvejais, kurie pasižymi dideliu atsparumu chemoterapijai ir trumpu išgyvenamumu (Bell *et al*., 2011). Dėl šių priežasčių KV klinikinei praktikai yra reikalingi nauji biožymenys, kurie prisidėtų prie ankstyvos diagnostikos, ligos eigos prognozavimo ir gydymo individualizavimo.

Tyrimo metu buvo analizuojami potencialūs KV genų raiškos, genų mutacijų ir genų promotorių metilinimo biožymenys. Remiantis literatūros analize ir ankstesniais tyrimais (hipoteze paremtas žymenų pasirinkimas) buvo analizuojami genų *ARID1A*, *CTNNB1* ir *FBXW7* sekos pakitimai, KV kancerogenezei svarbių signalinių kelių Notch ir Wnt genų raiška (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *DLL1*, *JAG2*, *HES1*, *CTNNB1* ir *FBXW7*), I tipo KV atvejais dažniausiai mutavusio geno *ARID1A* raiška ir promotoriaus metilinimas bei homeodėžutės (HOX) šeimos genų *ALX4*, *CDX2* ir *HOPX* promotorių metilinimo statusas. Antrosios tyrimo dalies metu buvo atliekama vėžio genomo atlaso (angl. *The Cancer Genome Atlas* – TCGA) ir Genotipo–audinio raiškos portalo (angl. *Genotype–Tissue Expression Portal* – GTEx) kiaušidžių tranksriptominių duomenų analizė regresijos algoritmais (duomenimis paremtas žymenų pasirinkimas). Statistiniais metodais pasirinkti dešimt genų raiškos biožymenų (*EXO1*, *RAD50*, *PPT2*, *LUC7L2*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B*, *GRB7* ir *TCEAL4*) toliau analizuoti KV audinių imtyje. Viso šio darbo metu analizuoti 27 potencialūs KV biožymenys

ir jų kombinacijos, siekiant įvertinti jų diagnostinį ir prognostinį potencialą bei sąsajas su klinikiniais ir demografiniais rodikliais.

Tikslas: nustatyti potencialius diagnostinius ir prognostinius onkoginekologinių navikų genetinius žymenis.

Uždaviniai:

1. Pasirinkti perspektyvius onkoginekologinių ligų genetinius žymenis tolesniems tyrimams atliekant laisvos prieigos duomenų bazių ir literatūros analizę;
2. Ištirti atsirinktus žymenis kiaušidžių vėžiu sergančių moterų audiniuose;
3. Ištirti pasirinktų žymenų kombinacijų diagnostines ir prognostines savybes;
4. Susieti pasirinktus genetinius žymenis su pacienčių klinikiniais ir demografiniais rodikliais.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Šio tyrimo metu pirmą kartą Lietuvos KV pacienčių imtyje išsamiai tirti parsirinkti genų raiškos ir genų promotorių metilinimo statuso bei genų mutacijų biožymenys. Gauti rezultatai pagilino žinias apie kiaušidžių navikų signalinius kelius, genų raišką ir epigenetinę reguliaciją.

Pirmą kartą Lietuvoje gydomų kiaušidžių vėžio pacienčių imtyje atlikta SWI/SNF chromatino remodeliacijos geno *ARID1A* mutacijų, geno raiškos ir promotoriaus metilinimo statuso analizė KV atvejais.

Notch ir Wnt signalinių kelių genų raišką įvertinus KV audinių imtyje, pirmą kartą atlikta jų kombinacijos su genų promotorių metilinimo statuso biožymenimis analizė. Tokie kombinuotų biožymenų modeliai yra reti, kadangi reikalauja daug eksperimentinių duomenų.

Nors TCGA ir GTEx tranksriptominių duomenų analizė yra populiarus metodas potencialių prognostinių modelių parinkimui, tačiau pasirinktų žymenų patvirtinimas eksperimentiniais metodais retrospektyvinėje duomenų imtyje yra retas. Disertacijos metu statistiniais metodais paremtas biožymenų pasirinkimo metodas palygintas su hipotezėmis (literatūros analize) paremtu biožymenų pasirinkimu, taip ne tik patvirtinant jau žinomus potencialius KV biožymenis, bet ir randant naujus, iki šiol KV netyrinėtus, diagnostinius ir prognostinius genų raiškos biožymenis.

Tyrimo metu buvo pirmą kartą išsamiai išanalizuotas nekanoninių HOX šeimos genų *ALX4*, *CDX2* ir *HOPX* promotorių metilinimo statusas KV atveju, įvertinta jų diagnostinė vertė. Nors *ALX4* geno analizė iki šiol buvo atlikta TCGA duomenų imtyje (Duan *et al*., 2024), šių genų promotorių metilinimas tiriant metilinimui specifinės PGR reakcijos (MSP) metodu iki šiol nebuvo aprašytas KV audiniuose.

Tolesni tyrimai, didesnėje tiriamųjų imtyje ir skystosios biopsijos mėginiuose, yra būtini siekiant pritaikyti pasirinktus žymenis bei jų kombinacijas KV diagnostikai ir prognostikai. Gauti rezultatai yra daug žadantys ir tikėtina, jog paskatins KV diagnostikos pažangą kuriant naujus genetinius molekulinius KV testus, padėsiančius nustatyti KV navikus ankstyvoje stadijoje, įvertinti KV tipą, prognozuoti išgyvenamumą bei parinkti tinkamiausią gydymą.

GINAMIEJI TEIGINIAI

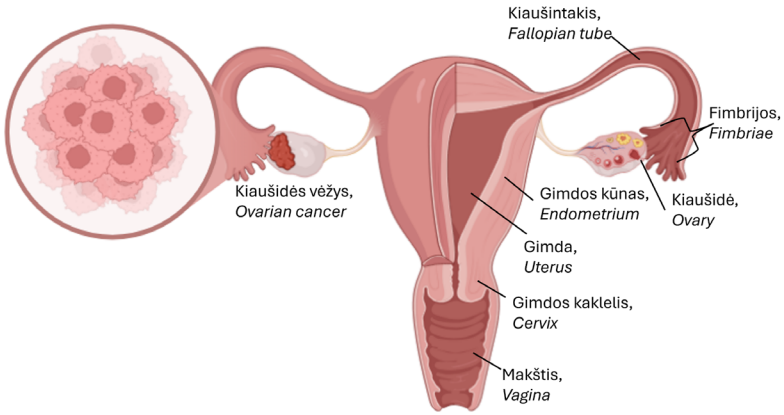
1. Notch receptorius koduojančių genų *DLL1*, *HES1*, *CTNNB1* ir *FBXW7* genų raiškos biožymenys turi didesnį diagnostinį potencialą nei *ARID1A* ir HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso biožymenys.
2. *ARID1A* geno raiška KV navikuose gali būti lemiama ne tik mutacijų, bet ir geno promotoriaus metilinimo.
3. *CTNNB1*, *GRB7* ir *TCEAL4* genų raiška yra potencialūs KV diagnostiniai, o *NOTCH3* ir *HES1* genų raiška – prognostiniai biožymenys.
4. Biožymenų kombinavimas padidina diagnostinę ir prognostinę KV testų modelių vertę.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Kiaušidžių navikų patogenezė ir histologiniai tipai

Kiaušidžių vėžys (KV) yra heterogeniška moterų piktybinių navikų grupė, sudaryta iš keleto skirtingų histologinių formų, besiskiriančių savo patogeneze, klinikine ligos eiga ir molekuliniais požymiais.

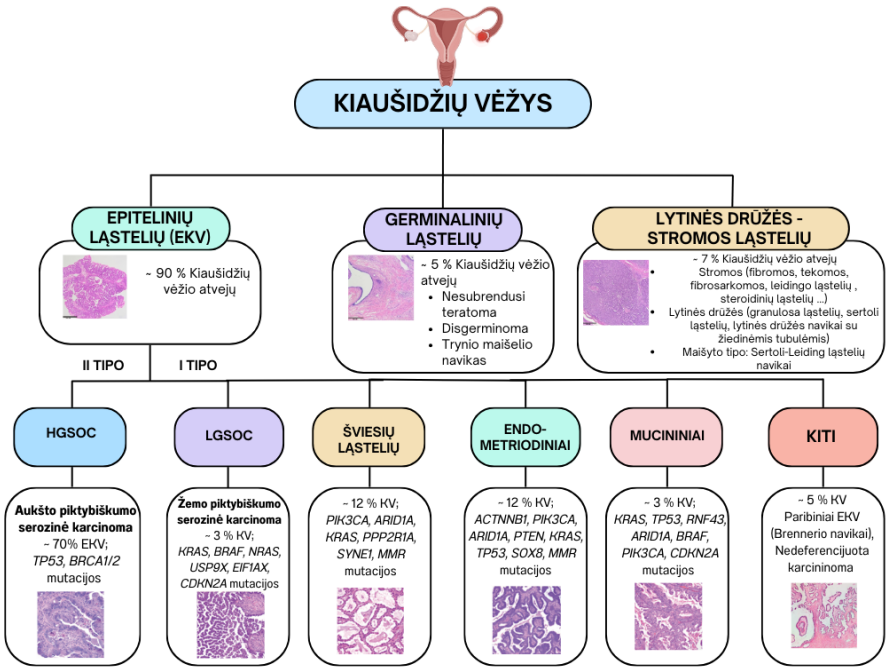
Kiaušidės yra vienas pagrindinių moterų lytinės sistemos organų (**Pav. 1.1**), sudarytų iš lytinių ląstelių (oocitų), stromos ir endokrininių ląstelių, produkuojančių hormonus estrogeną ir progesteroną, bei epitelinių ląstelių, apdengiančių kiaušidę ir joje esančias cistas. Kiaušidės dalyvauja moters reprodukciniame cikle kurio metu oocitas yra išlaisvinamas iš subrendusios folikulinės cistos kiaušidėje, per fimbrijas patenka į kiaušintakius ir yra apvaisinamas arba pašalinimas (Romero & Bast, 2012).



Pav. 1.1 Moters reprodukcinės sistemos organai ir jų pavadinimai (sukurta su *biorender.com*)

Iš kiekvieno kiaušidžių ląstelių tipo gali vystytis gerybiniai (sudarantys apie 64 % kiaušidžių navikų), paribiniai (*Brennerio* tipo – apie 5 % atvejų) arba piktybiniai kiaušidžių navikai (apie 30 % atvejų) (**Pav. 1.2**) (Gupta *et al*., 2019). Piktybiniai germinalinių ląstelių navikai sudaro iki 5 % KV atvejų, lytinės drūžės (granulosa ar sertoli ląstelių) – stromos ląstelių (*Leydig* tipo ląstelių) navikai iki 7 % KV (Aust *et al.,* 2020), o likę apie 90 % navikų – epiteliniai. Šie KV yra labai heterogeniški, todėl smulkiau skirstomi pagal histologinius tipus. Apie 70 % epitelinių KV sudaro aukšto piktybiškumo laipsnio serozinė kiaušidžių karcinoma (angl. *high–grade serous ovarian carcinoma* – HGSOC), apie 3 % – žemo piktybiškumo laipsnio serozinė

kiaušidžių karcinoma (angl. *low–grade serous ovarian carcinoma* – LGSOC), ~ 12 % – šviesių ląstelių, ~ 12 % – endometrioidiniai, ~ 3 % – mucininiai kiaušidžių navikai (Köbel & Kang, 2022). Nedidelė dalis mucininio tipo kiaušidžių navikų taip pat gali būti metastazės iš kitų lokalizacijų vėžio atvejų, dažniausiai virškinamojo trakto vėžio (skrandžio ar storosios žarnos) (Aust *et al*., 2020).

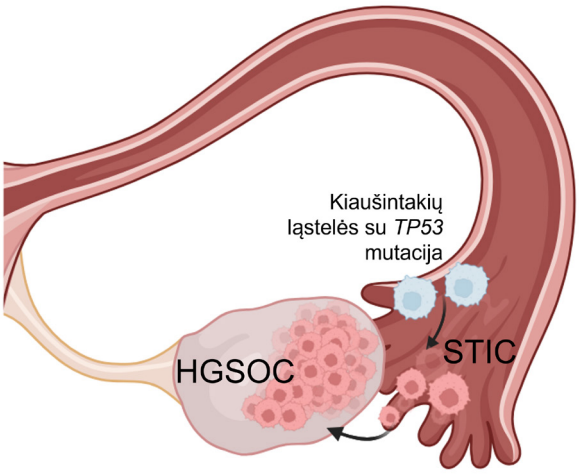


Pav. 1.2 Kiaušidžių vėžio histologiniai tipai (sukurta su *canva.com*, moters lytinių organų paveikslas: *biorender.com*, histologiniai vaizdai: (pagal Murali *et al*., 2023; Ravindran *et al*., 2021; Yilmaz *et al*., 2019, būdingos mutacijos: Hollis, 2023, klasifikacija Köbel & Kang, 2022). MMR – nesuporuotų nukleotidų reparacija

Remiantis morfologinėmis ir molekulinėmis genetinėmis savybėmis, kiaušidžių navikai yra grupuojami į I ir II tipo navikus, kurie skiriasi savo morfogeneze. I tipo navikus sudaro žemo diferenciacijos laipsnio endometrioidinė, serozinė, mucininė ar šviesių ląstelių karcinoma, o II tipo navikus sudaro beveik išimtinai HGSOC, tačiau retais atvejais priskiriami ir aukšto diferenciacijos laipsnio endometrioidinė arba nediferencijuota karcinoma (Kurman & Shih, 2011).

Iki 1999 metų manyta, jog kiaušidžių vėžys vystosi iš kiaušidžių paviršiaus ląstelių, kurios įgijusios vėžinius pakitimus formuoja ląsteles,

morfologiškai panašias į kiaušintakių, gimdos kūno, virškinamojo trakto, gimdos kaklelio ar šlapimo pūslės epitelį (atitinkamai serozinio, endometrioidinio, šviesių ląstelių ir paribiniai kiaušidžių navikai). Tačiau šiuo metu vyraujanti KV kilmės teorija teigia, jog epiteliniai kiaušidžių navikai formuojasi tiesiogiai iš ne kiaušidžių kilmės ląstelių. Endometrioidinio ir šviesių ląstelių tipo kiaušidžių navikai vystosi, kai endometriozinės cistos (endometriozė – gimdos ar kiaušidžių ląstelių išvešėjimas, kuris susidaro dėl retrogradinio mėnesinių ciklo) implantuojasi į kiaušidę, o seroziniai navikai – iš kiaušintakių ląstelių (Kurman & Shih, 2011). Kiaušintakių epitelinės ląstelės, įgijusios *TP53* mutacijas gali formuoti serozinę tubulinę intraepitelinę karcinomą (STIC) – invazyvų kiaušintakių audinį, kuris implantuojasi į artimiausius organus (kiaušides arba pilvaplėvę) ir vystosi į aukšto piktybiškumo kiaušidžių, kiaušintakių ar pilvaplėvės karcinomą (**Pav. 1.3**) (Shih *et al*., 2021). Dėl bendros kancerogenezės šie trys ginekologiniai navikai yra klasifikuojami kartu (Berek *et al*., 2021).



Pav. 1.3 Aukšto piktybiškumo serozinio kiaušidžių vėžio kancerogenezė: kiaušintakių ląstelės su *TP53* mutacija progresuoja į serozinę tubulinę intraepitelinę karcinomą (STIC), kurios ląstelės, patekusios į kiaušidę, sukelia aukšto piktybiškumo serozinę kiaušidžių karcinomą (HGSOC) (sukurta su *biorender.com*)

Ne kiaušidžių kilmės kiaušidžių vėžio teoriją patvirtina tai, jog kiaušidžių navikai yra retai nustatomi neišplitę už kiaušidžių ribų, o apie 60 % II tipo KV atvejų kartu nustatomi STIC (Shih *et al*., 2021). II tipo KV ląstelės morfologiškai labiau primena sekrecines kiaušintakių ląsteles, nei kiaušidžių ląsteles su blakstienėlėmis, tai paaiškina skirtinga šių ląstelių embriogenezė:

kiaušidės vystosi iš mezodermos, o gimda, gimdos kaklelis ir kiaušintakiai iš Miulerio latakų (Kurman & Shih, 2011).

KV kilmę geriausiai įrodo bendri navikų ir jų pirmtakų pakitimai: metilomos ir transkriptomos analizė rodo, kad II tipo navikai labiau primena kiaušintakių epitelį nei kiaušidžių ar pilvaplėvės audinius, o *TP53* mutacijos yra nustatomos beveik visuose STIC ir II tipo KV atvejuose (Shih *et al*., 2021). Genetinius pakitimus iš dalies gali skatinti uždegiminė kiaušidės aplinka: ovuliacijos metu folikulinis skystis gali būti laikomas kancerogeniniu dėl jame esančių laisvųjų radikalų ir reaktyvių deguonies formų, kurios patekusios į šalia esančias fimbrijų ląsteles gali sukelti DNR pažaidas ir lemti vėžį, ypač jei šios ląstelės jau turi paveldėtus rekombinacijos genų *BRCA1* ar *BRCA2* pakitimus (Huang *et al*., 2015).

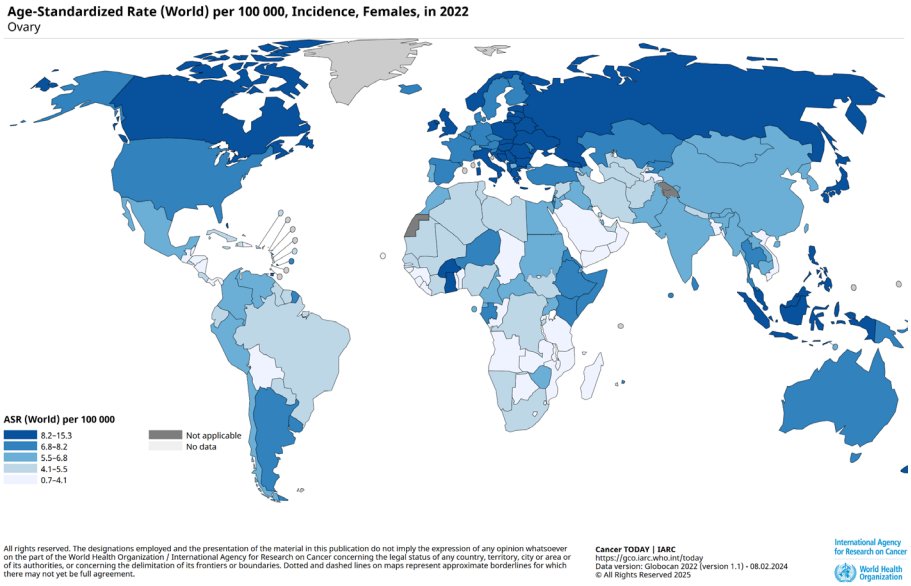
Dažniausiai I tipo navikai nustatomi ankstyvose stadijose, pasižymi lėta ligos eiga, ypač jei yra nustatomi kaip paribiniai navikai, kurie savo klinikinėmis savybėmis primena tiek gerybinius, tiek piktybinius navikus, kol progresuoja į I tipo KV. Pažingsniui vykstantis I tipo KV morfologijos ciklas primena kolorektalinę karcinomą (Shih *et al*., 2021), be to, panašūs ir būdingi genetiniai požymiai (**Pav. 1.2**): sutrikęs Wnt signalinis kelias (somatinės mutacijos *CTNNB1* gene, koduojančiame β–kateniną, nustatomos apie 50 % šviesių ląstelių ir endometrioidinių navikų atvejų), taip pat PI3K kelio mutacijos *KRAS* (aptinkamos iki 33 % LGSOC, iki 25 % endometrioidinio, iki 20 % šviesių ląstelių ir iki 70 % mucininio tipo KV atvejų), *PTEN* (30–45 % endometrioidinio KV atvejų), *PIK3CA* (iki 50 % endometrioidinio ir šviesių ląstelių bei iki 10 % mucininio tipo KV atvejų) genuose bei chromatino remodeliacijos komplekso SWI/SNF struktūrinį baltymą koduojančio geno *ARID1A* mutacijos (apie 50 % šviesių ląstelių ir 20–40 % endometrioidinio tipo KV) (Hollis, 2023).

II tipo KV, specifiškai HGSOC, pasižymi greita ligos progresija ir greitu atsinaujinimu po gydymo (ketvirtadaliui pacienčių iki 6 mėnesių po gydymo atsinaujina navikai). HGSOC beveik išskirtinai turi *TP53* mutacijas ir apie 20 % atvejų nustatomos paveldimos *BRCA1* ar *BRCA2* mutacijos (Bell *et al*., 2011). Retais atvejais, HGSOC kyla ne iš STIC, o progresuoja iš serozinių paribinių navikų ar LGSOC, todėl tokie navikai, kaip ir I tipo KV, pasižymi PI3K signalinio kelio mutacijomis *KRAS*, *PI3KCA* genuose (Hollis, 2023).

1.2 Kiaušidžių vėžio epidemiologija ir rizikos veiksniai

KV yra 8 dažniausia ir daugiausiai mirčių lemianti (Allemani *et al*., 2018) moterų onkologinė liga pasaulyje. Naujausiais 2022 metų duomenimis visame pasaulyje buvo nustatyta 324 398 naujų KV atvejų ir 206 839 naujų mirčių

nuo KV atvejų. Bendrai KV sudaro 3,4 % visų naujų moterų vėžio atvejų ir net 4,8 % visų moterų mirčių nuo vėžio atvejų pasaulyje (Bray *et al*., 2024). Vien Lietuvoje 2017 metų duomenimis, kasmet nustatoma apie 373 naujų KV atvejų, iš jų net 57,9 % pažengusios (III–IV) stadijos navikai, o su KV susijusių mirčių atvejų nustatoma apie 250 per metus (“Atviri Statistiniai Duomenys - Nacionalinis Vėžio Institutas,” m.n.). Pagal amžiui standartizuotą atvejų skaičių pasaulyje Lietuva yra antra pasaulyje pagal sergamumą KV (**Pav. 1.4**), toks dažnis yra siejamas su geresne diagnostika, genetiniais veiksniais (dažnomis *BRCA1/2* mutacijomis) ir aplinkos veiksniais tokiais kaip kontracepcijos vartojimas ir rūkymas (Wei *et al*., 2025).



Pav. 1.4 Amžiui standartizuotas sergamumas kiaušidžių vėžiu pasaulyje (“Cancer Today,” m.n.)

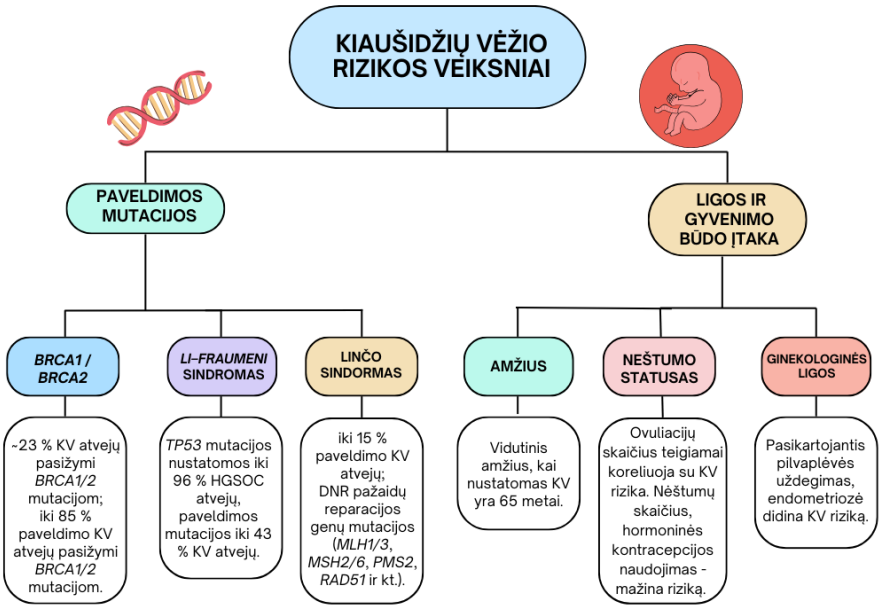
Tarptautinės vėžio tyrimų agentūros (angl. *Agency for Research on Cancer* – IARC) duomenimis, serozinio tipo KV sudaro net 42,97 % visų KV atvejų pasaulyje ir yra dažniausiai nustatomas būtent mūsų regione. Mucininis, endometroidinis ir šviesių ląstelių KV sudaro atitinkamai 11,47 %, 10,39 % ir 5,75 % visų KV atvejų pasaulyje (Wang *et al*., 2024).

Penkerių metų KV standartizuotas pagal amžių išgyvenamumas pasaulyje nesiekia 50 %, o Lietuvoje yra vienas mažiausių ir pastaruosius 20 metų siekė vos 30–35 %. Visame pasaulyje bendras išgyvenamumas nuo KV išlieka stabilus jau apie 30 metų, o per 15 metų laikotarpį Lietuvoje nuo 2000 metų šis rodiklis paaugo vos 5 % nuo 30,2 iki 35,0 % (Allemani *et al*., 2018). Didžiausią dalį mirčių nuo KV lemia II tipo navikai – išsivysčiusiose šalyse

bendras penkerių metų išgyvenamumas siekia tarp 32,2 ir 47,5 %, o palyginus I tipo KV penkerių metų išgyvenamumas yra ženkliai didesnis: endometrioidinio tipo 63,5–90,1 %, šviesių ląstelių 46,5–68,2 %, mucininio tipo 55,0–71,9 % (Cabasag *et al*., 2023).

KV dažniausiai yra nustatomas vyresnio nei 65 amžiaus moterims. Vyresnis amžius diagnozės metu yra siejamas su pažengusia liga ir trumpesniu išgyvenamumu. Yra nustatytas stiprus ryšys tarp KV rizikos ir ovuliacijų dažnio: moterims, kurios neturėjo ovuliacijų 8,7 metus KV rizika sumažėjo 4 kartus (šansų santykis (ŠS) = 0,23, 95 % pasikliautinasis intervalas (PI): 0,1–0,5), o kiekvieni hormoninės kontracepcijos naudojimo metai sumažina KV tikimybę 11 % (ŠS = 0,89, 95 % PI: 0,85–0,93). Vyresnis paskutinio gimdymo amžius taip pat sumažina KV tikimybę (ŠS = 0,89, 95 % PI: 0,84–0,94), o kiekvienas susilauktas vaikas sumažina riziką 24 % (ŠS = 0,76, 95 % PI: 0.69–0.85). Šie rezultatai palaiko teoriją, jog ovuliacijos metu kiaušidėse susidaro kancerogeninė aplinka. Nepaisant apsaugančios gimdymų įtakos KV rizikai, priešlaikinis gimdymas ir preeklampsija didina KV riziką (atitinkamai ŠS = 1,48, 95 % PI: 1,02–2,15 ir ŠS = 2,59, 95 % PI: 1,35–4,49), kaip ir įvairios su lytiniais organais susijusios ligos kaip gimdos uždegimas, kiaušidžių cistos ir endometriozė (Momenimovahed *et al*., 2019).

Paveldimi genetiniai veiksniai lemia apie 23 % KV atvejų, iš jų 65–85 % yra siejami su krūties–kiaušidžių vėžio sindromu: paveldimomis DNR pažaidų reparacijos genų *BRCA1* ir *BRCA2* mutacijomis, kurios lemia 54 % riziką susirgti KV ir 85 % riziką susirgti krūties vėžiu. Apie 10–15 % paveldimo KV atvejų lemia Linčo sindromas, sukeliamas nesuporuotų nukleotidų reparacijos genų *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *MLH3* ir *PMS2* mutacijų, siejamų su I tipo navikais. Dėl nesuporuotų nukleotidų reparacijos sutrikimų kaupiasi trumpos pasikartojančios nukleotidų sekos (mikrosatelitai), kuriuose dažnos replikacijos klaidos. Mikrosatelitai yra itin dažni dvigrandžių DNR trūkių reparacijos genuose (*Mre11* ir *RAD50*), kuriuose dėl replikacijos klaidų atsiradusios mutacijos gali lemti vėžį. Net 43 % Li–Fraumeni sindromo, lemiamo autosominiu dominantiniu būdu paveldimų *TP53* geno mutacijų, atvejų nustatomas KV (**Pav. 1.5**). Pacientėms, turinčioms paveldimus vėžio sindromus lemiančias mutacijas, KV nustatomas jaunesniame amžiuje negu kitais KV atvejais: amžiaus mediana germinalinių ląstelių *TP53* mutacijos atveju yra tik 39,5 metai, palyginus su somatines mutacijas turinčio KV 64,3 metų amžiaus mediana (Toss *et al*., 2015).



Pav. 1.5 Kiaušidžių vėžio rizikos veiksniai (sukurta su *canva.com* pagal (Momenimovahed *et al*., 2019; Toss *et al*., 2015).

1.3 Kiaušidžių vėžio diagnostika

Didžioji dalis KV atvejų yra nustatomi pagal simptomus, kurie pasireiškia pažengusiose stadijose, dėl naviko ir jo sukeltų ascitų (skysčių kaupimosi) ir yra nespecifiniai, o ankstyvas KV yra besimptomis (González-Martín *et al*., 2023). KV simptomai yra pilvo skausmas (53 % atvejų), vidurių užkietėjimas (20 %) arba viduriavimas (27 %), dažnas šlapinimasis (14 %), kraujavimas iš lytinių organų (13 %), pilvo pūtimas (17 %), prarastas apetitas (21 %), virškinimo sutrikimai (36 %) (Hamilton *et al*., 2009).

Pirminė KV patikra atliekama naudojant transvaginalinį ultragarso tyrimą, kurio tikslumas nustatant piktybinius kiaušidžių navikus yra apie 73 %, jautrumas – 52 %, o specifiškumas – 84 % (Guadalupe *et al*., 2021). Įtariant KV, diagnostikai naudojami kiti vaizdinimo metodai: kompiuterinė tomografija (jautrumas 40,70–92,16 %, specifiškumas 57,14–89,10 %) ir magnetinio rezonanso tomografija (jautrumas 98 %, specifiškumas 83 %) (Hong & Ding, 2025).

1.4 Klinikinėje praktikoje taikomi kiaušidžių vėžio biožymenys

Klinikinėje praktikoje yra naudojami du kraujo serumo KV biožymenys: karbohidrato antigenas 125 (CA125 – angl. *Carbohydrate Antigen 125*) ir žmogaus antsėklidžio baltymas 4 (HE4 – angl. *Human Epididymis Protein 4*) (Dochez *et al*., 2019).

CA125 yra dažniausiai naudojamas KV biožymuo, dar žinomas kaip Vėžio antigenas 125 arba Mucinas 16 (MUC16). CA125 yra mucinų tipo glikoproteinas, koduojamas *MUC16* geno. CA125 yra transmembraninis baltymas, monokloniniais antikūnais kraujyje yra matuojamas užląsteninis baltymo domenas, kuris patenka į kraują įvykus baltymo hidrolizei. Dėl to yra sunku įvertinti tikrąją baltymo koncentraciją. CA125 nėra specifinis kiaušidžių vėžiui, jo padidėjusi raiška yra nustatoma kepenų ir plaučių vėžio atvejais bei gerybinių būklių: kiaušidžių cistų, endometriozės, gimdos fibromų, cirozės ir daugelio kitų ligų atvejais (Zhang *et al*., 2025). CA125 ribine koncentracija yra laikoma 35 U/ml, tačiau I stadijos KV padidėjusi CA125 koncentracija yra nustatoma tik 23–50 % atvejų. Metaanalizių duomenimis CA125 bendras jautrumas yra 63–93 %, specifiškumas 53–92 %, o plotas po ROC (angl. *received operating characteristic – ROC*) kreive (angl. *area under the cuve* – AUC) 0,78–0,93 (Dochez *et al*., 2019). Dėl mažo specifiškumo ir padidėjusios koncentracijos nevėžinių ginekologinių ligų atveju, CA125 nėra rekomenduojamas kaip KV diagnostinis biožymuo, tačiau gali būti naudojamas kartu su vaizdinimo metodais kaip HGSOC atsako į gydymą žymuo (Colombo *et al*., 2019), galintis nustatyti KV atkrytį 62–92% jautrumu ir 91–100% specifiškumu (Salani *et al*., 2011).

HE4 yra kitas, rečiau naudojamas, KV biožymuo. Tai taip pat glikoproteinas, priklausantis išrūgų rūgštinių keturių–disulfidų bazės baltymams (angl. *whey acidic four–disulfide core proteins*), dar vadinamas WFDC2. Išrūgose šie baltymai vadinami WAP – trumpi 50 aminorūgščių baltymai su nežinoma biologine funkcija. Žmonių organizmuose HE4 turi 2 WAP domenus, yra randamas antsėklidžiuose ir vyruose prisideda prie spermos brendimo. Nedidelė HE4 raiška nustatoma ir kvėpavimo bei lytiniuose organuose, bet padidėjusi raiška dažniausiai nustatoma endometrioidinio KV atveju, ir, kiek mažiau, šviesių ląstelių ir kituose epiteliniuose KV. HE4 bendras jautrumas KV atveju yra 58–83 %, specifiškumas 78–99 %, o AUC 0,82–0,96. HE4 kiekį kraujyje gali padidinti rūkymas ir sumažinti hormoninės kontracepcijos naudojimas, todėl šio testo rezultatai gali būti nepatikimi (Dochez *et al*., 2019) ir HE4 nėra rekomenduojamas KV diagnostikai (Colombo *et al*., 2019).

Siekiant padidinti diagnostinių biožymenų patikimumą yra sukurta keletas KV daugiaparametrinių testų iš kurių geriausiai žinomi yra piktybiškumo rizikos indeksas (angl. *risk of malignancy index – RMI*), kombinuojantis CA125, menopauzės statusą ir transvaginalinį ultragarso tyrimą, bei piktybiškumo rizikos algoritmas (angl. *risk of malignancy algorithm – ROMA*) kombinuojantis menopauzės statusą, CA125 ir HE4. Vien CA125 ir HE4 kombinacijos KV diagnostikos specifiškumas yra 82–97 %, jautrumas 55–79 %, AUC 0,89–0,96, o kombinacijoje su klinikiniais rodikliais (ROMA indeksas), jautrumas yra 75–97%, specifiškumas 69–93 %, AUC 0,84–0,97 (Dochez *et al*., 2019).

Kelių biožymenų kombinacija padidina KV diagnostikos tikslumą: vien CA125 ir ultragarso kombinacija (RMI indeksas) pasižymi mažesniu diagnostiniu potencialu nei dviejų biožymenų (CA125 ir HE4) kombinacijos: jautrumas 75–78 %, specifiškumas 80–92 %, AUC = 0,84–0,88 (Dochez *et al*., 2019). Deja, šiuo metu klinikinėje praktikoje taikomi KV biožymenys ir diaugiaparametriniai testai (**1.1 lentelė**) neturi KV diagnostikai reikalingų rodiklių: 75 % jautrumo ir >99,6 % specifiškumo, būtinų pasiekti 10 % teigiamą predikcinę vertę, reikiamą efektyviai patikros programai (Clarke-Pearson, 2009), todėl KV klinikinei praktikai yra reikalingi nauji diagnostiniai žymenys.

1.1 lentelė Klinikinėje praktikoje taikomų biožymenų ir daugiaparametrinių modelių jautrumas, specifiškumas ir plotas po kreive (AUC). Adaptuota pagal (Dochez *et al*., 2019)

Biožymuo / modelis	**Jautrumas, %**	**Specifiškumas %**	**AUC**
CA125	63–93	53–92	0,78–0,93
HE4	58–83	78–99	0,82–0,96
CA125 + HE4	82–97	55–79	0,89–0,96
RMI	75–78	80–92	0,84–0,88
ROMA	75–97	69–93	0,84–0,97

1.5 Kiaušidžių vėžio prognostiniai veiksniai

Kaip ir daugelio vėžinių susirgimų, pagrindiniai KV prognostiniai rodikliai yra klinikiniai: stadija, naviko diferenciacijos laipsnis, histologinis tipas, amžius, kūno masės indeksas (KMI) (Giro *et al*., 2025).

Kiaušidžių vėžio histologinė klasifikacija yra apibrėžta Pasaulio sveikatos organizacijos (WHO) gairių (WHO Classification of Tumours Editorial Board 2020), o skirstymas į stadijas yra atliekamas pagal

Tarptautinės ginekologijos ir akušerijos federacijos (angl. *International federation of gynecology and obstetrics* – FIGO) gaires, kurios iš esmės sugrupuoja navikus pagal TNM sistemą: I stadija apima navikus, neišplitusius už kiaušidės ar kiaušintakio ribų, II stadijai priklauso T2 stadijos navikai, išplitę į pilvaplėvę, III stadijos navikai apima bet kurios stadijos navikus su limfmazgių metastazėm, o IV stadijos navikai apima navikus su tolimosiomis metastazėmis (Berek *et al*., 2021). Jungtinės Karalystės milijono moterų projekto duomenimis, bendras penkerių metų išgyvenamumas nustačius KV I stadijoje siekė 87 %, II – 62 %, III – 26 %, IV – 14 %. Naviko stadija, iš dalies pagal apibrėžimą, yra glaudžiai susijusi su KV tipu: I tipo navikai dažniausiai nustatomi I arba II stadijoje, o II tipo navikai III–IV stadijoje (Gaitskell *et al*., 2022).

Epiteliniai navikai taip pat yra skirstomi pagal histologinį diferenciacijos laipsnį, kuris varijuoja nuo gerai diferencijuotų navikų (G1), vidutiniškai diferencijuotų navikų (G2) ir prastai diferencijuotų (aukšto diferenciacijos laipsnio) navikų (G3) (Berek *et al*., 2021). Naviko diferenciacijos laipsnis yra stiprus prognostinis indikatorius, padidinantis mirties nuo KV riziką apie tris kartus endometrioidinio (santykinė rizika (SR) = 3,03, 95 % PI: 1,85–4,98) ir mucininio tipo (SR = 3,04, 95 % PI: 1,10–8,37) navikuose, bei maždaug pusantro karto serozinio tipo navikuose (palyginus HGSOC su LGSOC SR = 1,63, PI: 1,19–2,23) (Gaitskell *et al*., 2022).

Mirties nuo KV rizikai yra svarbus amžius: kiekvieni penkeri metai lemia apie 19 % didesnę mirties riziką (SR = 1,19, PI: 1,15–1,22). Kiek mažiau svarbūs yra KMI ir rūkymo statusas: KMI lemia 6 % didesnę mirties riziką (SR = 1,06, PI: 1,02–1,11), o rūkymas 17 % rizikos padidėjimą (SR = 1,17, PI: 1,07–1,27) (Gaitskell *et al*., 2022).

1.6 Kiaušidžių vėžio gydymas

Standartinis epitelinio KV gydymas apima chirurginį gydymą, po kurio seka platinos preparatų chemoterapija, kurią galima derinti su VEGF inhibitoriumi bevacizumabu. Tais atvejais, kai navikai yra dideli, pirmiausia taikoma neoadjunvantinė chemoterapija, po kurios pašalinamas navikas ir tęsiamas gydymas vaistais. Priklausomai nuo *BRCA* mutacijų statuso galimas taikininis gydymas poli(ADP−ribozės) polimerazės (PARP) inhibitoriais, tokiais kaip olaparibas (Berek *et al*., 2021). Priklausomai nuo naviko stadijos, ligos atsinaujinimas po pirminio gydymo yra nustatomas maždaug 25 % ankstyvos stadijos KV pacienčių ir > 80 % pažengusios stadijos KV pacienčių. Pacientės, kurioms liga atsinaujina vėliau nei po 6 mėnesių nuo gydymo, yra laikomos jautriomis platinos preparatų chemoterapijai. Jautrumas platinos

preparatams yra prognostinis išgyvenamumo iki ligos atkryčio (angl. *progression−free survival* – PFS) veiksnys iki ketvirto chemoterapijos taikymo ciklo (Garzon *et al*., 2020).

Kaip minėta aukščiau, CA125 yra vienas pagrindinių prognostinių biožymenų naudojamų II tipo KV atvejais: pacientėms, kurių CA125 koncentracija po gydymo siekia >10 U/ml nustatomas du kartus dažnesnis ligos atsinaujinimas (pavojaus rizika (PR) = 2,17, 95 % PI: 1,14–4,1) (Piatek *et al*., 2021). Pirminė CA125 koncentracija prieš gydymą taip pat gali būti naudingas prognostinis rodiklis siejamas tiek su bendru išgyvenamumu (PR = 1,62, 95 % PI = 1,27–2,06), tiek su PFS (PR = 1,59, 95 % PI = 1,44–1,76) (Wang *et al.*, 2022).

Be tradicinių vėžio klinikinių rodiklių ir CA125 statuso, pacienčių prognozei įtaką daro likutinis navikas po operacijos, ascitai (siejami su prasta prognoze), pacienčių amžius (jaunesnis amžius siejamas su geresne prognoze) bei molekuliniai ir genetiniai žymenys aptariami žemiau (Giro *et al*., 2025).

1.7 Su kiaušidžių vėžiu susiję genetiniai pakitimai

Nors taškinės mutacijos ir chromosomų pakitimai yra dažniausiai klinikinėje praktikoje analizuojami KV pakitimai, didelė dalis navikų yra heterogeniški ir nepasižymi tais pačiais genetiniais pakitimais, todėl jų pritaikomumas vėžio diagnostikoje yra ribotas (Bell *et al*., 2011). Genų raiška kiekvienoje ląstelėje yra nulemta sudėtinių genetinių ir epigenetinių pakitimų: taškinių mutacijų, chromosomų amplifikacijų ir iškritų nulemtų genų kopijų pakitimų (angl. *copy number alterations*), epigenetinių pakitimų: DNR modifikacijų, chromatino kondensacijos pakitimų (chromatino remodeliacijos), transkripcijos veiksnių ir nekoduojančių RNR įtakos (Xu *et al*., 2023). Todėl genų raiška atspindi daugelį ląstelės molekulinių pakitimų ir suteikia informacijos apie ląstelės būseną tam tikru metu. Genų transkripcijos pakitimai, panaudojus juos kaip vėžio biožymenis, gali suteikti informacijos apie ląstelės diferenciaciją, padedant atskirti navikines ląsteles nuo sveikų, bei padėti įvertinti naviko fenotipą, siekiant nuspėti klinikinius požymius, įvertinti naviko progresijos riziką, būsimą atsaką į gydymą ir galimus terapinius taikinius (Bradner *et al*., 2017).

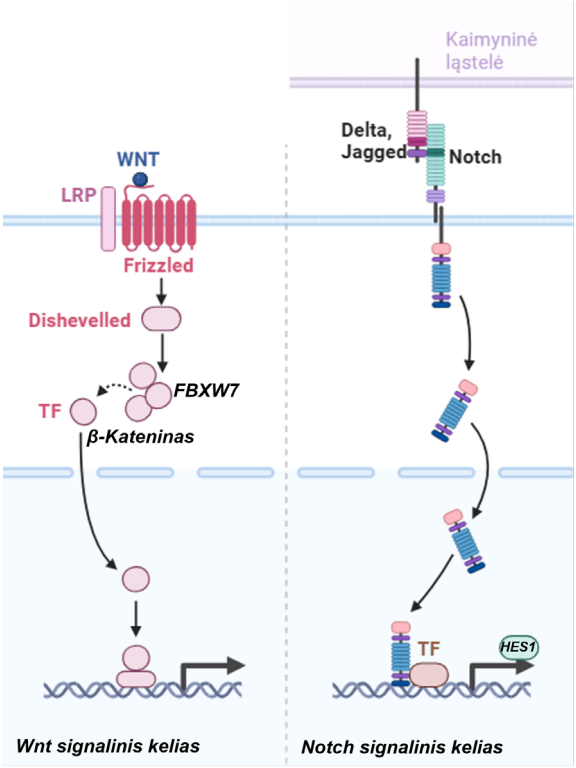
1.7.1 Notch ir Wnt signalinių kelių genų raiška kiaušidžių vėžio atvejais

Kiaušintakių fimbrijų ląstelės, iš kurių kyla HGSOC, nuolat patiria ciklinius hormoninius pakitimus, didinančius DNR pažaidų ir vėžio formavimosi riziką, todėl, siekiant palaikyti normalią būseną, šios ląstelės turi

nuolat atsinaujinti siekiant palaikyti normalią būseną. Už tai atsakingos yra kamieninės ląstelės, iš kurių formuojasi kiaušintakių epitelinės ląstelės. Kiaušintakiuose esančių kamieninių ląstelių funkcijas palaiko Wnt ir Notch signaliniai keliai (Kessler *et al*., 2015). Šių signalinių kelių aktyvacija yra siejama su KV atsparumu chemoterapijai, ląstelių proliferacija ir epiteline–mezenchimine tranzicija (EMT). Wnt signalinis kelias taip pat reguliuoja Notch signalinį kelią per Jagged1 ligando inhibiciją (Bocchicchio *et al*., 2019). Todėl šie signaliniai keliai yra svarbūs KV vystymuisi, o jų komponentai – potencialūs KV biožymenys.

CTNNB1 yra pagrindinis Wnt signalinio kelio genas, koduojantis centrinį jo komponentą β–kateniną (**Pav. 1.6**). *CTNNB1* geno ir baltymo raiška yra sumažėjusi beveik visuose kietuosiuose navikuose, o KV ir storosios žarnos navikuose nustatoma reikšminga neigiama koreliacija su naviko stadija (AmeliMojarad *et al*., 2023). Wnt kelyje ubikvitinazės funkcijas gali atlikti FBXW7, kurio taikiniai yra β–kateninas, ciklinas E, Notch ir c–Myc signalinių kelių komponentai, todėl *FBXW7* yra laikomas navikus supresuojančiu genu, o jo raiškos sumažėjimas, palyginus su sveikais audiniais, nustatomas daugelyje navikų, įskaitant KV, ir yra siejamas su prasta prognoze (Xu *et al*., 2021).

Kaip ir Wnt, Notch signalinis kelias daro įtaką daugelio su kancerogeneze susijusių ląstelių funkcijų, o vėžio atveju pakitimai nustatomi tiek receptorius (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*), tiek abiejų tipų: *jagged* (*JAG1*, *JAG2*) ir į *delta* panašius (angl. *delta–like*, *DLL1*, *DLL2*, *DLL3*) ligandus, tiek tiesioginius taikinius, tokius kaip *HES1*, koduojančiuose genuose (**Pav. 1.6**). KV atveju daugiausiai sąsajų iki šiol nustatyta su *NOTCH3*, *NOTCH1* ir *JAG1* ir KV atsparumu chemoterapijai, bei *DLL4* sąsaja su prastu išgyvenamumu (Shi *et al*., 2024). Akivaizdu jog Notch ir Wnt signaliniai keliai daro įtaką kiaušintakių formavimuisi ir kancerogenezei, jų komponentų raiškos pakitimai turi potencialo tapti KV biožymenimis diagnostikai ir ligos prognozei.



Pav. 1.6 Wnt ir Notch signaliniai keliai: Wnt ligandai aktyvuoja signalinį kelią jungiantis prie *frizzled* receptorių, kurie dimerizuojasi su LPR baltymu ir per *dishevelled* pritraukia destrukcijos komplekso baltymus pvz. ubivitinazę FBXW7, tokiu būdu nebėra skaldomas β–kateninas, todėl jis nukeliauja į branduolį ir veikia kaip transkripcijos aktyvatorius; Notch receptoriai, prisijungus *delta–like* arba *jagged* ligandams yra skaldomi į viduląstelinį domeną, kuris branduolyje veikia kaip transkripcijos veiksnys ir aktyvuoja tokius genus kaip *HES1*. TF – transkripcijos veiksniai (angl. *transcription factor*) (sukurta su *biorender.com*)

1.7.2 *ARID1A* geno pakitimai kiaušidžių navikuose

Vienas svarbiausių KV vystymąsi skatinančių genų, AT–gausaus sąveikos domeno 1A (*ARID1A*) genas, koduojantis centrinį SWI/SNF komplekso, atliekančio chromatino remodeliaciją, baltymą, yra antras dažniausiai pakitęs genas KV navikuose. ARID1A baltymas yra svarbus ne tik atviros chromatino būsenos palaikymui, bet ir ląstelės ciklo valdymui bei DNR pažaidų reparacijai. Įdomu, jog *ARID1A* pakitimai dažniausiai nenustatomi kartu su daugiausiai mutacijų KV atvejais pasižyminčiu genu *TP53*, tačiau dažnai aptinkamos kartu su *PTEN* pakitimais (Fontana *et al*.,

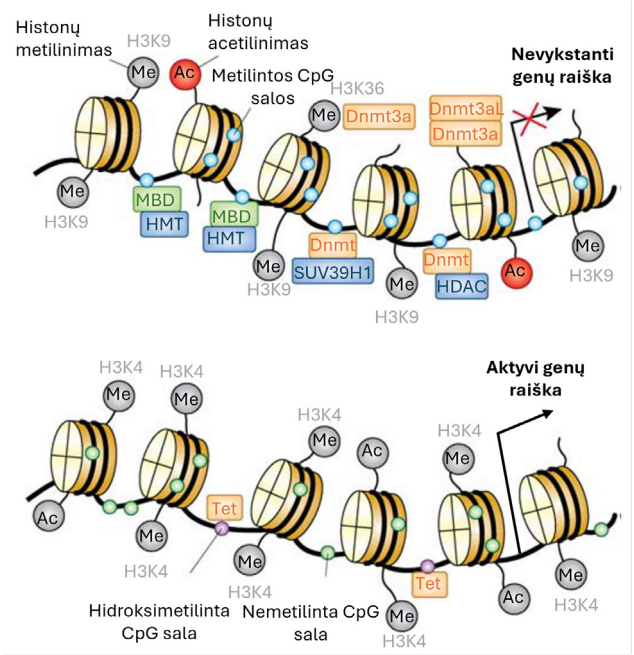
2023). *ARID1A* mutacijos ypač dažnai nustatomos endometrioidinio (30–46 % atvejų) ir šviesių ląstelių (apie 46–70 % atvejų) KV bei 13 % KV pirmtakų – endometriozės atvejų, tačiau tik apie 80 % *ARID1A* mutacijų lemia baltymo raiškos praradimą, dar 23 % atvejų ARID1A baltymo raiškos praradimas yra nesusijęs su mutacijomis (Yachida *et al*., 2020). *ARID1A* raiška, kaip daugelio navikų supresorių, yra valdoma pagal „dviejų smūgių“ teoriją, pagal kurią paveldėta mutacija lemia didesnę vėžio riziką, o antro geno alelio invaktyvacija yra reikalinga įvykti fenotipinams pakitimams, lemiantiems vėžį. *ARID1A* funkcijos sutrikimui įtaką gali daryti ne tik mutacijos, bet ir epigenetiniai veiksniai, tokie kaip geno promotoriaus hipermetilinimas, iki šiol nustatytas krūties navikuose (Zhang *et al*., 2013).

Be ląstelių proliferaciją skatinančių signalinių kelių aktyvacijos, vėžinėse ląstelėse yra pastebimi dar devyni navikinių ląstelių požymiai: augimo supresorių vengimas, ląstelių žūties išvengimas, ląstelių nemirtingumas, palaikoma angiogenezė, invazija į kitus organus, genomo nestabilumas, naviką skatinanti uždegiminė aplinka, pakitusi ląstelės energijos reguliacija ir imuninės aplinkos vengimas (Hanahan & Weinberg, 2011), todėl analizuojant potencialius genetinius biožymenis yra pravartu atsižvelgti ne tik į geriausiai žinomus ląstelių vėžinius pakitimus, bet ir genus, dalyvaujančius įvairiuose vėžinių ląstelių mechanizmuose, ir jų kombinacijas, siekiant tikslesnės KV diagnostikos ir prognostikos galimybių.

1.8 Su kiaušidžių vėžiu susiję epigenetiniai mechanizmai

Vienas ankstyviausių vėžinių ląstelių pakitimų yra ne genetiniai, o epigenetiniai pakitimai – DNR cheminės modifikacijos, darančios įtaką genų raiškai ir genomo stabilumui. 5–metilcitozinas (5mC) yra geriausiai žinoma epigenetinė modifikacija, dažniausiai aptinkama CG dinukleotidais gausiose genomo vietose, vadinamose CpG salomis. Normaliose ląstelėse citozinai CG dinukleotiduose yra metilinti, tačiau CpG salos, kuriose dažnai nustatomi genų raiškos reguliacijos elementai – promotoriai ir stiprikliai, yra nemetilintos ir vyksta aktyvi genų raiška. Vėžinėse ląstelėse CpG salose esantys promotoriai dažnai yra hipermetilinti. DNR metiltransferazės DNTM3A ir DNTM3B gali suteikti citozinui metilo žymę, o DNMT1 šią žymę palaiko replikacijos metu, todėl DNR metilinimas yra stabili modifikacija (Nishiyama & Nakanishi, 2021). Metilintus CG atpažįsta metil–CpG–surišantį domeną (angl. *methyl–CpG–binding domain* – MBD) turintys baltymai, kurie gali pritraukti transkripcijos represorius (Moore *et al*., 2012) (**Pav. 1.7**). DNMT1 taip pat jungiasi su histonų deacetilaze HDAC1 ir metiltransferaze (HMT) kuri suteikia histono H3 lizinams K9 ir K27

represyvias metilinimo žymes (Hervouet *et al*., 2018), pritraukiančias *polycomb* represyvius kompleksus (angl. *polycomb repressive complex* – PcG), lemiančius didesnę chromatino kondensaciją, dėl kurios nevyksta genų raiška (Guo *et al*., 2021). DNR metilinimo žymę gali pašalinti dešimt–vienuolikos translokacijos (angl. *ten-eleven translocation* – Tet) fermentai, prijungiantys hidroksi grupę prie metilo. Toliau 5hmC modifikuojama Tet fermentų į 5–formil–citoziną arba 5–karboksi–citoziną, arba 5hmC gali būti modifikuojama AID/APOBEC fermento į 5–hidroksimetil–uracilą, o modifikuotas bazės toliau ištaiso bazių pašalinimo DNR reparacijos mechanizmas (angl. *base excision repair* – BER) kurio metu timino DNR glikozilazė (TDG) gali pakeisti modifikuotas bazes atgal į citoziną (Moore *et al*., 2012).



Pav. 1.7 Genų transkripciją (raišką) reguliuojantys epigenetiniai mechanizmai: DNR metilinimas yra reguliuojamas DNR metiltransferazių (Dnmt, Dnmt3a, ir jų ligando ir Dnmt3L). DNR metilinimą atpažįsta metil–CpG–surišantys baltymai (MBD) baltymai, kurie kartu su metiltransferazėmis pritraukia histonų deacetilazes (HDAC), kurios nuo histonų galų pašalina acetilo grupes, ir histonų metiltransferazes (HMT, SUV39H1) kurios metilina histonų galus. Aktyvios transkripcijos atveju H3K3me3 histonų žymė inhibuoja Dnmt nemetilintose CpG salose, o *Tet* translokacijos fermentas prideda hidroksi grupę prie metilo grupės ir taip paskatina DNR metilinimo žymės pašalinimą (adaptuoja pagal (Moore *et al*., 2012))

Kaip ir daugelyje navikų, KV atveju yra nustatomas atvirkščias metilinimo statusas palyginus su normaliomis ląstelėmis: bendras hipometilinimas ir hipermetilinimas genų promotorių regionuose. Bendrai bent 4593 genų metilinimas yra reikšmingai pakitęs HGSOC atvejais palyginus su normalių kiaušintakių audiniais, daugiausiai genuose susijusiuose su RAS ir Hippo signaliniais keliais, adherinų jungtimis ir dopaminerginėmis sinapsėmis. HGSOC atvejais 725 genų sekos hipometilintos ir 3868 hipermetilintos, ir atitinkamai 24 ir 30 % koreliuoja su padidėjusia ar sumažėjusia genų raiška (Reyes *et al*., 2019). Bendras genomo hipometilinimas gali lemti onkogenų sekų demetilinimą, o CpG salų hipermetilinimas – navikų supresorių genų raiškos praradimą. Hipermetilnimas KV atveju nustatomas daugelyje gerai žinomų navikų supresorių genų promotorių sekų, įskaitant 31 % *BRCA1*, 10–30 % nesuporuotų nukleotidų reparacijos geno *MLH1* (Koukoura *et al*., 2014), iki 10–49 % su Ras susijusių domenų šeimos baltymo 1a geno (angl. *Ras association domain family protein 1a – RASSF1A*), iki 83 % opioidus surišančio baltymo geno *OPCML* geno promotorių (Hentze *et al*., 2019).

1.8.1 HOX šeimos genų promotorių metilinimas

Homeodėžutės (HOX) genų klasteris yra vienas geriausiai ištyrinėtų *polycomb* baltymo PRC1 valdomų genų šeimų, kadangi *polycomb* baltymų praradimas lemia HOX genų raiškos pakitimus ir didesnę chromatino kompaktizaciją tiek drozofilos, tiek žinduolių ląstelėse. Drozofilos embrionuose HOX genai yra išsidėstę iki 400 kb klasteriuose, padengtuose H3K27me3 represyviomis chormatino žymėmis ir vystymosi metu valdo embriono ašies formavimąsi (Cheutin & Cavalli, 2018). HOX genai ir *polycomb* kompleksai kontroliuoja vystymąsi ir žmonių embrionuose: *HOXA* genai dalyvauja Mulerio latakų formavimesi ir diferenciacijoje į moters lytinius organus, o šios šeimos genai yra dažnai metilinti įvairiuose navikuose, tarp jų ir KV. *HOXA9* metilinimas nustatomas iki 95 % HGSOC atvejų (Montavon *et al*., 2012), ir gali atskirti KV nuo normalių audinių AUC 0,68–0,80 bei koreliuoja su naviko histologiniu tipu. *HOXA10* ir *HOXA11* promotorių metilinimas KV atvejais pasiekia AUC 0,50–0,66, o *HOXA9* taip pat koreliuoja su prastesne ligos prognoze (Widschwendter *et al*., 2009). *HOXA9* metilinimas gali būti nustatomas ne tik KV audiniuose, bet ir laisvai cirkuliuojančioje DNR 59,5 % KV atvejų (Faaborg *et al.*, 2021).

HOX genų šeimai priklauso daugelis pagrindinių genų raiškos reguliatorių, tarp jų ir vienas pagrindinių kamieniškumo žymenų *OCT4*, bei mažiau žinomi transkripcijos veiksniai: HOP homeodežutės (angl. *HOP*

homeobox) genas *HOPX*, ALX homeodežutės 4 genas *ALX4*, ir uodeginio tipo homeodėžutės 2 (angl. *caudal type homeobox 2*) genas *CDX2*. Šie genai nepriklauso HOX genų klasteriams, valdantiems kūno ašies reguliaciją, todėl gali būt laikomi nekanoniniais HOX genais. Daugelis HOX genų ne tik dalyvauja organogenezėje, bet ir yra laikomi navikų supresoriais: *ALX4* siejamas su apatinės kūno dalies formavimusi (Matsumaru *et al*., 2013) ir skatina kiaušidžių vėžio ląstelių epitelinę – mezenchiminę tranziciją (Yuan *et al*., 2015). *CDX2* genas supresuoja *OCT4* trofoblaste ir prisideda prie ląstelių pluripotentiškumo reguliacijos (Huang *et al*., 2017), be to CDX2 baltymo raiška gali atskirti mucininį KV tipą nuo virškinamojo trakto navikų metastazių į kiaušides (Dundr *et al*., 2021). CDX2 baltymas, kaip transkripcijos veiksnys, didina atsparumą vaistams mucininio tipo KV ląstelėse per atsparumo vaistams geno 1 (angl. *multidrug resistance 1 – MDR1/ABCB1*) raiškos skatinimą (Koh *et al*., 2016). Nors *HOPX* nėra tiesiogiai siejamas su lytinių organų diferenciacija, tačiau *HOPX,* kaip ir *CDX2* ir *ALX4* gali inhibuoti Wnt signalinį kelią, svarbų kiaušidžių vystymuisi (Gokulan *et al*., 2022; Liu *et al*., 2012; Yang *et al*., 2017), be to *HOPX* yra vienas iš pagrindinių genų raiškos reguliatorių KV, siejamas su aplink naviką esančių audinių (angl. *tumor–associated stroma*) formavimusi (Celik *et al*., 2016). Kaip ir kitų HOX genų, *HOPX* promotoriaus sekos yra metilintos daugelyje navikų, įskaitant 62 % storosios žarnos (Katoh *et al*., 2012) ir 84 % skrandžio navikų (Ooki *et al*., 2010), *ALX4* promotorius hipermetilintas 69,5 % krūtų navikų (Yang *et al*., 2017) ir 55 % plaučių navikų (Liu *et al*., 2014), o *CDX2* promotoriaus hipermetilinimas nustatytas 72 % storosios žarnos navikų (Wang *et al*., 2018) atvejų. Šių genų raiška ir promotoriaus metilinimas kiaušidžių audiniuose iki šiol nėra gerai ištirtas.

1.9 Vėžio genomo atlaso projekto kiaušidžių vėžio molekuliniai tyrimai

Kiaušidžių vėžio heterogeniškumas, didelis sergamumas ir prasta ligos prognozė yra aktuali klinikinė problema, jau ilgą laiką dominanti mokslininkus: kiaušidžių vėžys, kartu su plaučių vėžiu ir glioblastoma buvo vienas iš trijų pirmųjų navikų, ištirtų Vėžio genomo atlaso projekte (angl. *The Cancer Genome Atlas – TCGA*) – viename didžiausių molekulinių vėžio duomenų projektų, vykdytų Jungtinių Amerikos Valstijų Nacionalinio Vėžio Instituto (angl. *National Cancer Institute – NCI*) ir Nacionalinio Žmogaus Genomo Tyrimų Instituto (angl. *National Human Genome Research Institute – NHGRI*). Projekto pradžia buvo 2006 metai (Hutter & Zenklusen, 2018), o pirmieji KV duomenys buvo išpublikuoti 2011 metais (Bell *et al*., 2011). Programai baigiantis 2018 metais TCGA duomenys apėmė daugiau kaip

11 000 vėžio atvejų, daugiau kaip 20 000 vėžinių ir kontrolinių audinių, 33 navikų tipus ir jų molekulinę informaciją apie DNR seką, genų raišką, epigenetinius pakitimus: mikroRNR, nekoduojančias RNR, DNR metilinimą, baltymų raišką ir struktūrą (Hutter & Zenklusen, 2018).

Pirminiai TCGA–OV kiaušidžių vėžio projekto rezultatai, išanalizavus 316 HGSOC mėginių, nustatė *TP53* mutacijas net 95,89 % mėginių, germinacinių ląstelių *BCRA1* ir *BRCA2* mutacijas atitinkamai 9 % ir 8 % atvejų bei šių genų somatines mutacijas 3 % atvejų, taip pat retesnes mutacijas *CSMD3*, *NF1*, *CDK12*, *FAT3*, *GABRA6* ir *RB1* genuose. Pradinė TCGA duomenų analizė taip pat nustatė apie 1500 genų su pakitusia raiška ir sugrupavo mėginius į keturis genų raiškos potipius: imuninį (angl. *immunoreactive*), diferencijuotą (angl. *differentiated*), proliferacinį (angl. *proliferative*), ir mezenchiminį (angl. *mesenchymal*). Imuninis tipas išsiskyrė T ląstelių chemokinų ligandų *CXCL11* ir *CXCL10* ir receptoriaus *CXCR3* raiška, proliferacinis: proliferacijos žymenų *MCM2*, *PCNA* ir transkripcijos veiksnių *HMGA2* ir *SOX11* raiška, diferencijuotas tipas kiaušidžių žymenų *MUC16* ir *MUC1* bei kiaušintakių žymens *SLP1* raiška, o mezenchiminis tipas pasižymėjo didele *HOX* genų ir stromos žymenų *FAP*, *ANGPTL1/2* raiška. Deja, bet pacienčių išgyvenamumas neskyrė tarp šių transkriptominių potipių. TCGA–OV analizė taip pat nustatė DNR metilinimą ir sumažėjusią raišką 168 genuose, palyginus su kiaušintakių epiteliu, kurie taip pat grupavosi į keturis potipius, kurie koreliavo su transkriptominiais potipiais. Bendrai analizuojant genų raiškos ir mutacijų rezultatus TCGA–OV identifikavo keletą reikšmingai pakitusių ląstelės signalinių kelių ir procesų, tarp jų – Notch signalinį kelią (22 % atvejų), ląstelės ciklą (34 %), ir PI3K/RAS signalinį kelią (45 % atvejų) (Bell *et al*., 2011).

1.9.1 Potencialių vėžio biožymenų atrinkimo metodai ir kiaušidžių vėžio prognostiniai modeliai

Šiuo metu TCGA turi vieną didžiausių kiaušidžių vėžio duomenų rinkinių (Bell *et al*., 2011) prieinamų mokslininkams hipotezių formavimui ir vėžio duomenų analizei. Deja, tačiau TCGA turi nedaug ne navikinių audinių duomenų, todėl dažnu atveju yra pasitelkiama kitos duomenų bazės – GTEx, kuri kaupia molekulinę informaciją iš normalių skirtingų organų audinių, duomenimis (The GTEx Consortium, 2020). GTEx duomenys suteikia alternatyvią kontrolinę grupę atvejais, kai TCGA nėra ne vėžinių audinių, kaip KV kohortos atveju (Zhu *et al*., 2022).

Turint didelius molekulinių duomenų rinkinius iškyla problema – molekulinių duomenų yra kur kas daugiau nei ištirtų mėginių, tačiau ne visi

molekuliniai duomenys yra naudingi siekiant atsakyti į pasirinktą mokslinį klausimą: šis fenomenas yra vadinamas „matmenų prakeiksmu“ (angl. *curse of dimensionality*). „Matmenų prakeiksmo“ paveiktose duomenų imtyse dažnai trūksta informacijos taškų (pvz. nėra tam tikro geno raiškos), taip pat atsiranda multikolinearumo problema – bent vienas iš biožymenų visada koreliuos su kitų biožymenų kombinacija. Biožymenų tarpusavio koreliacija trukdo suprasti jų svarbą pasirinktam efektui (pvz. išgyvenamumui) – jei bent vienas iš žymenų grupėje gali būti paaiškintas kitų žymenų išraiška, tokiu atveju prognostiniame modelyje neįmanoma atskirti, kurie iš biožymenų yra iš tiesų yra svarbūs, o kurie yra kitų žymenų išraiška. Tokiuose duomenyse modeliai taip pat turi riziką pernelyg gerai prisitaikyti duomenim, tokiu atveju pasirinktas modelis (biožymenų kombinacija) gali nebeatspindėti kitų duomenų imčių (Altman & Krzywinski, 2018). Siekiant išvengti „matmenų prakeiksmo“ yra reikalinga atlikti potencialių biožymenų atrinkimą, siekiant sumažinti analizuojamų duomenų kiekį ir atrinkti molekulinius biožymenis, kurie yra svarbūs (pvz. susiję su liga) ne dėl atsitiktinumo, o galėtų būti panaudojami kaip vėžio biožymenys. Vienas iš metodų – duomenų (biožymenų kiekio) sumažinimas (atrinkimas) ir regularizacija – koeficientų pridėjimas prie biožymenų, taip sumažinant jų efektą: L1 (LASSO) regularizacija lemia kai kurių komponentų atmetimą (pridedama absoliučių modelio komponentų suma, padauginta iš pasirinkto parametro λ), taip sumažinant kintamųjų kiekį modelyje, o L2 (angl. *ridge regression*) regularizacija sumažina kai kurių komponentų reikšmes (prideda koeficientų, pakeltų kvadratu, sumą), sumažindama jų įtaką modelyje, bet neišmesdama kaip L1 atveju. L1 ir L2 kombinacija, vadinama elastinio tinklo (angl. *elastic net*) modeliu, gali sumažinti duomenų kiekį ir pasirinkti geriausiai efektą paaiškinančius biožymenis (Herawati *et al*., 2024).

Kaip jau minėta, viena svarbiausių didelių duomenų analizės metu iškylančių problemų – galimai toks metodas tiks tik tai duomenų imčiai, kurioje buvo atrinktas (Altman & Krzywinski, 2018). Iki šiol vienas iš pagrindinių metodų, siekiant sukurti biožymenų modelį ir sumažinti galimų biožymenų (kintamųjų) kiekį, buvo panaudoti rezultatus iš kitų duomenų pvz. eksperimentinių tyrimų, remiantis literatūros ir kitų tyrimų analize, pasirinkti tam tikrą molekulinį požymį ar signalinį kelią ir ieškoti biožymenų, atrinktų pagal dalyvavimą tame molekuliniame kelyje (Pan & Ma, 2020), pvz. analizuoti genus susijusius su Notch signaliniu keliu KV atveju, nes šio kelio genų raiška eksperimentiniais metodais nustatyta pakitusi navikuose, kurie galimai turi bendrą kilmę (šiuo atveju gimdos kūno navikuose) (Lachej *et al*., 2022). Toks biožymenų pasirinkimo metodas, nors ir suteikia logišką hipotezę tolimesniems tyrimams, tačiau turi trūkumų: naudojant vieno ar kelių

„rankiniu būdu“ pasirinktų molekulinių požymių, galimai bus pasirinkti koreliuoti biožymenys (multikolinerumas), be to, tokį biožymenų modelių kūrimo algoritmą yra sunku atkartoti. Priešingai, naudojant mašininio mokymosi metodus biožymenų pasirinkimui, specifiškai LASSO algoritmą, yra pasirenkamas vienas biožymuo iš tarpusavyje koreliuotų biožymenų grupės, todėl toks modelis yra stabilesnis ir išvengiama biožymenų koreliacijos (Herawati *et al*., 2024), todėl toks modelis yra potencialiai naudingesnis, o toliau tiriant molekuliniais metodais yra taupomi resursai, nes nėra analizuojami koreliuoti biožymenys, suteikiantys tą pačią informaciją.

Remiantis TCGA ir GTEx duomenimis kuriami nauji prognostiniai KV testų modeliai dažniausiai panaudoja duomenų sumažinimo metodą pasirenkant tam tikrą genų grupę ar ląstelės procesą. **1.2 lentelėje** apibendrinti šiuo metu literatūroje aprašyti KV prognostiniai modeliai, kurie įtraukia su EMT, hipoksija, programuota ląstelės žūtimi ar genų promotorių metilinimu susijusių genų raišką.

Aptarti tyrimai rodo, jog TCGA ir kitų atviros prieigos duomenų bazėse patalpintos genetinės informacijos analizė yra racionalus metodas, leidžiantis nustatyti potencialius prognostinius ir diagnostinius biožymenis. Nors šiuose tyrimuose atrasti genai ir jų kombinacijos rodo didelį klinikinį potencialą, šių žymenų patvirtinimas realiose tiriamųjų imtyse, taikant mažiau našius, tačiau lengviau prieinamus metodus, tokius kaip kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (kPGR), yra vis dar reta.

1.2 lentelė Vėžio genomo atlaso projekte (angl. *The Cancer Genome Atlas – TCGA*) kiaušidžių vėžio duomenimis paremti biožymenų prognostiniai modeliai. NA – nėra duomenų.

Modelis	**Įtraukti biožymenys**	**AUC**	**Šaltinis**
CLOVAR (angl. *Classification of Ovarian Cancer*)	100 genų raiška, TCGA aprašyti keturi KV potipiai	NA	(Verhaak *et* al., 2013)
17 transkripcijos veiksnių modelis	*CBX5*, *CREB3*, *FOXJ1*, *FOXK2*, *IRF4*, *LHX2*, *RB1*, *SPDEF*, *STAT2*, *TBX2*, *TEAD1*, *TFAM*, *TRIM38*, *ZHX3*, *ZNF124*, *ZNF8* ir *ZXDB*	0,62–0,80	(Li *et al*., 2021)
10 su programuota mirtimi susijusių genų modelis	*PPP1R15A*, *OGG1*, *HERC1*, *CASP2*, *CAAP1*, *RB1*, *ZBP1*, *CD3E*, *CLTCL1*, *CEBPB*	0,65–0,76	(Cai *et al*., 2024)
7 su hipoksija susijusių genų modelis (HYRS)	*UQCRFS1*, *KRAS*, *KLF4*, *HOXA5*, *GMPR*, *ISG20*, *SNRPD1*	0,71–0,75	(Huang *et al*., 2023)
6 su EMT susijusių genų modelis	*TGFBI*, *SFRP1*, *COL16A1*, *THY1*, *PPIB*, *BGN*	0,71	(Pan & Ma, 2020)
10 RNR prisijungiančius baltymus koduojančių genų raiškos modelis	*C2orf15*, *MRPL46*, *ZNF239*, *MRPL14*, *ISG20*, *LUC7L2*, *SRP9*, *PARP4*, *PAPOLA*, *STRAP*	0,74	(He *et al*., 2021)
12 su hipoksija susijusių genų modelis	*CFI*, *CLDN4*, *UBB*, *TCEAL4*, *EPCAM*, *ECI2*, *SEC22B*, *MIF*, *MCM3*, *OGN*, *CXCL13*	0,72	(Sheng & Bai, 2022)
5 genų metilinimo žymenų modelis	*SLC39A14*, *PREX2*, *KCNIP2*, *CORO6*, *EFNB1* metilinimas	0,72	(Guo *et al*., 2018)
4 su genų metilinimu susijusių genų raiškos modelis	*PON3*, *MFAP4*, *BHMT2* ir *AKAP12*	0,64–0,72	(Zhou *et al*., 2021)

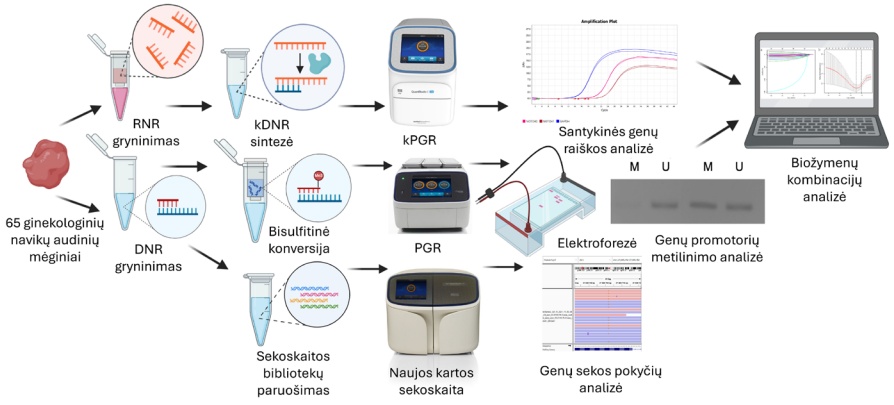
2. MEDŽIAGOS IR METODAI

Tyrimo metu viso buvo analizuojama 3 genų sekos pakitimų, 20 genų raiškos ir 4 genų promotorių metilinimo biožymenys 65–iuose ginekologinėmis ligomis sergančių pacienčių audinių mėginiuose. Tyrimas buvo padalintas į dvi dalis:

1) Remiantis literatūra ir ankstesniais moksliniais eksperimentais pasirinktų genų sekų pakitimų, genų raiškos ir genų promotorių metilinimo biožymenų analizė kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose. Pasirinkta tirti genų, koduojančių pagrindinius KV svarbių Notch ir Wnt signalinių kelių komponentus ir antro dažniausiai KV pakitusio geno *ARID1A*, koduojančio chromatino remodeliacijos veiksnio SWI/SNF struktūrinio vieneto baltymą, raišką. Taip pat pasirinkta tirti *ARID1A* ir HOX šeimai priklausančių genų *HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* promotorių metilinimo profilį ir *ARID1A*, *CTTNB1* ir *FBXW7* genų sekos pakitimus.

2) Atviros prieigos duomenų bazių analizė ir jos metu pasirinktų žymenų tyrimas kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose. Šio etapo metu naudojant statistinius metodus, laisvos prieigos duomenų bazių imtyse, atrinkti 10 su įvairiomis vėžio funkcijomis susiję genai, kurių raiška toliau analizuota KV pacienčių audiniuose.

Genų sekos pakitimai analizuoti naujos kartos sekoskaitos (NKS) metodu, genų raiškos eksperimentai atlikti taikant kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos (kPGR) metodą, o genų promotorių metilinimas įvertintas pasitelkiant metilinimui specifinės PGR reakcijos (MSP) metodą (**Pav. 2.1**). Šiame darbe analizuotų genų pavadinimai, genomo lokalizacija ir funkcijos aprašytos **2.1 lentelėje**.



Pav. 2.1 Eksperimentinių tyrimo metodų schema (sukurta su *biorender.com*)

Lentelė 2.1 Tiriamų genų pavadinimai, genominė lokacija, koduojamų baltymų funkcija, I tyrimo etapas – hipotezėmis paremtas biožymenų atrinkimas, II etapas – statistiniais metodais paremtas biožymenų atrinkimas

Nr.	Genas	Geno pavadinimas	Genominė lokacija	Funkcija ląstelėje	Tyrimo etapas	Tyrimas
1	*JAG2*	Jagged kanoninis Notch ligandas 2	14q32.33	Vienas iš Notch signalinį kelią aktyvuojančių ligandų	I etapas	Genų raiška
2	*DLL1*	Į delta panašus kanoninis Notch ligandas 1	6q27	Vienas iš Notch signalinį kelią aktyvuojančių ligandų	I etapas	Genų raiška
3	*HES1*	Hes šeimos bHLH transkripcijos veiksnys 1	3q29	Transkripcijos represorius, aktyvuojamas Notch signalinio kelio	I etapas	Genų raiška
4	*FBXW7*	F–dėžutės ir WD pasikartojimų domenus turintis baltymas 7	4q31.3	Ubikvitino baltymų ligazės komplekso subvieneto dalis	I etapas	Genų raiška, mutacijos
5	*ARID1A*	AT–gausus sąveikos domenas 1A	1p36.11	SWI/SNF chromatino remodeliacijos komplekso subvieneto dalis	I etapas	Genų raiška, promotoriaus metilinimas, mutacijos
6	*CTNNB1*	Kateninas beta 1	3p22.1	Wnt signalinio kelio pagrindinis baltymas, adherentinių jungčių dalis	I etapas	Genų raiška, mutacijos
7	*NOTCH1*	Notch receptorius 1	9q34.3	Notch signalinio kelio transmembraninis receptorius	I etapas	Genų raiška
8	*NOTCH2*	Notch receptorius 2	1p12	Notch signalinio kelio transmembraninis receptorius	I etapas	Genų raiška
9	*NOTCH3*	Notch receptorius 3	6p21.32	Notch signalinio kelio transmembraninis receptorius	I etapas	Genų raiška
10	*NOTCH4*	Notch receptorius 4	6p21.32	Notch signalinio kelio transmembraninis receptorius	I etapas	Genų raiška
11	*EXO1*	Egzonukleazė 1	1q43	5'→3' egzonukleazė ir endonukleazė, dalyvaujanti DNR replikacijoje ir DNR pažaidų reparacijoje	II etapas	Genų raiška

Lentelė 2.1 Tiriamų genų pavadinimai, genominė lokacija, koduojamų baltymų funkcija (tęsinys)

Nr.	Genas	Geno pavadinimas	Genominė lokacija	Funkcija ląstelėje	Tyrimo etapas	Tyrimas
12	*RAD50*	RAD50 dvigubos grandinės pažaidų reparacijos baltymas	5q31.1	Dalyvauja DNR dvigubos grandinės pažaidų reparacijoje	II etapas	Genų raiška
13	*PPT2*	Palmitoil–baltymų tioesterazė 2	6p21.32	Lizosomos tioesterazė	II etapas	Genų raiška
14	*LUC7L2*	Į LUC7 panašus baltymas 2, pre–iRNR splaisingo veiksnys	7q34	Splaisosomos dalis, dalyvauja iRNR splaisinge	II etapas	Genų raiška
15	*PKP3*	Plakofilinas 3	11p15.5	Jungia kadherinus prie ląstelių citoskeleto	II etapas	Genų raiška
16	*CDCA5*	Su ląstelės dalijimosi ciklu susijęs baltymas 5	11q13.1	Koduoja sororiną – baltymą, reikalingą seserinių chromatidžių kohezijai po DNR replikacijos	II etapas	Genų raiška
17	*ZFPL1*	Į cinko pirštelių baltymą panašus 1	11q13.1	Transkripcijos veiksnys, nustatomas ant goldžio aparato	II etapas	Genų raiška
18	*VPS33B*	VPS33B su vėlyvomis endosomomis ir lizosomomis asocijuotas baltymas	15q26.1	Reguliuoja lizosomos vakuolių membranas, dalyvauja baltymų rūšiavime	II etapas	Genų raiška
19	*GRB7*	Su augimo veiksnių receptoriumi susirišęs baltymas 7	17q12	Baltymas adaptorius, perduodantis signalą receptorinėms tirozino kinazėms tokioms kaip EGFR ir HER2	II etapas	Genų raiška
20	*TCEAL4*	Į transkripcijos elongacijos veiksnį A panašus baltymas 4	Xq22.2	Transkripcijos elongacijos baltymas, darantis įtaką RNR polimerazės II greičiui	II etapas	Genų raiška
21	*GAPDH*	Gliceraldehido–3–fosfato dehidrogenazė	12p13.31	Pastovios raiškos genas, koduojantis glikolizėje dalyvaujančią dehidrogenazę	I ir II etapai	Genų raiška
22	*ALX4*	ALX homeodežutės baltymas 4	11p11.2	Transkripcijos veiksnys, daugiausiai siejamas su kaulų vystymosi reguliacija	I etapas	Promotoriaus metilinimas
23	*CDX2*	Uodeginio tipo homeodėžutės baltymas 2	13q12.2	Transkripcijos veiksnys, daugiausiai siejamas su vidaus organų vystymosi reguliacija	I etapas	Promotoriaus metilinimas
24	*HOPX*	HOP homeodėžutės baltymas	4q12	Transkripcijos veiksnys	I etapas	Promotoriaus metilinimas

2.1 Tiriamoji grupė ir jos klinikiniai ir demografiniai rodikliai

Tyrimo protokolas patvirtintas Vilniaus regioninio bioetikos komiteto (Nr. 158200–18/5–988–539 pakeitimas Nr. 2). Visos pacientės sutiko dalyvauti biomedicininiame tyrime ir pasirašė sutikimą.

Tiriamieji mėginiai rinkti 2018–2021 metais Nacionaliniame Vėžio Institute, Onkoginekologijos skyriuje ir Genetinės diagnostikos laboratorijoje. Kiaušidžių audiniai buvo gauti atlikus planines gimdos ir jos priedų (kiaušidžių ir kiaušintakių) šalinimo operacijas dėl nustatyto ar įtariamo piktybinio ginekologinio naviko arba nustatytos *BRCA1/2* genų mutacijos.

Iš viso tiriamąją imtį sudarė 65 ginekologinių audinių mėginiai, iš jų 42 II tipo navikų (HGSOC), 14 kitų (ne II tipo) kiaušidžių navikų (**2.2 lentelė**) ir 9 ginekologiniai audiniai su gerybinėmis ar kitomis, nevėžinėmis, būklėmis (8 ginekologinės cistos ar gerybiniai navikai ir 1 atvejis, kai kiaušidės pašalintos prevenciškai dėl paveldimos *BRCA2* mutacijos).

Pacienčių klinikiniai demografiniai rodikliai (amžius, tarptautinės ginekologijos ir akušerijos federacijos (FIGO) stadija, naviko diferenciacijos laipsnis, serumo žymens CA125 koncentracija prieš ir po gimdos ir jos priedų šalinimo operaciją aprašyti **2.2 lentelėje.**

2.2 lentelė Klinikiniai–demografiniai rodikliai

Klinikiniai rodikliai	**Kiaušidžių vėžys**	**Moters lyties organų gerybiniai pakitimai**	**Visi mėginiai**	**p reikšmė**
n	56	9	65	
Histologinė grupė				
II tipo KV (HGSOC)	42 (75,00 %)		42 (64,62 %)	
Paribinio tipo	5 (8,93 %)		5 (7,69 %)	
Endometrioidinio tipo gimdos ir kiaušidžių navikai	3 (5,36 %)		3 (4,62 %)	
Mucininio tipo	2 (3,57 %)		2 (3,08 %)	
LGSOC	1 (1,79 %)		1 (1,54 %)	
Endometrioidinio tipo	1 (1,79 %)		1 (1,54 %)	
Šviesių ląstelių tipo	1 (1,79 %)		1 (1,54 %)	
Granulosa tipo	1 (1,79 %)		1 (1,54 %)	
Moters lyties organų gerybiniai pakitimai		9 (100,00 %)	9 (13,85 %)	

2.2 lentelė Klinikiniai–demografiniai rodikliai (tęsinys)

Klinikiniai rodikliai	Kiaušidžių vėžys	Moters lyties organų gerybiniai pakitimai	Visi mėginiai	p reikšmė
CA125 koncentracija prieš operaciją				
Normalus (< 35 U/ml)	4 (1,79 %)	4 (44,44 %)	5 (7,69 %)	
Padidėjimas (> 35 U/ml)	47 (83,93 %)	3 (33,33 %)	50 (76,92 %)	
NA[1]	8 (14,29 %)	2 (22,22 %)	10 (15,38 %)	
CA125 koncentracija po gydymo				
Normalus (< 35 U/ml)	24 (42,86%)		24 (36,92 %)	
Padidėjimas (≥ 35 U/ml)	11 (19,64%)		11 (16,92 %)	
NA	21 (37,50%)	9 (100,00 %)	30 (46,1 5%)	1
Vidutinis amžius diagnozės metu (metai, ±SD)	59,16 (±9,69)	53,67 (±9,33)	58,40 (±9,76)	0,13
Diferenciacijos laipsnis				
G1	6 (10,71 %)		7 (9,23 %)	
G3	42 (75,00 %)		42 (64,62 %)	
NA	8 (14,29 %)	9 (100 %)	17 (26,15 %)	1
FIGO stadija				
I	9 (16,07 %)		9 (13,85 %)	
II	3 (5,36 %)		3 (4,62 %)	
III	30 (53,57 %)		30 (46,15 %)	
IV	14 (25,00 %)		14 (21,54 %)	
NA		9 (100,00 %)	9 (13,85 %)	1
Bendro išgyvenamumo mediana (mėnesiais, min−max)	47 (1−82)	70 (59−70)	47 (1−82)	0,14
Mirties statusas				
Mirę	19 (33,93 %)		19 (29,23 %)	
Gyvos	36 (64,28 %)	3 (33,33 %)	39 (60,00 %)	
NA	1 (1,79 %)	6 (66,67 %)	7 (10,77 %)	0,54

[1] Nėra informacijos

2.2 Nukleorūgščių gryninimas

Ginekologiniai audiniai nukleorūgščių skyrimui pirmiausia buvo homogenizuoti trintuvėje, atvėsintoje skystu azotu. Apie 20 mg audinio padalinta į du mėgintuvėlius genominės DNR ir visuminės RNR skyrimui.

RNR skyrimas buvo vykdomas *TRIzol Reagent* (*Invitrogen*, *Thermo Fisher Scientific (TFS)*, *Carlsbad*, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas. RNR yra džiovinama kambario temperatūroje ir galiausiai ištirpinama 30 µl vandens be RNAzių inkubuojant 55 °C 10 min.

DNR skyrimas vykdomas standartiniu fenolio–chloroformo metodu. Apie 10 mg audinio yra homogenizuojama su 500 µl audinių lizės buferio sudaryto iš 50 mM Tris–HCl, pH 8,5; 1 mM EDTA; 0,5 % Tween–20 (*Carl Roth*, *Karlsruhe*, Vokietija) ir inkubuojama 1 valandą 55 ºC termopurtyklėje (TS–100C, *Biosan*, Ryga, Latvija) maišant 500 *rpm* (apsisukimų per minutę, angl. *revolutions per minute – rpm*), papildžius lizės buferį 20 µl proteinazės K (20 mg/ml, *Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva) inkubuojama 16 valandų 55 ºC, 400 *rpm*. Įvykus audinių lizei, įdedama 500 µl fenolio / chloroformo / izoamilo alkoholio (25 : 24 : 1) mišinio (*Carl Roth*, *Karlsruhe*, Vokietija), mėginiai sumaišomi ir centrifuguojami 14 000 *rpm*, 20 minučių, kambario temperatūroje. Susidaręs vandens sluoksnis nusiurbiamas į naujus mėgintuvėlius, procedūra kartojama kol nelieka balsvo baltymų sluoksnio, tada įpilama 500 µl chloroformo (*Carl Roth*, *Karlsruhe*, Vokietija), trumpai vorteksuojama ir centrifuguojama 14 000 *rpm*, 20 minučių, kambario temperatūroje. Po centrifugavimo nusiurbiama viršutinė frakcija, į kuria dedama 40 µl amonio acetato (5 M, *Honeywell Fluka*, *Fisher Scientific*, *Loughborough*, UK*)*, 1 ml 96 % etanolio (atvėsinto –20 °C) ir 1,5 ml glikogeno (20 mg/ml koncentracijos, *Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva). Mišinys yra inkubuojamas 1 valandą –20 ºC temperatūroje, tada centrifuguojamas 14 000 *rpm*, 20 minučių, kambario temperatūroje. Pašalinamas supernatantas, nusėdusi DNR yra plaunama 500 µl atvėsinto 70 % etanolio centrifuguojant 14 000 *rpm*, 10 minučių, kambario temperatūroje. Supernatantas vėl pašalinamas ir nuosėdos yra džiovinamos 45 ºC 10 min arba kol pilnai išdžius. DNR yra tirpinama 40 µl vandens be nukleazių (*Thermo Scientific,* Vilnius, Lietuva) 1 valandą kambario temperatūroje.

Nukleorūgščių koncentracija ir kokybė yra analizuojama spektrofotometru *Nanodrop 2000* (*Thermo Scientific*, *Wilmington*, JAV) ir saugoma –80 °C iki tolimesnių tyrimų.

2.3 Genų sekų pakitimų tyrimas

Genų *ARID1A*, *CTNNB1* ir *FBXW7* sekos pakitimai buvo analizuojami 50 kiaušidžių audinių imtyje: 32 HGSOC, 9 kitų KV atvejų ir 9 gerybinių kiaušidžių pakitimų atvejų audiniuose. DNR, išgryninta iš audinių, panaudota sekoskaitos bibliotekų ruošimui *Ion AmpliSeq Library Kit Plus* (*Life Technologies*, *Carlsbad*, Kalifornija, JAV) rinkiniu laikantis reagentų gamintojų rekomendacijų. DNR kiekis papildomai įvertintas *Qubit dsDNA HS Assay kit* (*Invitrogen*, *Eugene*, Oregonas, JAV) rinkiniu ir *Qubit 3* fluorometru (*Life Technologies*, Singapūras). Sekoskaitai naudojama 10 ng/µl DNR. Siekiant analizuoti tik pasirinktus genus, prieš ruošiant sekoskaitos bibliotekas reikalingos genų sekos pagausintos naudojant *AmpliSeq HiFi Master Mix* (*Life Technologies*, *Carlsbad*, Kalifornija, JAV) PGR mišinį ir specialiai tyrimui pritaikytą *Ion AmpliSeq Custom DNA Panel* (*Life Technologies*, *Carlsbad*, Kalifornija, JAV) pradmenų rinkinį. Paruoštos sekoskaitos bibliotekos įvertintos naudojant *Ion Library TaqMan Quantitation Kit* (*Applied Biosystems,* Vilnius, Lietuva) PGR rinkinį, skirtą įvertinti bibliotekų kiekį. Sekoskaitos bibliotekos baigiamos ruošti ir užnešamos ant *Ion 530* sekoskaitos lustų *Ion Chef* (*Ion Torrent,* Singapūras) sistemoje naudojant *Ion 520 & Ion 530 Kit* (*Life Technologies*, *Carlsbad*, Kalifornija, JAV) reagentus, laikantis aparato ir reagentų gamintojų instrukcijų. Toliau lustai perkeliami į *Ion S5* (*Ion Torrent*, Singapūras) sekvenatorių puslaidininkių sekoskaitai. Kiekvieno genetinio pakitimo padengimas sekoskaitos metu ≥ 500 kartų.

Sekoskaitos metu nustatyti genų pakitimai analizuojami *Ion Reporter Software* (versija 5.16.0.2) programine įranga. Pakitimai verifikuojami *Integrative Genomics Viewer* (IGV, versija 2.6.3) įrankiu pagal GRCh37 / hg19 referentinę žmogaus genomo seką. Pakitimai klasifikuoti kaip kliniškai reikšmingi, jei ClinVar klinikinėje genetinių pakitimų duomenų bazėje yra įvardinti kaip patogeniniai. Pakitimai, neaprašyti ClinVar duomenų bazėje laikomi neaiškaus patogeniškumo (VUS – angl. *variant uncertain significance*).

2.4 Genų raiškos profilio tyrimas

Genų raiškos profilio tyrimas buvo vykdomas dviem etapais: pirmiausia atlikta komplementarios DNR (kDNR) sintezė, vėliau – kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (kPGR). 0,5 µg RNR panaudota kDNR sintezei. Prieš atliekant atvirkštinės transkriptazės reakciją, RNR buvo išvalyta nuo DNR naudojant *DNase I, RNase–free* (*Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva) DNazę ir jos buferį (su $MgCl_2$) veikiant 37 ºC 30 min, po to

išaktyvuojant 1 µl EDTA (50 mM, *Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva) veikiant 65 ºC 10 min. Atvirkštinės transkripcijos reakcija vykdoma naudojantis reagentais iš *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT–qPCR* rinkinio (*Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva) pagal reagentų gamintojų rekomendacijas *ProFlex PCR System* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*, Singapūras) PGR aparate. Paruošta kDNR saugoma –80 °C iki kPGR reakcijos.

Genų raiškos santykinis lygis nustatomas kPGR reakcija naudojantis *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), ROX Solution provided* (*Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva) reagentus ir *Metabion* (*Planegg*, Vokietija) pradmenis, *QuantStudio 5 Real–Time PCR System* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*¸ Singapūras) kPGR aparate remiantis reagentų ir kPGR aparato tiekėjų rekomendacijomis (**lentelės 2.3 ir 2.4**). Reakcijoms naudotų pradmenų sekos nurodytos **priedų lentelėje 1**. Kiekvienai kPGR reakcijai atliktos naudotos kontrolės: RT– (kDNR sintezės reakcijos kontroles, kurių metu neįdėta kDNR sintezės fermentų) ir taršos (angl. *no template control – NTC*) kontrolę, kurios metu vietoje kDNR įdedama benukleazio vandens. Kiekvienas kPGR geno raiškos tyrimas atliktas dviem techniniais pakartojimais, kurių slenkstinio ciklo (Ct) reikšmių vidurkis panaudotas tolesniam normalizavimui. Santykinė genų raiška gauta normalizuojant tikslinių genų Ct vertes pagal kontrolinio geno *GAPDH* Ct vertes, taikant $\log_2 2^{-\Delta Ct}$ formulę. Šios reikšmės toliau naudotos statistinei analizei.

2.3 Lentelė kPGR reakcijos mišinio sudėtis vienai reakcijai

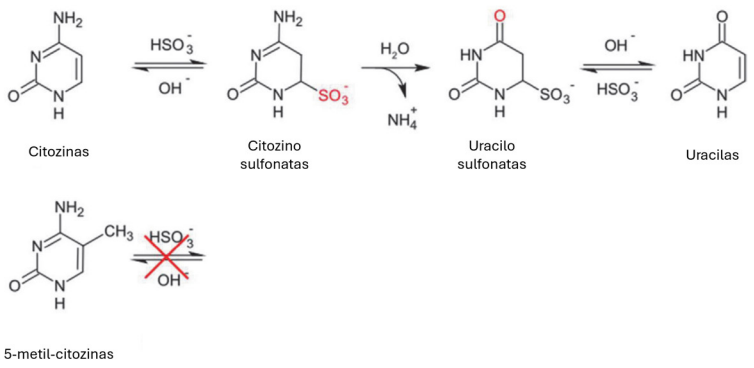
Reagentai	**Tūris, µl**	**Galutinė koncentracija**
Maxima SYBR Green qPRC Master Mix	12,5	1×
10 µM pradmenys	Po 0,75	Po 0,3 µM
ROX pasyvus referentinis dažas	0,05	10 nM
Vanduo be nukleazių	8,95	iki 25 µl
kDNR	2	~50 ng

2.4 Lentelė kPGR reakcijos sąlygos

Etapas	**Temperatūra, °C**	**Trukmė**	**Ciklų skaičius**
Pradinė denatūracija	95	10 min	1
Denatūracija	95	15 s	40
Hibridizacija ir grandinės ilginimas	60	60 s	
Lydymosi kreivės sudarymas	95	15 s	1
	60	60 s	
	95	30 s	
	60	15 s	

2.5 Genų promotorių metilinimo statuso tyrimas

Kiaušidžių audinių DNR panaudota *HOPX*, *ALX4*, *CDX2* ir *ARID1A* genų promotorių metilinimo statuso analizei metilinimui specifinės PGR reakcijos metodu (MSP). Šis metodas leidžia greitai ir pigiai įvertinti DNR metilinimo statusą padauginant DNR. MSP metode yra naudojamos dvi poros specifinių pradmenų, kurių taikiniai yra metilinta arba nemetilinta DNR seka (pradmenų sekos nurodytos **priedų lentelėje 2**). Prieš atliekant MSP, DNR turi būti modifikuota bisulfitinės konversijos reakcija, kurios metu nemetilinti citozinai yra paverčiami uracilu, išsaugant metilintus citozinus DNR molekulėje, todėl jie gali būti MSP metu atskirti nuo nemetilintų citozinų (Humardani *et al*., 2023) (**Pav. 2.2**).



Pav. 2.2 Bisulfitinės modifikacijos mechanizmas, leidžiantis PGR metu atskirti metilintus citozinus nuo nemetilintų (adaptuota iš Saini *et al*., 2023)

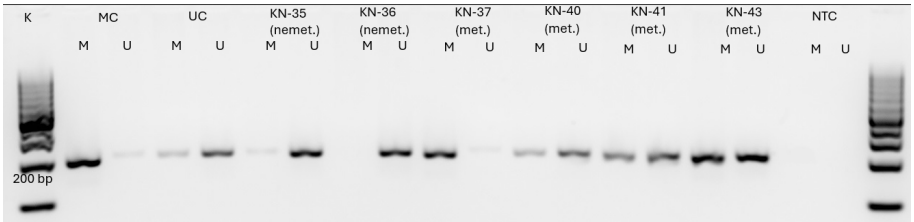
DNR bisulfitinės modifikacijos reakcija buvo atliekama naudojant *EZ DNA Methylation kit* (*Zymo Research*, *Irvine*, Kalifornija, JAV) rinkinį, laikantis reagentų gamintojų instrukcijų. Modifikuota DNR saugoma –20 °C iki MSP reakcijos. MSP atliekama naudojant *Phusion U Hot Start DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva) polimerazės rinkinį, pagal reagentų gamintojo nurodymus. MSP reakcijos buvo atliekamos *ProFlex PCR System* (*Applied Biosystems*, *Thermo Fisher Scientific*, Singapūras) PGR aparate.

MSP pradmenys pasirinkti literatūros analizės metu arba *HOPX* geno atveju – sukurti su *Methyl Primer ExpressTM Software v1.0 (Applied Biosystems*, *Forster city*, Kalifornija, JAV) programa. Pradmenys pasirinkti pagal (ne)sudaromas antrines struktūras, analizuojamas naudojantis *Multiple primer analyzer* (https://www.thermofisher.com/lt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html) įrankiu, bei pradmenų prisilydymo temperatūrą, apskaičiuotą naudojantis *Tm Calculator* įrankiu (https://www.thermofisher.com/lt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html). MSP reakcijos sąlygos ir pradmenų prisilydymo temperatūra nurodyta **lentelėje 2.5**. Kiekvienai reakcijai naudojama teigiama metilintos DNR kontrolė: modifikuota metilinta DNR *CpG Methylated Human Genomic DNA* (*Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva), nemetilintos DNR kontrolė: modifikuotas penkių sveikų asmenų leukocitų DNR mišinys, o vanduo be nukleazių (*Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva) naudotas kaip taršos kontrolė (NTC).

2.5 Lentelė MSP reakcijos sąlygos

Etapas	**Temperatūra**	**Trukmė**	**Ciklų skaičius**
Pradinė denatūracija	98 °C	30 s	1
Denatūracija	98 °C	10 s	35
Hibridizacija	*ALX4* 60 °C *CDX2* 58 °C *HOPX* 62 °C *ARID1A* 60 °C	30 s	
Grandinės ilginimas	72 °C	30 s	
Galutinis grandinės ilginimas	72 °C	7 min	1
Inkubacija	4 °C	∞	

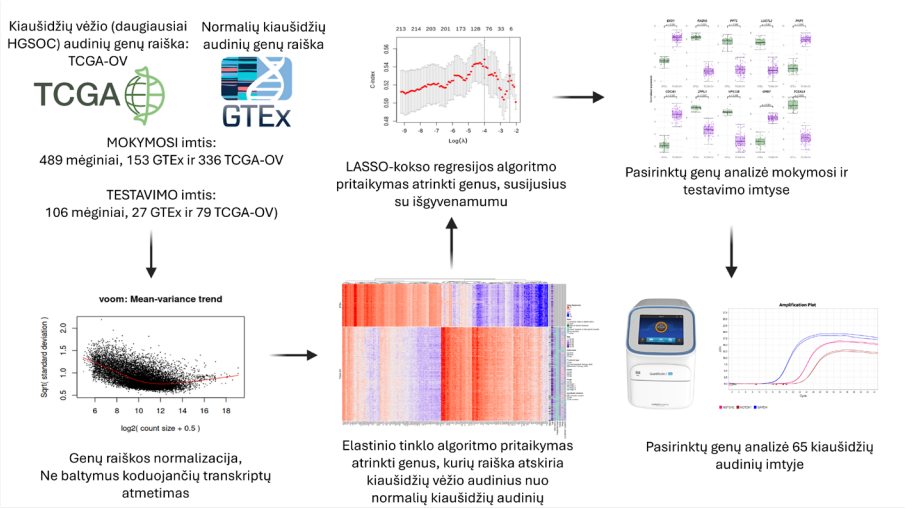
PGR produktai analizuojami elektroforezės metodu: naudojamas 3 % agarozės gelis (*Carl Roth, Karlsruhe,* Vokietija) ir 1× TAE buferis (*Thermo Scientific,* Vilnius, Lietuva). Geliam vizualizuoti naudojamas etidžio bromidas (galutinė koncentracija 0,6 µg/ml, *Carl Roth*, *Karlsruhe*, Vokietija), į gelius užnešami 6 µl PGR produkto, sumaišyto 1 µl su 6 × *TriTrack* DNR užnešimo dažu (*Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva). Elektroforezė atliekama naudojant ~200 V įtampą, 30 min, *Owl EasyCast B2 mini gel horizontal electrophoresis system* (*Thermo Fisher Scientific*, *Waltham*, *Massachusetts*, JAV) vonelėje naudojant *Owl EC-105 Electrophoresis Power Supply* (*Thermo Fisher Scientific*, *Marietta*, *Ohio*, JAV) srovės šaltinį. PGR produktai palyginami su *GeneRuler 100 bp DNA ladder* (*Thermo Scientific*, Vilnius, Lietuva) DNR ilgio standartu. Geliai vizualizuoti *UVP ChemStudio* (*Analytic Jena*, *Jena*, Vokietija) vaizdinimo sistema. KV audinių mėginiai, kurių MSP reakcijos su metilintais pradmenimis metu DNR buvo padauginta – buvo laikomi metilintais, o kuriuose produktai gauti tik su nemetilintais pradmenimis – nemetilintais (**Pav. 2.3**).



Pav. 2.3 Invertuota elektroforezės nuotrauka – MSP reakcijos rezultatų vertinimo pavyzdys. *CDX2* geno promotoriaus metilinimo tyrimo pavyzdys. K – DNR ilgio standartas, MC – metilintos DNR kontrolė (angl. *methylated control*), UC – nemetilintos DNR kontrolė (angl. *unmethylated control*), nemet. – nemetilintas promotorius, met. – metilintas promotorius, NTC – užterštumo kontrolė (angl. *no template control*)

2.6 Vėžio genomo atlaso ir Genotipo – audinio raiškos projektų kiaušidžių audinių duomenų analizė

Antrosios tyrimo metu buvo analizuojami genų raiškos (RNR sekoskaitos) duomenys iš TCGA KV tyrimo (TCGA–OV) ir GTEx kiaušidžių audinių tyrimo imties. Siekiant atrinkti potencialius diagnostinius KV biožymenis, buvo taikomas elastinio tinklo algoritmas, o galutiniai biožymenys pasirinkti pagal sąsajas su išgyvenamumu taikant LASSO–kokso algoritmą. Atrinkti 10 genų raiškos biožymenų toliau tirti kPGR metodu kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audinių imtyje (**Pav. 2.4**).



Pav. 2.4 Tyrimo schema: biožymenų parinkimas pagal statistinę laisvos prieigos duomenų bazių duomenų analizę ir jų patvirtinimas kiaušidžių audinių mėginiuose

TCGA–OV projekto RNR sekoskaitos *STAR-counts* duomenys parsisiųsti naudojantis R programos (versija 4.3.1, *R foundation for statistical computing*, Viena, Austrija) paketu *TCGAbiolinks* (versija 2.29.6), o klinikiniai duomenys paketu *UCSCXenaTools* (versija 1.4.8) (**Lentelė 2.6**). Ne navikinių kiaušidžių audinių duomenys iš parsisiųsti iš GTEx duomenų bazės (GTEx analizė *V8*, *dbGaP Accession phs000424.v8.p2*, *RNA counts*) RNR sekoskaitos duomenys parsisiųsti iš portalo https://www.gtexportal.org/home/datasets. Visi duomenys parsisiųsti 2023-08-21. Bendrai TCGA–OV imtį sudarė 416 kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audinių RNR sekoskaitos rezultatai, o GTEx – 180 moterų kiaušidžių RNR sekoskoskaitos rezultatai. Abiejose imtyse buvo prieinama 56156 genų raiška, iš jų remiantis *biomaRt* (versija 2.56.1) paketu pasirinkti 19197 baltymus koduojantys genai. Šių genų raiška normalizuota *GDCRNATools* (versija 1.20.1) ir *voom* normalizacija (*limma* paketas versija 3.562), po išskirčių šalinimo liko 13681 genai tinkami tolimesnei analizei. Kiaušidžių audinių imtis padalinta santykiu 80:20 į mokymosi (489 mėginiai, 153 GTEx ir 336 TCGA–OV) ir testavimo (106 mėginiai, 27 GTEx ir 79 TCGA–OV) imtis. Klinikiniai TCGA–OV duomenys nurodyti **2.6 lentelėje**. GTEx kiaušidžių imtis buvo aprašyta pagal amžių, kuris nurodytas **2.7 lentelėje**.

2.6 Lentelė TCGA–OV imties klinikiniai–demografiniai rodikliai

Klinikinis rodiklis	TCGA–OV mokymosi imtis (%)	TCGA–OV testavimo imtis (%)	Visa TCGA–OV imtis (%)
n	336	79	416
Vidutinis amžius diagnozės metu ± SD	60,75 ± 11.54	58,49 ± 10.40	60,31 ± 11.34
FIGO stadija			
I	1 (0,30)	0	1 (0,24)
II	19 (5,65)	5 (6,33)	24 (5,77)
III	259 (77,08)	66 (83,54)	326 (78,37)
IV	56 (16,67)	7 (8,86)	63 (15,14)
Naviko diferenciacijos laipsnis			
G2	32 (10,71)	10 (12,66)	46 (11,06)
G3	291 (86,61)	65 (82,28)	357 (85,82)
NA	9 (2,68)	4 (5,06)	13 (3,13)
Mirties statusas			
Mirę	208 (61,90)	49 (62,03)	257 (61,78)
Gyvos	128 (38,10)	30 (37,97)	159 (38,22)
Limfovaskulinė invazija			
Nėra invazijos	46 (13,69)	10 (12,66)	56 (13,46)
Invazija	89 (26,49)	16 (20,25)	105 (25,24)
NA	201 (59,82)	53 (67,09)	225 (61,30)
Likutinis navikas			
Nėra makroskopiškai matomo likutinio naviko	63 (18,75)	12 (15,19)	75 (18,03)
1-10 mm	160 (47,62)	33 (41,77)	193 (46,39)
11-20 mm	22 (6,55)	5 (6,33)	27 (6,49)
>20 mm	58 (17,26)	17 (21,52)	75 (18,03)
NA	33 (9,82)	12 (15,19)	46 (11,06)

2.7 Lentelė TCGA–OV ir GTEx imties amžiaus intervalai

Klinikinis rodiklis	TCGA–OV mokymosi imtis (%)	TCGA–OV testavimo imtis (%)	GTEx mokymosi imtis (%)	GTEx testavimo imtis (%)
n	336	79	153	27
Amžiaus intervalas, metais				
20 – 29	-	-	22 (14,38)	-
30 – 39	6 (1,79)	1 (1,27)	12 (7,84)	2 (7,41)
40 – 49	62 (18,45)	16 (20,25)	30 (19,61)	7 (25,93)
50 – 59	100 (29,77)	32 (30,51)	48 (31,37)	13 (48,15)
60 − 69	84 (25,00)	16 (20,25)	38 (24,84)	4 (14,82)
70 – 79	66 (19,64)	11 (13,92)	3 (1,96)	1 (3,70)
NA	18 (5,36)	3 (3,80)	-	0

KV mėginius nuo sveikų kiaušidžių audinių atskiriantys genai buvo pasirinkti mokymosi imtį analizuojant pasitelkiant Elastinio tinklo algoritmą iš *glmnet* (versija 4.1-8) paketo, panaudojant $\alpha = 0,5$. Toks regresijos algoritmas sujungia *Ridge* regresiją (L2 regularizaciją, kuri mažina visų koeficientų reikšmes, kas yra svarbu modelio stabilumui, kai yra daug koreliuotų kintamųjų) ir *LASSO* regresiją (L1 regularizaciją, kuri kai kuriuos koeficientus paverčia 0, taip vykdant kintamųjų atranką). Algoritmo pasirinktų genų sąrašas toliau analizuotas pasitelkiant genų ontologijos (angl. *gene ontology* – GO) analizę iš *clusterProfiler* (versija 4.8.3) paketo, pasirenkant genų aprašymus kurių pakoreguota p reikšmė <0,05.

Elastinio tinklo modelio atrinkti genai toliau buvo analizuojami 336 TCGA–OV mėginiuose iš mokymosi imties pritaikius LASSO–kokso (angl. *LASSO–Cox*) modelį, siekiant atrinkti genus, kurie geriausiai prognozuoja kiaušidžių vėžio pacienčių išgyvenamumą. Modeliui pritaikius $\lambda = 0,088$ gautas 10 genų sąrašas, kuris toliau patvirtintas testavimo imtyje ir AT–kPGR (atvirkštinės transkriptazės – kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos) eksperimentais Lietuvoje gydytų pacienčių kiaušidžių audinių imtyje.

Genų raiškos išgyvenamumo rizikos modelis apjungtas į bendrą rizikos balą pasitelkiant formulę $\sum_i^{10} geno\ raiška_i * \beta_i$, kur *i* yra pasirinkti genai, o β – jų koeficientai iš LASSO–kokso modelio. Bendram išgyvenamumui įvertinti yra naudojamas *Kaplan–Meier* kreivės, o logranginis kriterijus (angl. *log-rank test*) naudojamas palyginti kreivėms, analizę atliekant naudojantis *survival* paketu (versija 3.5.7). Įvertinti kaip biožymenys nuspėja (prognozuoja) išgyvenamumą iki tam tikro laiko naudojama nuo laiko priklausoma ROC analizė iš *survivalROC* (versija 1.0.3.1) paketo. Su visais

biožymenų parinkimo analizės skriptais galima susipažinti https://github.com/ieva-vaic/TCGA-OV-RISK-PROJECT.

2.7 Statistinė analizė

Duomenų saugojimui ir tvarkymui buvo naudojama *Microsoft Excel* (versija 2502) programa. Statistinė analizė ir rezultatų vizualizavimas atliktas R programa (versija 4.3.1, *R foundation for statistical computing*, Viena, Austrija). Pagrindiniai naudoti R paketai: duomenų vizualizacijai *ComplexHeatmap* (versija 2.16.0) ir *ggplot2* (versija 3.5.1), ROC analizei *pROC* (versija 1.18.5), regresinei analizei *glmnet* (versija 4.1–8). Visi statistinės analizės skriptai patalpinti https://github.com/ieva-vaic/KN-DISSERTATION.

Tolygių duomenų normalumui patikrinti naudotas Šapiro−Vilko (angl. *Shapiro–Wilk*) kriterijus, o duomenų variacijai patikrinti: F kriterijus (angl. *F test*) arba Leveno kriterijus daugiau nei dviem grupėm. Normaliai pasiskirsčiusiems duomenims naudojamas neporinis t testas arba Velčo t kriterijus (angl. *Welch's t–test*) (jei duomenų pasiskirstymas nevienodas), o nenormaliai pasiskirsčiusiems duomenims Vilkoksono kriterijus (angl. *Wilcoxon rank sum test*, dar žinomas kaip *Mann−Whitney test*). Dėl mažų imčių kategoriniams duomenims naudojamas tikslusis F (*Fisher'io*) testas. Daugiau nei dviejų grupių tolygių duomenų palyginimui naudojama ANOVA (angl. *analysis of variance*) metodas arba *Kruskal−Wallis* testas nenormaliai pasiskirsčiusiems duomenims. Atitinkamai, nustačius patikimą skirtumą tarp kelių grupių, taikomi *post–hoc* kriterijai kelių grupių palyginimui tarpusavyje: *Tuckey HSD* (angl. *honestly significant difference*) kriterijus normaliai pasiskirsčiusiems duomenims ir *Dunn* kriterijus nenormaliai pasiskirsčiusiems duomenims. Koreliacinei analizei tolygiems normaliems arba nenormaliai pasiskirsčiusiems duomenims naudojami atitinkamai *Pearson'o* arba *Spearman'o* koreliacijos koeficientai. Visais atvejais laikoma, jog testo reikšmė patikima, kai $p \leq 0{,}05$. P reikšmės pakoreguotos remiantis *Benjaminit* ir *Hochberg* metodu (Benjaminit & Hochberg, 1995).

Potencialių žymenų ar jų kombinacijų modelių (sudarytų pagal logistinę regresiją) diagnostinis potencialas (jautrumo ir specifiškumo ryšys) tikrinamas ROC (angl. *received operating characteristic – ROC*) kreive. ROC kreivės palyginamos pagal plotą po kreive (angl. *area under the curve* – AUC), kreivės lyginamos *DeLong'o* arba *bootstrap* kriterijais, priklausomai nuo kreivių krypčių suderinamumo. Taip pat kiekvienam biožymeniui ar jų kombinacijų modeliui skaičiuojami parametrai:

1. jautrumas – parodantis tikimybę, kad sergančio asmens testo rezultatas teigiamas,

2. specifiškumas – parodantis tikimybę, kad nesergančiam asmeniui testo rezultatas bus neigiamas,

3. tikslumas (angl. *accuracy*) – nusakantis visų teisingai nustatytų atvejų proporciją palyginus su visais atvejais,

Šie diagnostinio modelio rodikliai apskaičiuojami pagal dažnių lenteles (**2.8 lentelė**). ROC kreivės kritinis taškas (slenkstinė vertė) parenkamas pagal jautrumą ir specifiškumą remiantis *Younden'o* kriterijumi.

2.8 lentelė Modelio rodiklių apskaičiavimas naudojantis dažnių lentele

	Serga (angl. *Actually positive*)	**Neserga (angl. *Actually negative*)**
Testas teigiamas (angl. *Predicted positive*)	Teisingai teigiamas (angl. *True positive* – **tp**)	Neteisingai teigiamas (angl. *False positive* – **fp**)
Testas neigiamas (angl. *Predicted negative*)	Neteisingai neigiamas (angl. *False negative* – **fn**)	Teisingai neigiamas (angl. *True negative* – **tn**)

Jautrumas = tp / (tp + fn)
Specifiškumas = tn / (tn +fp)
Tikslumas = (tp + tn) / bendras atvejų skaičius

Žymenų ir jų kombinacijų sąsaja su bendru išgyvenamumu vertinama pagal *Kaplan–Meier* kreivės remiantis logranginiu kriterijumi bei vienmačiais ir daugiamačiais Kokso regresijos modeliais. Žymenų kombinacijos sudaromos pagal formulę $\sum_i^n geno\ raiška_i * \beta_i$, kur i yra pasirinkti genai, o β – jų koeficientai iš daugiamačio Kokso regresijos modelio. Biožymenų ir jų kombinacijų gebėjimas prognozuoti 5−kerių metų išgyvenamumą vertinamas nuo laiko priklausoma ROC analize, atsižvelgiant į žymenų plotą po kreive (AUC), jautrumą ir specifiškumą.

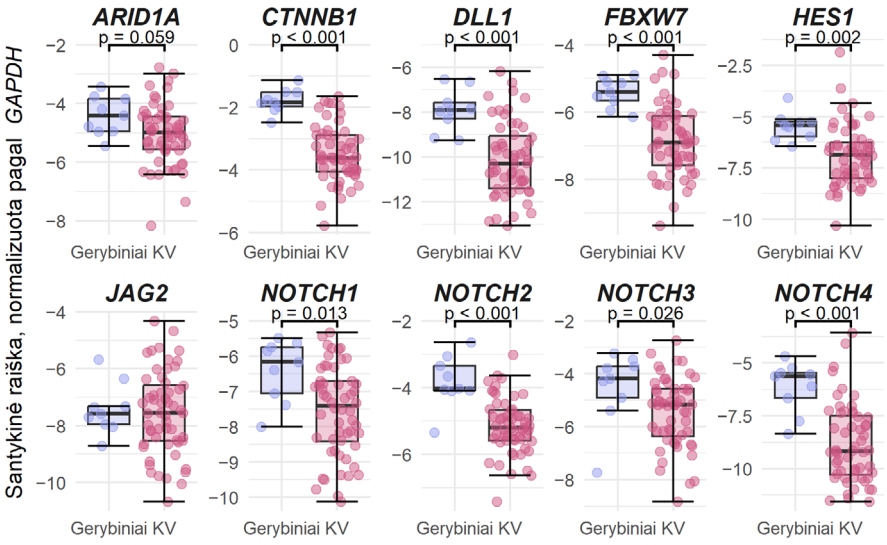
3. REZULTATAI

3.1 Su Notch, Wnt ir chromatino remodeliacija susijusių genų raiškos bei genų sekų, *ARID1A* ir HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso tyrimas kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose

3.1.1 Su Notch, Wnt ir chromatino remodeliacija susijusių genų raiškos analizė kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose

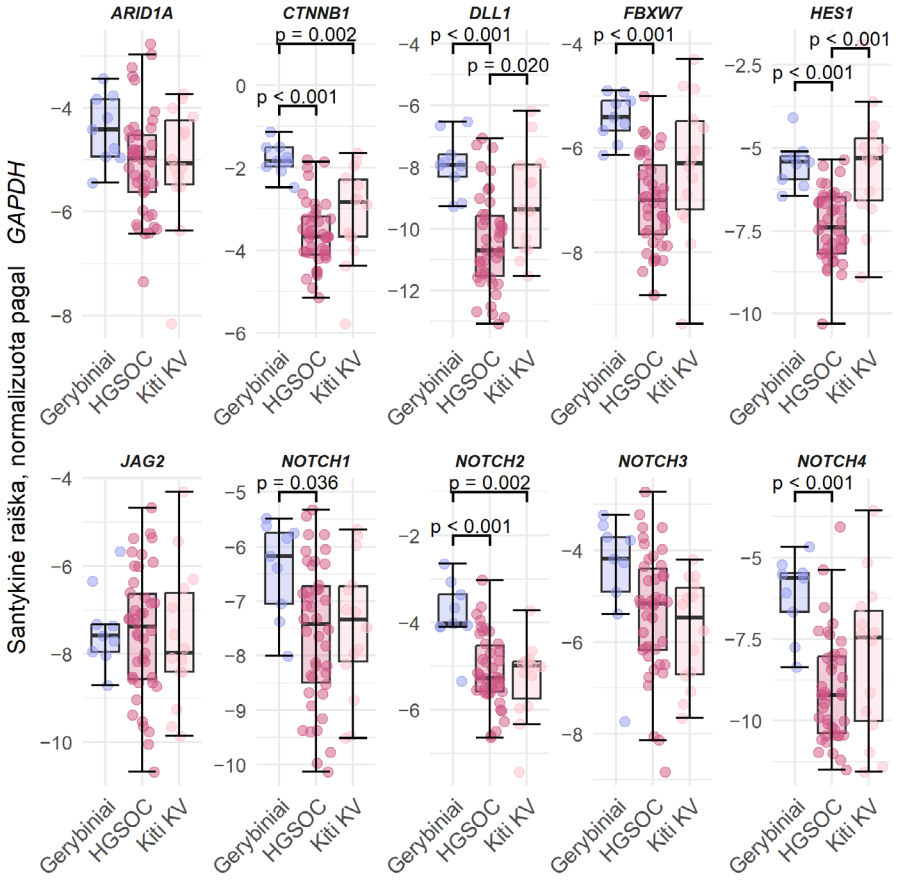
Atlikus ankstesnių tyrimų ir literatūros analizę pasirinkta tirti Notch ir Wnt signalinių kelių komponentų ir SWI/SNF chromatino remodeliacijos veiksnio struktūrinio subvieneto baltymą ARID1A koduojančių genų raišką. Iš viso tirti 7 Notch signalinio kelio genai: receptorių *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4,* jų ligandų *DLL1* ir *JAG2*, bei taikinio *HES1* raiška. Wnt signalinio kelio genams priklausė β–kateniną koduojančio geno *CTNNB1* ir jo ubikvitino kinazę koduojančio geno *FBXW7* transkriptai.

Palyginus KV atvejus su gerybinių pakitimų audiniais, 8 / 10 analizuotų genų raiška buvo statistiškai patikimai ($p \leq 0{,}03$, logoritmuotas skirtumas kartais (log_2SK, angl. log_2 *fold change*) $\leq -0{,}90$) sumažėjusi KV pacienčių audiniuose, tačiau *ARID1A* geno raiškos skirtumas rodė tendenciją ($p = 0{,}06$), o vienintelio *JAG2* geno raiška statistiškai patikimai nesiskyrė tarp šių grupių (**Pav. 3.1**).



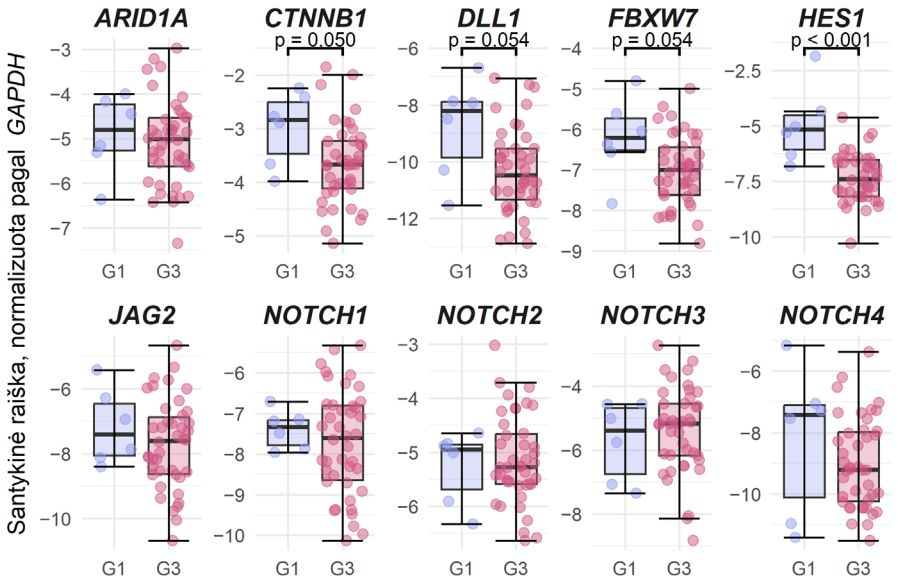
Pav. 3.1 Notch, Wnt signalinių kelių ir *ARID1A* genų raiška kiaušidžių vėžio (KV) bei gerybinių pakitimų audiniuose

HGSOC tiriamųjų grupėje, palyginus su gerybinių pakitimų audiniais, statistiškai patikimas raiškos skirtumas nustatytas 7 / 10 tirtų genų, visais atvejais nustatytas raiškos sumažėjimas. Didžiausias skirtumas ($log_2SK = – 1,90$) nustatytas *CTNNB1* geno atveju ($p < 0,001$). Tarp HGSOC ir gerybinių pakitimų grupių statistiškai patikimo skirtumo nebuvo nustatyta tik *JAG2*, *NOTCH3* ir *ARID1A* atvejais ($p > 0,05$). Notch signalinio kelio genų *DLL1* ir *HES1* raiška taip pat skyrėsi ir palyginus HGSOC su kitų KV navikų grupe (log_2SK atitinkamai –1,31 ir –2,12, $p \leq 0,02$). Palyginus šiuos ne HGSOC tipo navikus su gerybinių pakitimų audiniais buvo nustatytas statistiškai patikimas *NOTCH2* ir *CTNNB1* genų raiškos sumažėjimas (atitinkamai $log_2SK = –1,30$ ir –1,12, $p = 0,002$) (**Pav. 3.2**).



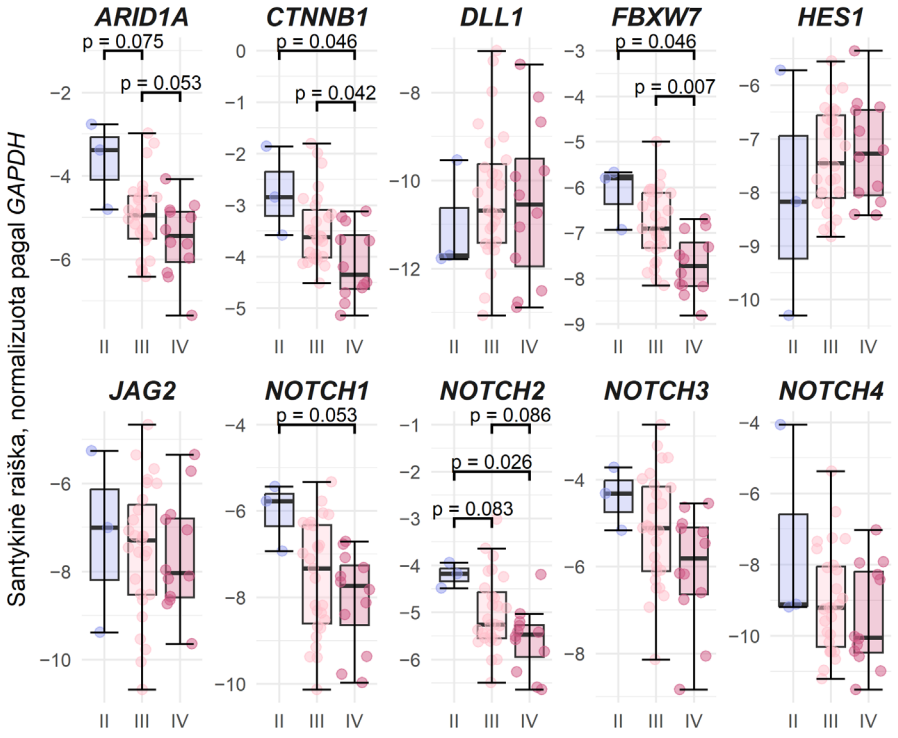
Pav. 3.2 Notch, Wnt signalinių kelių ir *ARID1A* genų raiška aukšto piktybiškumo laipsnio serozinių kiaušidžių navikų (HGSOC), ne HGSOC tipo (kitų KV) ir gerybinių pakitimų audiniuose

Vertinant genų raiškos sąsajas su klinikiniais pacienčių rodikliais, buvo pastebėta *HES1* ir *CTNNB1* genų raiškos sąsaja su KV pacienčių navikų diferenciacijos laipsniu (*HES1* $\log_2$SK = –2,39, p < 0,001 ir *CTNNB1* $\log_2$SK = –0,65, p = 0,05). Taip pat nustatyta *DLL1* ir *FBXW7* genų raiškos sąsaja su naviko diferenciacijos laipsniu tendencija (atitinkamai $\log_2$SK = – 1,50 ir –0,81, p = 0,054) (**Pav. 3.3**).



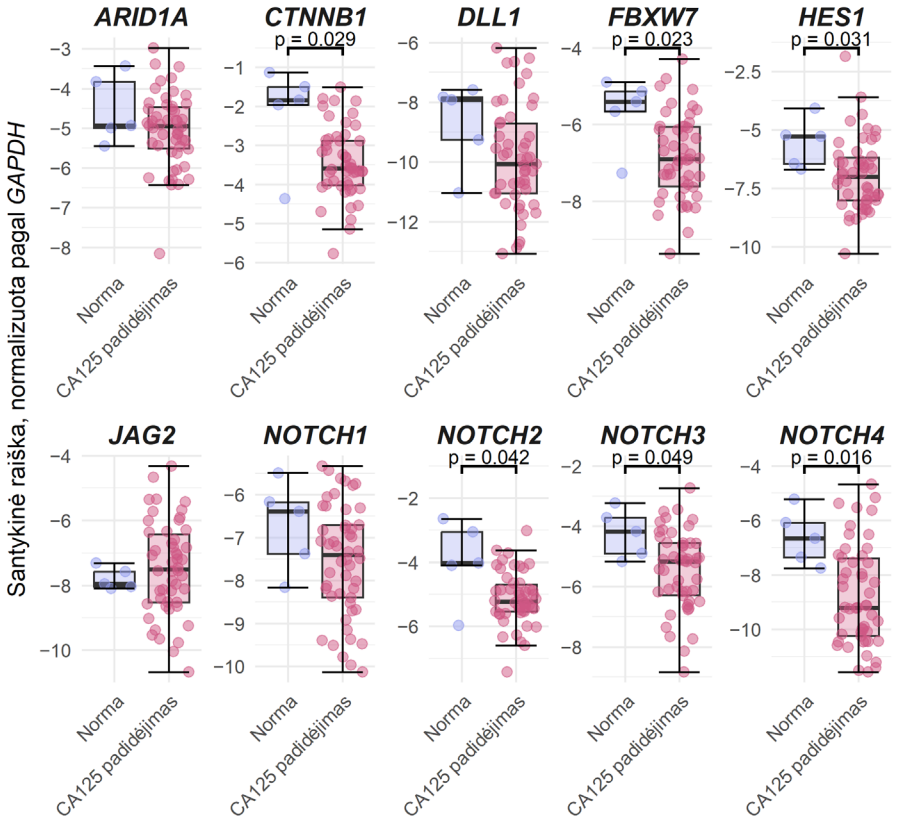
Pav. 3.3 Notch, Wnt signalinių kelių ir *ARID1A* genų raiška pagal navikų diferenciacijos laipsnį kiaušidžių vėžio atvejais

HGSOC navikų grupėje Wnt signalinio kelio genų *CTNNB1* ir *FBXW7* genų raiška statistiškai patikimai skyrėsi tarp FIGO III ir FIGO IV stadijų mėginių (*CTNNB1* $\log_2$SK = –0,70, p = 0,04, *FBXW7* $\log_2$SK = –0,88, p = 0,01), mažesnė raiška siejosi su didesne naviko stadija. *CTNNB1*, *FBXW7* ir *NOTCH2* genų raiška taip pat statistiškai patikimai sumažėjusi palyginus FIGO IV stadijų mėginiuose lyginant su tarp FIGO II stadijos mėginiais (*CTNNB1* $\log_2$SK = –1,38, p = 0,05, *FBXW7* $\log_2$SK = –1,56, p = 0,05, *NOTCH2* $\log_2$SK = – 1,38, p = 0,03). *ARID1A* geno raiškos atveju nustatyta pokyčio tarp skirtingų stadijų mėginių tendencija, kuri nepasiekė statistinio patikimumo: palyginus FIGO III ir FIGO IV stadijų grupes ($\log_2$SK = – 1,85, p = 0,053); bei FIGO II ir FIGO III stadijas ($\log_2$SK = –1,34, p = 0,075) (**Pav. 3.4**).



Pav. 3.4 Notch, Wnt signalinių kelių ir *ARID1A* genų raiška pagal FIGO stadiją HGSOC navikų grupėje

Wnt signalinio kelio genų *CTNNB1* ir *FBXW7* bei Notch signalinio kelio receptorių *NOTCH2*, *NOTCH3* ir *NOTCH4* ir taikinio *HES1* raiška buvo statistiškai patikimai ($p < 0,05$) mažesnė, kuomet nustatytas CA125 serumo biožymens koncentracijos padidėjimas (CA125 serumo koncentracija buvo didesnė nei klinikinėje praktikoje taikoma 35 U/ml riba), atitinkamai *CTNNB1* $\log_2$SK = –1,28, *FBXW7* $\log_2$SK = –1,16, *NOTCH2* $\log_2$SK = –1,16, *NOTCH3* $\log_2$SK = –1,21, *NOTCH4* $\log_2$SK = –2,16, *HES1* $\log_2$SK = –1,38 (**Pav. 3.5**). Kitų sąsajų su klinikiniais rodikliais (amžiumi, CA125 statusu po gydymo) nebuvo nustatyta (duomenys nepateikiami).

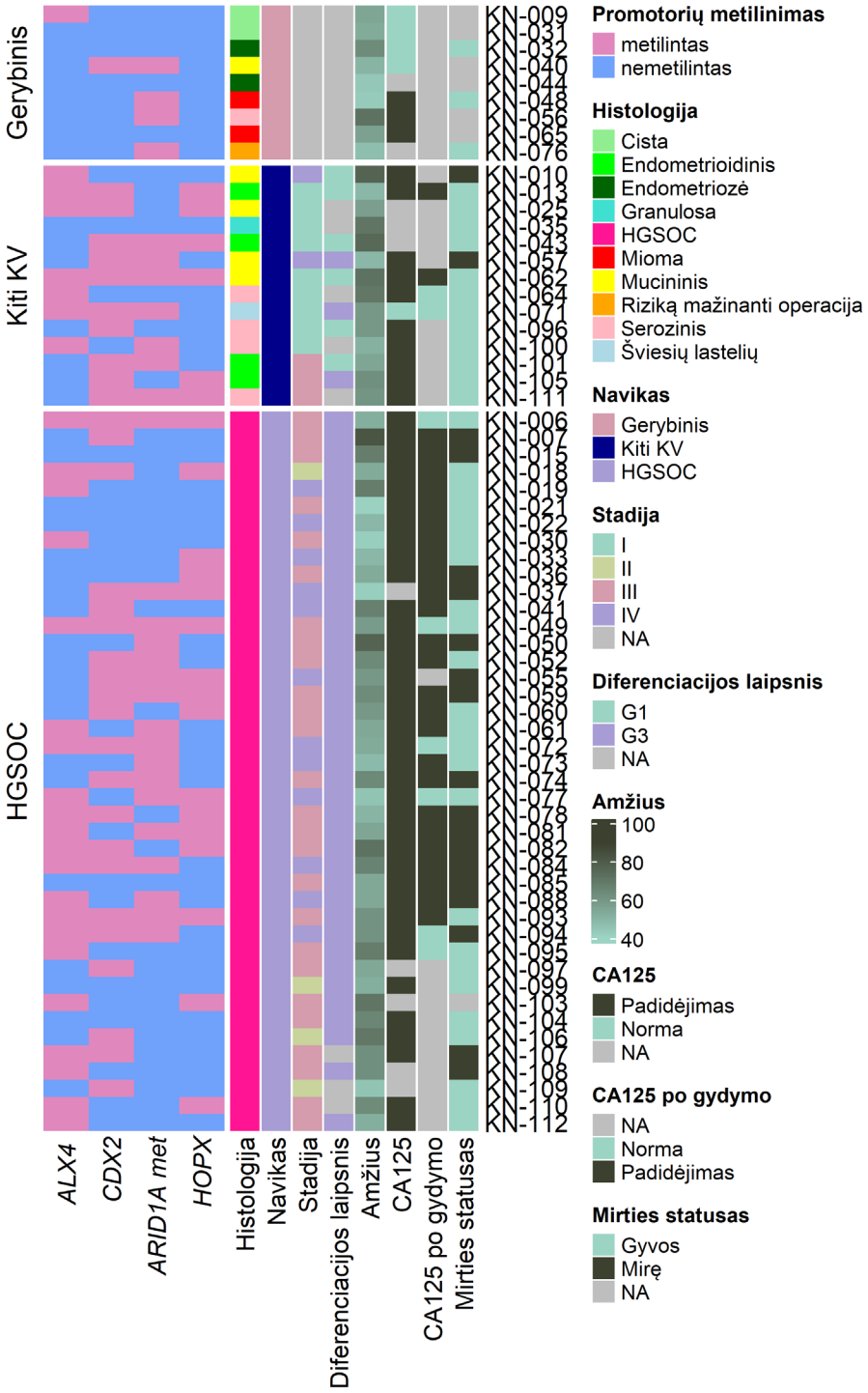


Pav. 3.5 Notch, Wnt signalinių kelių ir *ARID1A* genų raiška pagal CA125 serumo biožymens statusą prieš gydymą. CA125 padidėjimas = CA125 ≥ 35 U/ml.

3.1.2 *ARID1A*, *HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* genų promotorių metilinimo statuso tyrimas kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose

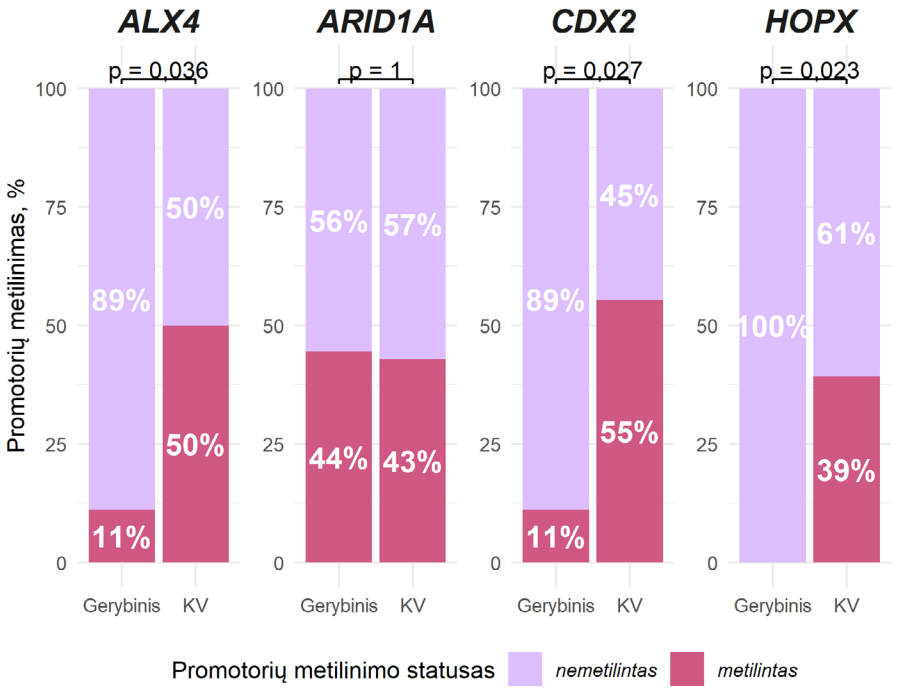
Tyrimo metu buvo analizuojami 4 potencialių KV epigenetinių biožymenų – genų promotorių metilinimo statusai kiaušidžių audiniuose. Remiantis ankstesniais tyrimais ir literatūros analize buvo pasirinkta tirti chromatino remodeliacijos veiksnio SWI/SNF struktūrinio subvieneto baltymą koduojančio geno *ARID1A* ir nekanoninių HOX šeimos genų *ALX4*, *CDX2* ir *HOPX* promotorių metilinimą.

Bent vieno iš keturių tirtų genų promotorių metilinimas buvo nustatytas 83,08 % (54 / 65) visų tirtų audinių mėginių. *ALX4* promotoriaus metilinimas nustatytas 44,62 % (29 / 65), *CDX2* – 49,23 % (32 / 65), *HOPX* – 33,85 % (22 / 65) ir *ARID1A* – 43,08 % (28 / 65) visų tirtų audinių (**Pav. 3.6**).



Pav. 3.6 Genų promotorių metilinimo statuso šilumos žemėlapis

Palyginus genų promotorių metilinimo statusus KV atvejais su gerybinių pakitimų audiniais buvo nustatytas visų trijų su HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso padidėjimas KV atvejais palyginus su gerybinių pakitimų mėginiais: *HOPX* – 100 %, *ALX4* – 39 %, *CDX2* – 44,25 % didesnis metilinimas KV atvejuose. *ARID1A* geno promotoriaus metilinimas buvo 1,58 % didesnis gerybinių pakitimų audiniuose palyginus su KV atvejais, taigi *ARID1A* metilinimo statusas beveik nesiskyrė tarp KV ir gerybinių pakitimų audinių grupių (**Pav. 3.7**).

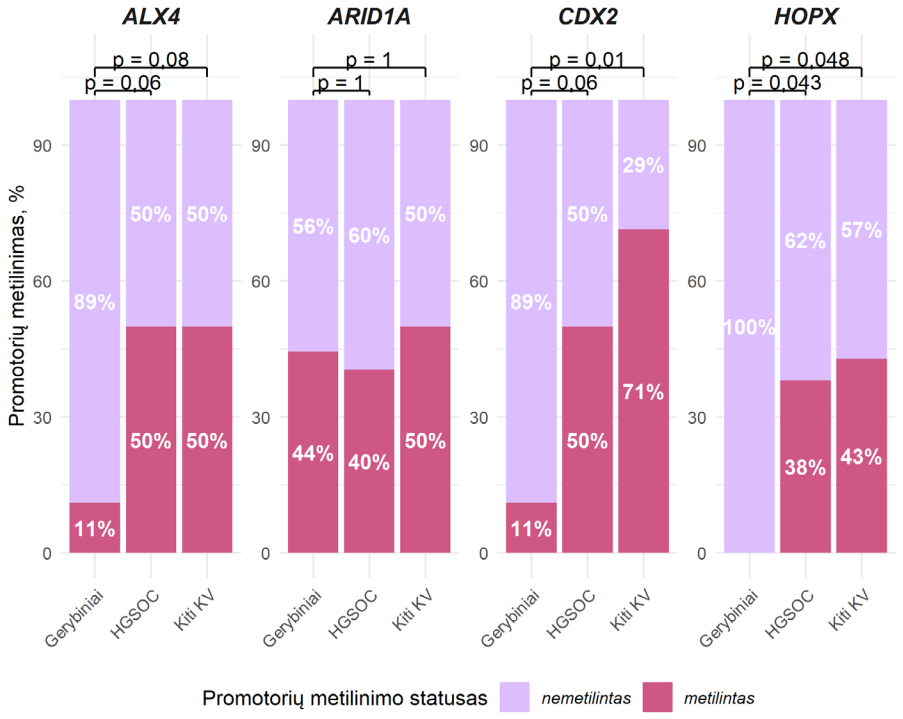


Pav. 3.7 Genų promotorių metilinimo statusas procentais gerybinių pakitimų atvejų ir kiaušidžių vėžio imtyse

Palyginus genų promotorių metilinimo profilį tarp gerybinių pakitimų audinių ir HGSOC audinių, buvo pastebėtas statistiškai reikšmingai (p = 0,04) didesnis *HOPX* promotoriaus metilinimas HGSOC atvejais, kadangi visais gerybinių pakitimų atvejais *HOPX* metilinimas nebuvo nustatytas, o 38,10 % (16 / 42) HGSOC atvejų nustatytas *HOPX* promotoriaus metilinimas (**Pav. 3.8**). Be to, nustatyta didesnio metilinimo statuso tendencija (p = 0,06) *ALX4* ir *CDX2* HGSOC atvejais palyginus su gerybinių pakitimų audiniais, kadangi tik viename iš devynių gerybinių pakitimų atvejų nustatytas šių genų promotorių metilinimas, kai HGSOC atvejais abiejuose genuose nustatytas

50 % (21 / 42) promotorių metilinimas. *ARID1A* geno promotoriaus metilinimas nustatytas 40,47 % (17 / 42) HGSOC ir 44,44 % (4 / 9) gerybinių pakitimų audinių, taigi statistiškai patikimas skirtumas nenustatytas (**Pav. 3.8**).

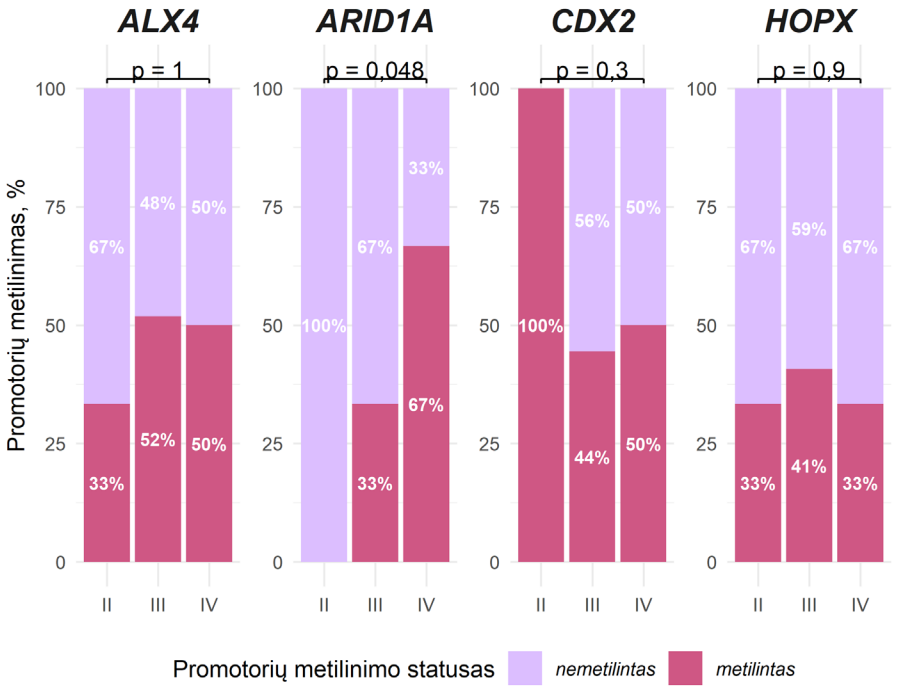
Ne HGSOC tipo KV atvejais (kitų KV grupėje), palyginus su gerybinių pakitimų audiniais, nustatytas didesnis metilinimas *CDX2* (p = 0,01) ir *HOPX* (p = 0,05) genų promotoriuose (**Pav. 3.8**). Ne II tipo KV grupėje promotorių metilinimas nustatytas *CDX2* 71,43 % (10 / 14), *HOPX* 42,86 % (6 / 14), o *ALX4* ir *ARID1A* genų promotorių metilinimas nustatytas 50,00 % (7 / 14) kitų KV atvejų taigi statistiškai patikimai nesiskyrė nuo gerybinių pakitimų audinių grupės, tačiau *ALX4* atveju pastebėta metilinimo tendencija (p = 0,08).



Pav. 3.8 Genų promotorių metilinimo statusas procentais gerybinių pakitimų, HGSOC ir kitų kiaušidžių vėžio atvejų imtyse

ARID1A geno promotoriaus metilinimas HGSOC grupėje buvo susijęs su labiau pažengusia ligos stadija: FIGO II stadijos atvejuose nenustatytas promotoriaus metilinimas nei viename iš trijų atvejų, FIGO III stadijos atvejuose metilinimas nustatytas 33,33 % (9 / 27) atvejų, o FIGO IV stadijos atvejuose nustatytas metilinimas 66,67 % (8 / 12) atvejų (p = 0,05) (**Pav. 3.9**).

Kitų tirtų genų promotorių metilinimo statusų sąsajų su klinikiniais rodikliais ar pacienčių amžiumi nenustatyta.



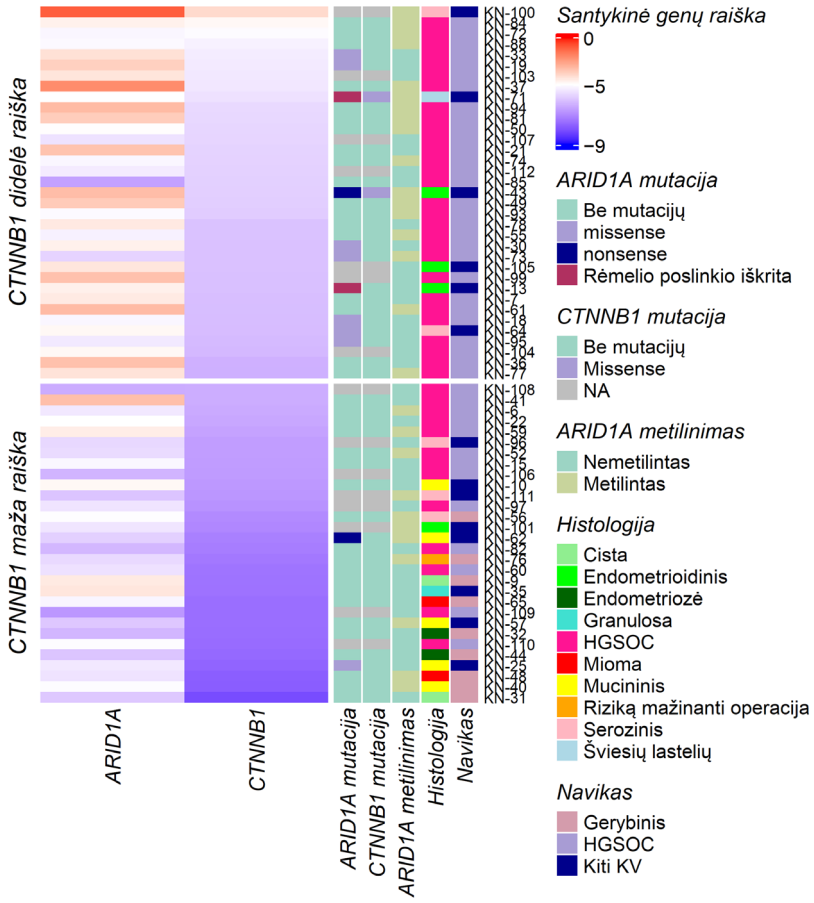
Pav. 3.9 Genų promotorių metilinimo statusas pagal FIGO stadiją HGSOC atvejais

3.1.3 Genų mutacijų, raiškos ir *ARID1A* promotoriaus metilinimo statuso palyginimas

Šiame tyrime NKS metodu analizuoti *ARID1A*, *FBXW7* ir *CTNNB1* genų sekos pakitimai 50 iš 65 į tyrimą įtrauktų pacienčių mėginių. Tyrimo metu nebuvo nustatyta nei vienos *FBXW7* mutacijos. *CTNNB1* gene nustatytos 2 patologinės mutacijos: vieninteliame šviesių ląstelių KV atvejyje (KN–71) c.110C>G mutacija, o endometrioidinio KV ir gimdos kūno vėžio atvejyje (KN–43) – c.101G>A (**Priedų lentelė 3**). Abi šios mutacijos lemia 3 *CTNNB1* geno egzono pakitimus, koduojančius β–katenino N–galo regioną, atsakingą už jungimąsi su ubikvitino ligazės kompleksu, šios mutacijos yra dažniausi β–kateniną koduojančio geno pakitimai, o koduojamos aminorūgštys yra kinazių fosforilinimo taikinai. Taigi pakitusi aminorūgštis gali lemti sutrikusią β– katenino degradaciją. Abejais atvejais su *CTNNB1* mutacija, *CTNNB1*

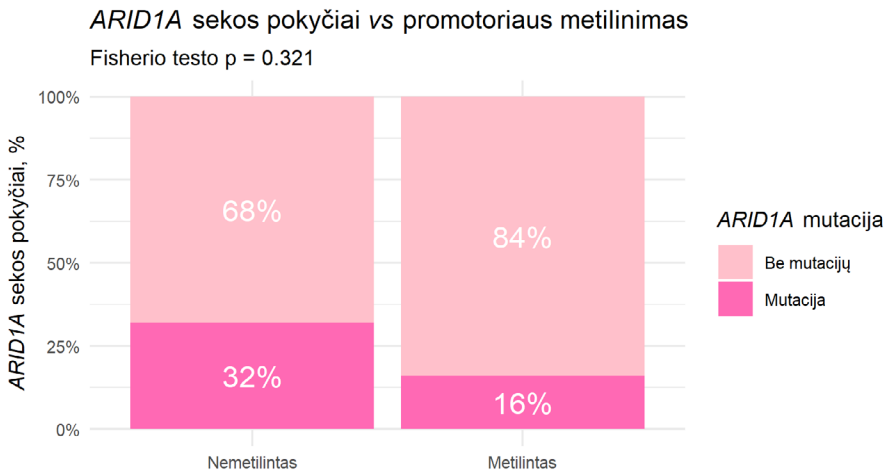
geno raiška buvo didesnė už medianą (**Pav. 3.10**). Kitų pakitimų *CTNNB1* ir *FBXW7* genų sekose nenustatyta.

Abi *CTNNB1* mutacijos nustatytos kartu su *ARID1A* geno pakitimais tų pačių pacienčių mėginiuose. Nors *ARID1A* geno atveju nenustatytas nei vienas *ClinVar* duomenų bazėje aprašytas pakitimas, tačiau nustatyta 10 skirtingų nežinomo patogeniškumo (angl. *variant uncertain significance* – VUS) pakitimų 19 % (6 / 32) HGSOC ir 67 % (6 / 9) kitų KV atvejų. Nei viename iš gerybinių pakitimų audinių mutacijos nebuvo nustatytos. Tyrimo metu *ARID1A* nustatytos 2 rėmelio poslinkio iškritos, 2 baltymą sutrikdantys (angl. *nonsense)* tipo pakitimai ir likę – aminorūgštį pakeičiantys (angl. *missense*) (**Pav. 3.10**).



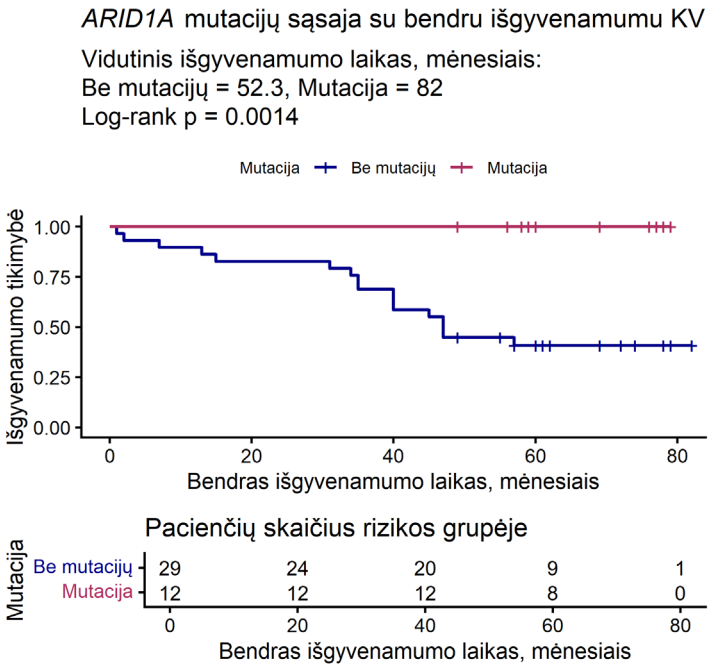
Pav. 3.10 *CTNNB1* mutacijų ir raiškos bei *ARID1A* mutacijų, raiškos ir promotoriaus metilinimo statusas. *FBXW7* sekoskaitos ir raiškos duomenys nepateikti, nes sekos pakitimų nenustatyta. NA – nėra duomenų

Tyrimo imtyje nei *ARID1A* metilinimo statusas, nei *ARID1A* mutacijos nerodė statistiškai patikimų sąsajų su *ARID1A* iRNR kiekiu kiaušidžių audiniuose, tačiau abejais atvejais nustatytas šiek tiek mažesnis *ARID1A* raiškos lygis tiek *ARID1A* promotoriaus metilinimo (log_2SK = – 0,36), tiek geno mutacijų atveju (log_2SK = –0,02), tiek kombinuojant šiuos požymius kartu (log_2SK = –0,29) **(Priedų Pav. 1).** *ARID1A* geno promotoriaus metilinimas ir geno sekos pakitimai kai kuriais atvejais buvo nustatomi kartu: abi *nonsense* ir po vieną *missense* bei rėmelio poslinkio iškritos buvo nustatytos kartu su *ARID1A* promotoriaus metilinimu, tačiau šie pakitimai patikimai nesisiejo su mažesne *ARID1A* raiška. Vis dėlto, daugiau *ARID1A* sekos pakitimų nustatyta nemetilintuose atvejuose (32 % atvejų su pakitimais), palyginus su promotoriaus metilinimą turinčiais atvejais (16 % atvejų su pakitimais), nors šis skirtumas nebuvo statistiškai patikimas (**Pav. 3.11**).



Pav. 3.11 *ARID1A* mutacijų skaičius pagal *ARID1A* promotoriaus metilinimo statusą

ARID1A mutacijos rodė stiprų apsaugantį ryšį su bendru išgyvenamumu: nei viename iš KV atvejų su *ARID1A* sekos pakitimais nenustatyta mirties atvejų, o vidutinis išgyvenamumas buvo 2,5 metų (30 mėnesių) ilgesnis, nei KV atvejais, be mutacijos (p = 0,001) (**Pav. 3.12**). KV grupėje, *ARID1A* geno mažesnė raiška rodė sąsają su trumpesniu išgyvenamumu PR = 1,22, 95 % PI: 0,74−1,99 (**Pav. 3.19**), o *ARID1A* promotoriaus metilinimas buvo susijęs su prastesniu išgyvenamumu PR = 1,45, 95 % PI: 0,59−3,57 (**Pav. 3.20**), tačiau šios sąsajos nepasiekė statistinio patikimumo.

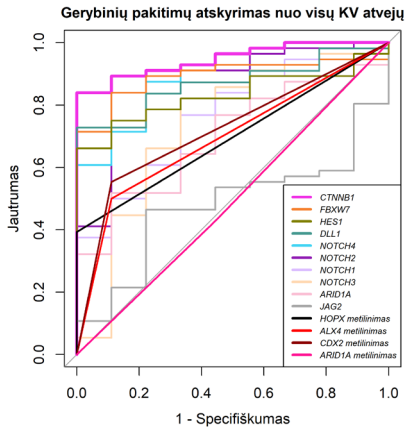


Pav. 3.12 *ARID1A* mutacijų sąsaja su bendru KV pacienčių išgyvenamumu

3.1.4 Su Notch, Wnt ir chromatino remodeliacija susijusių genų raiškos ir *ARID1A* bei HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso diagnostinio potencialo įvertinimas

Keturiolika literatūros analizės metu atrinktų biožymenų: 10 genų raiškos ir 4 genų promotorių metilinimo statusų biožymenys toliau buvo lyginami ROC analizės metodu, siekiant įvertinti jų diagnostinę vertę. Dėl nedidelio genų sekos pakitimų skaičiaus, mutacijų biožymenys nebuvo įtraukti į ROC analizę.

Vertinant biožymenų gebėjimą atskirti KV atvejus nuo gerybinių pakitimų, didžiausią plotą po kreive (AUC) turėjo *CTNNB1* geno raiška (AUC = 0,95, jautrumas 0,84, specifiškumas = 1, tikslumas = 0,86), tačiau didžiausiu jautrumu ir tikslumu pasižymėjo *NOCTH2* geno raiška (AUC = 0,89, jautrumas 0,89, specifiškumas = 0,89, tikslumas = 0,89). Genų promotorių metilinimo biožymenys pasižymėjo mažesniu plotu po kreive nei genų raiškos biožymenys: didžiausią AUC iš metilinimo biožymenų grupės turėjo *CDX2* (AUC = 0,72, jautrumas 0,55, specifiškumas = 0,89), o prasčiausiai iš visų žymenų KV atvejus nuo gerybinių pakitimų audinių atskyrė *ARID1A* promotoriaus metilinimo statusas (AUC = 0,49, jautrumas 0,43, specifiškumas = 0,56) (**Pav. 3.13**).



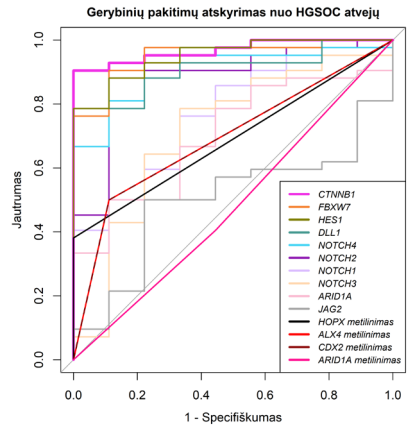
ROC kriterijai

Gerybinių pakitimų atskyrimas nuo KV atvejų

Biožymuo	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
CTNNB1	0.946	−2.560	0.862	0.839	1.000
FBXW7	0.893	−5.943	0.846	0.839	0.889
NOTCH2	0.885	−4.110	0.892	0.893	0.889
NOTCH4	0.869	−6.846	0.862	0.875	0.778
DLL1	0.869	−9.321	0.766	0.727	1.000
HES1	0.831	−6.464	0.708	0.661	1.000
NOTCH1	0.762	−6.550	0.754	0.768	0.667
NOTCH3	0.734	−4.295	0.800	0.821	0.667
CDX2 metilinimas	0.721	0.500	0.600	0.554	0.889
ARID1A	0.698	−4.975	0.569	0.518	0.889
HOPX metilinimas	0.696	0.500	0.477	0.393	1.000
ALX4 metilinimas	0.694	0.500	0.554	0.500	0.889
ARID1A metilinimas	0.492	0.500	0.446	0.429	0.556
JAG2	0.478	−7.308	0.508	0.464	0.778

Pav. 3.13 Notch, Wnt ir *ARID1A* genų raiškos bei *ARID1A* ir HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso biožymenų ROC kreivės ir kriterijai atskiriant kiaušidžių vėžio grupę nuo gerybinių pakitimų audinių

HGSOC navikų grupę nuo gerybinių pakitimų audinių geriausiai atskyrė taip pat *CTNNB1* geno raiška (AUC = 0,97, jautrumas 0,91, specifiškumas = 1). Didžiausiu jautrumu pasižymėjo *NOTCH4* geno raiška (AUC = 0,91, jautrumas 0,93, specifiškumas = 0,78), tačiau nusileido specifiškumu. Iš viso 6 / 10 (*CTNNB1*, *DLL1*, *HES1*, *FBXW7*, *NOTCH2* ir *NOTCH4*) genų raiškos biožymenys statistiškai patikimai ($p < 0,03$) geriau atskyrė HGSOC atvejus nuo gerybinių pakitimų audinių palyginus su didžiausiu AUC pasižymėjusiais promotorių metilinimo biožymenimis *CDX2* ir *ALX4* (AUC = 0,69, jautrumas = 0,50, specifiškumas = 0,89) (**Pav. 3.14**).



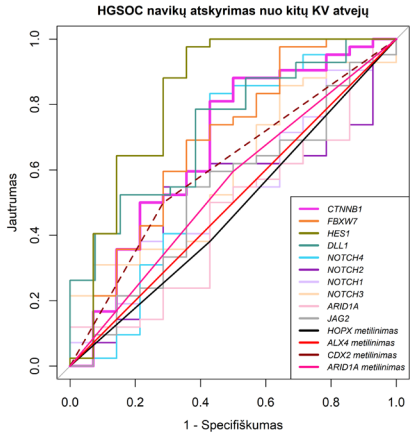
ROC kriterijai

Gerybinių pakitimų atskyrimas nuo HGSOC atvejų

Biožymuo	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
CTNNB1	0.968	−2.560	0.922	0.905	1.000
FBXW7	0.950	−5.943	0.902	0.905	0.889
HES1	0.950	−6.464	0.824	0.786	1.000
NOTCH4	0.907	−6.846	0.902	0.929	0.778
DLL1	0.907	−9.403	0.824	0.786	1.000
NOTCH2	0.884	−4.110	0.882	0.881	0.889
NOTCH1	0.765	−6.552	0.745	0.762	0.667
NOTCH3	0.714	−4.295	0.765	0.786	0.667
ARID1A	0.701	−4.976	0.569	0.500	0.889
ALX4 metilinimas	0.694	0.500	0.569	0.500	0.889
CDX2 metilinimas	0.694	0.500	0.569	0.500	0.889
HOPX metilinimas	0.690	0.500	0.490	0.381	1.000
JAG2	0.500	−7.308	0.549	0.500	0.778
ARID1A metilinimas	0.480	0.500	0.431	0.405	0.556

Pav. 3.14 Notch, Wnt ir *ARID1A* genų raiškos bei *ARID1A* ir HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso biožymenų ROC kreivės ir kriterijai atskiriant HGSOC navikų grupę nuo gerybinių pakitimų audinių

HGSOC navikų grupę nuo kitų KV navikų geriausiai atskyrė *HES1* geno raiška (AUC = 0,83, jautrumas 0,88, specifiškumas = 0,71). Visi analizuoti genų raiškos biožymenys, išskyrus *JAG2*, buvo labiau tinkami navikų diagnostikai – atskyrė HGSOC nuo gerybinių pakitimų audinių, nei HGSOC nuo kitų KV navikų atvejų (*JAG2* atskiriant HGSOC nuo kitų KV AUC = 0,53, o atskiriant HGSOC nuo gerybinių pakitimų atvejų AUC = 0,50) (**Pav. 3.15**). HOX šeimos genų promotorių metilinimas taip pat prasčiau atskyrė HGSOC nuo kitų KV, palyginus su HGSOC ir gerybinių pakitimų atskyrimu, tačiau *ARID1A* promotoriaus metilinimo atveju buvo pastebėtas didesnis plotas po kreivė atskiriant HGSOC ir kitus KV atvejus (*ARID1A* AUC atskiriant HGSOC nuo kitų KV = 0,55 (**Pav. 3.15**), o AUC atskiriant HGSOC nuo gerybinių pakitimų atvejų = 0,48 (**Pav. 3.14**)).



ROC kriterijai

HGSOC navikų atskyrimas nuo kitų KV atvejų

Biožymuo	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
HES1	0.827	−6.330	0.839	0.881	0.714
DLL1	0.727	−9.476	0.745	0.786	0.615
NOTCH3	0.714	−4.558	0.464	0.310	0.929
FBXW7	0.684	−6.595	0.679	0.690	0.643
CTNNB1	0.675	−2.950	0.750	0.810	0.571
NOTCH4	0.622	−7.550	0.768	0.833	0.571
CDX2 metilinimas	0.607	0.500	0.554	0.500	0.714
ARID1A metilinimas	0.548	0.500	0.571	0.595	0.500
JAG2	0.529	−7.551	0.571	0.548	0.643
NOTCH1	0.526	−8.169	0.482	0.381	0.786
NOTCH2	0.500	−5.239	0.589	0.548	0.714
ALX4 metilinimas	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
HOPX metilinimas	0.476	0.500	0.429	0.381	0.571
ARID1A	0.466	−4.963	0.518	0.500	0.571

Pav. 3.15 Notch, Wnt ir *ARID1A* genų raiškos bei *ARID1A* ir HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso biožymenų ROC kreivės ir kriterijai atskiriant HGSOC navikų grupę nuo kitų kiaušidžių vėžio atvejų audinių

3.1.5 Su Notch, Wnt ir chromatino remodeliacija susijusių genų raiškos ir *ARID1A* bei HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso kombinacijų diagnostinio potencialo įvertinimas

Siekiant atrasti geriausią KV diagnostinį modelį, buvo analizuojamos biožymenų kombinacijos, pasirinktos pagal biožymenų grupes. Iš viso analizuotos 5 kombinacijos:

1) visų 14 biožymenų kombinacija, įtraukianti 10 genų raiškos ir 4 genų promotorių metilinimo statuso biožymenis;

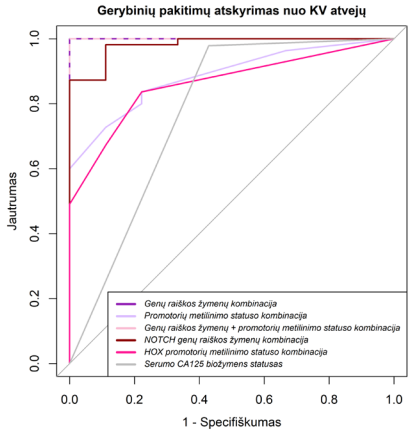
2) 10 genų raiškos biožymenų kombinacija;

3) 4 genų promotorių metilinimo biožymenų kombinacija (*ARID1A*, *HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* metilinimo statusai);

4) 7 su Notch signaliniu keliu susijusių genų raiškos kombinacija (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *DLL1*, *JAG2* ir *HES1*);

5) 3 HOX šeimos genų promotorių metilinimo statusų kombinacija (*HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* metilinimo statusai).

Palyginus biožymenų kombinacijas, tiek 10 genų raiškos tiek visų 14 biožymenų kombinacijos pilnai atskyrė KV atvejus nuo gerybinių pakitimų (AUC = 1). Prasčiausią grupių atskyrimą, palyginus su kitomis kombinacijomis, parodė 3 HOX šeimos genų promotorių metilinimo biožymenų kombinacija (AUC = 0,86, jautrumas 0,84, specifiškumas = 0,78) (**Pav. 3.16**).



ROC kriterijai

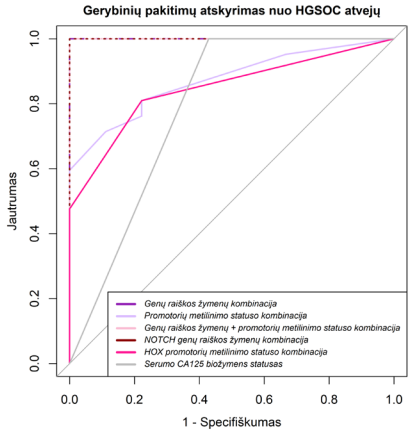
Gerybinių pakitimų atskyrimas nuo KV atvejų

Biožymenys	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
Genų raiškos žymenų kombinacija	1.000	0.471	1.000	1.000	1.000
Promotorių metilinimo statuso kombinacija	0.886	0.731	0.828	0.836	0.778
Genų raiškos žymenų + promotorių metilinimo statuso kombinacija	1.000	0.453	1.000	1.000	1.000
NOTCH genų raiškos žymenų kombinacija	0.982	0.497	0.969	0.982	0.889
HOX promotorių metilinimo statuso kombinacija	0.863	0.732	0.828	0.836	0.778
Serumo CA125 biožymens statusas	0.775	0.500	0.926	0.979	0.571

Pav. 3.16 5 biožymenų kombinacijų ir serumo CA125 biožymens ROC kreivės ir kriterijai atskiriant kiaušidžių vėžio atvejus nuo gerybinių pakitimų audinių: 4 genų promotorių metilinimo biožymenų kombinacija: *ARID1A*, *HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* metilinimo statusas; Notch genų raiškos kombinacija: *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *DLL1*, *JAG2* ir *HES*; HOX promotorių metilinimo statuso kombinacija: *HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* metilinimo statusas.

Palyginus biožymenų kombinacijų gebėjimą atskirti HGSOC navikų atvejus nuo gerybinių pakitimų audinių, net 3 iš 5 kombinacijų (10 genų raiškos biožymenų, visų 14 biožymenų ir 7 Notch signalinio kelio genų raiškos biožymenų) pilnai atskyrė HGSOC atvejus nuo gerybinių pakitimų (AUC = 1). Metilinimo biožymenų kombinacijos atsiliko nuo kitų biožymenų modelių atskiriant HGSOC nuo gerybinių pakitimų audinių (p = 0,01 keturių metilinimo biožymenų ir p = 0,005 HOX šeimos metilinimo biožymenų

modeliai palyginus su Notch šeimos genų raiškos kombinacijos modeliu) (**Pav. 3.17**).



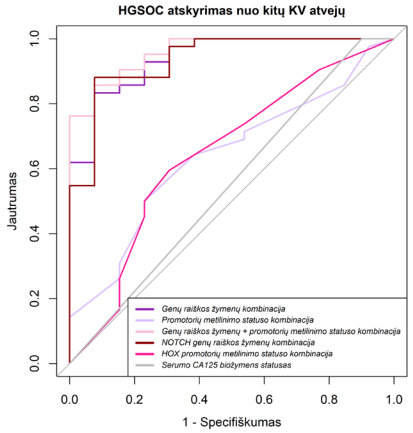
ROC kriterijai

Gerybinių pakitimų atskyrimas nuo HGSOC atvejų

Biožymenys	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
Genų raiškos žymenų kombinacija	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000
Promotorių metilinimo statuso kombinacija	0.872	0.872	0.745	0.714	0.889
Genų raiškos žymenų + promotorių metilinimo statuso kombinacija	1.000	0.470	1.000	1.000	1.000
NOTCH genų raiškos žymenų kombinacija	1.000	0.478	1.000	1.000	1.000
HOX promotorių metilinimo statuso kombinacija	0.847	0.706	0.804	0.810	0.778
Serumo CA125 biožymens statusas	0.786	0.500	0.932	1.000	0.571

Pav. 3.17 5 biožymenų kombinacijų ir serumo CA125 biožymens ROC kreivės ir kriterijai atskiriant HGSOC atvejus nuo gerybinių pakitimų audinių: 4 genų promotorių metilinimo biožymenų kombinacija: *ARID1A*, *HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* metilinimo statusas; Notch genų raiškos kombinacija: *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *DLL1*, *JAG2* ir *HES*; HOX promotorių metilinimo statuso kombinacija: *HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* metilinimo statusas.

Nei viena iš 5 biožymenų kombinacijų pilnai neatskyrė HGSOC atvejų nuo ne HGSOC tipo KV. Didžiausiu plotu po kreive pasižymėjo visų 14 tirtų žymenų kombinacija (AUC = 0,96, jautrumas 0,86, specifiškumas = 0,92). Genų promotorių žymenų pridėjimas 2,4 % padidino testo modelio jautrumą (14 biožymenų modelio jautrumas 0,857, o 10 genų raiškos biožymenų jautrumas 0,833), nors šių modelių plotas po kreive statistiškai patikimai nesiskyrė (p = 0,19) (**Pav. 3.18**).



ROC kriterijai

HGSOC atskyrimas nuo kitų KV atvejų

Biožymenys	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
Genų raiškos žymenų kombinacija	0.940	0.720	0.855	0.833	0.923
Promotorių metilinimo statuso kombinacija	0.639	0.783	0.564	0.500	0.769
Genų raiškos žymenų + promotorių metilinimo statuso kombinacija	0.960	0.697	0.873	0.857	0.923
NOTCH genų raiškos žymenų kombinacija	0.936	0.763	0.891	0.881	0.923
HOX promotorių metilinimo statuso kombinacija	0.646	0.686	0.618	0.595	0.692
Serumo CA125 biožymens statusas	0.550	0.500	0.809	1.000	0.100

Pav. 3.18 5 biožymenų kombinacijų ir serumo CA125 biožymens ROC kreivės ir kriterijai atskiriant HGSOC atvejus nuo kitų kiaušidžių vėžio atvejų audinių: 4 genų promotorių metilinimo biožymenų kombinacija: *ARID1A*, *HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* metilinimo statusas; Notch genų raiškos kombinacija: *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *DLL1*, *JAG2* ir *HES*; HOX promotorių metilinimo statuso kombinacija: *HOPX*, *ALX4* ir *CDX2* metilinimo statusas.

Visi analizuoti genų raiškos biožymenų kombinacijų testų modeliai turėjo statistiškai patikimai ($p < 0,04$) didesnį plotą po kreive nei klinikoje naudojamas serumo biožymuo CA125, kuris atskyrė KV nuo gerybinių pakitimų audinių AUC = 0,78 (**Pav. 3.16**), HGSOC nuo gerybinių pakitimų audinių AUC = 0,79 (**Pav. 3.17**), o HGSOC nuo kitų KV atvejų AUC = 0,55 (**Pav. 3.18**). Nepaisant to, jog atskiriant KV ar HGSOC atvejus nuo gerybinių pakitimų 6 / 14 pavienių biožymenų pasižymėjo didesniu AUC nei CA125, tačiau šie skirtumai nebuvo statistiškai patikimi, o *JAG2* raiškos ir *ARID1A* promotoriaus metilinimo statuso biožymenys statistiškai patikimai prasčiau atskyrė šias grupes ($p < 0,03$). Nors CA125 nėra įprastai naudojamas atskirti KV tipams, tačiau palyginus CA125 ir pasirinktų biožymenų gebėjimą atskirti HGSOC nuo kitų KV tipų, tik *DLL1* ir *HES1* genų raiška statistiškai patikimai geriau atskyrė šias grupes nei CA125 (atitinkamai $p = 0,05$ ir $0,003$).

Palyginus atskirų biožymenų ir jų kombinacijų gebėjimą atskirti KV atvejus nuo gerybinių pakitimų, galima pastebėti, kad didžiausiu plotu po kreive pasižymėjęs *CTNNB1* genų raiškos biožymuo, tik 0,05 ploto vienetų atsiliko nuo visų 10 genų raiškos žymenų kombinacijos (atitinkamai AUC = 0,95 ir AUC = 1), šis skirtumas nepasiekė statistinio patikimumo, tačiau rodė tendenciją 10 genų kombinacijai geriau atskirti grupes ($p = 0,051$). Statistiškai patikimai nesiskyrė ir *NOTCH2* geno raiškos AUC palyginus su 10 genų

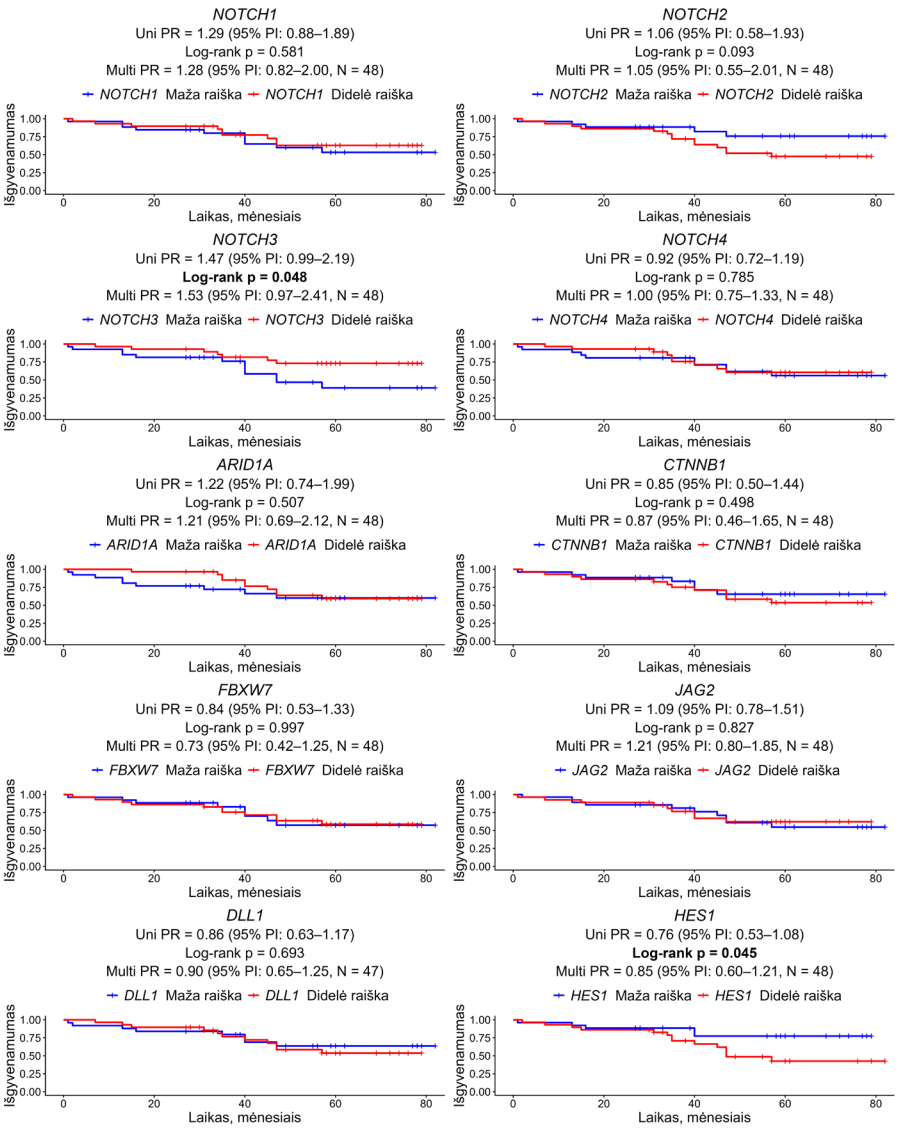
raiškos kombinacija (AUC = 0,88, p = 0,07), tačiau likusių 12 biožymenų gebėjimas atskirti šias grupes buvo statistiškai reikšmingai ($p < 0,01$) mažesnis palyginus su 10 genų raiškos kombinacija. Taip pat palyginus atskirų genų promotorių metilinimo statuso biožymenų gebėjimą atskirti KV atvejus nuo gerybinių pakitimų visais atvejais 4 biožymenų kombinacija geriau atskyrė grupes palyginus su atskirais metilinimo biožymenimis ($p < 0,04$) (**Pav. 3.13** ir **Pav. 3.16**).

Siekiant atskirti HGSOC atvejus nuo gerybinių audinių *CTNNB1* ir *HES1* ir *FBXW7* plotas po kreive (atitinkamai AUC = 0,97, 0,95 ir 0,95) statistiškai patikimai nesiskyrė nuo 10 genų kombinacijos (AUC = 1, $p > 0,05$), likę 11 biožymenų statistiškai patikimai prasčiau atskyrė šias grupes ($p < 0,05$) (**Pav. 3.14** ir **Pav. 3.17**). Atskiriant HGOSC nuo kitų KV atvejų, tik *HES1* geno raiškos plotas po kreive (AUC = 0,83) statistiškai patikimai nesiskyrė nuo 10 genų raiškos arba 14 biožymenų kombinacijų modelių (AUC = 1, $p > 0,05$) (**Pav. 3.15** ir **Pav. 3.18**).

Taigi kai kurie Notch ir Wnt signalinių kelių genų raiškos biožymenys (*CTNNB1*, *HES1*, *FBXW7* ir *NOTCH2*) pasižymėjo pakankamai didele diagnostine verte, tačiau biožymenų kombinacijos, palyginus su pavieniais biožymenimis, pasižymi didesniu jautrumu ir tikslumu, kadangi kombinacijos pasiekė AUC = 1, o atskiri biožymenys tokių rodiklių nepasiekė. Nors atskiri biožymenys turi diagnostinę vertę, tačiau biožymenų kombinavimas yra naudinga diagnostinio testo modelio kūrimo strategija, turinti potencialą pilnai atskirti KV ar HGSOC navikus nuo gerybinių pakitimų audinių.

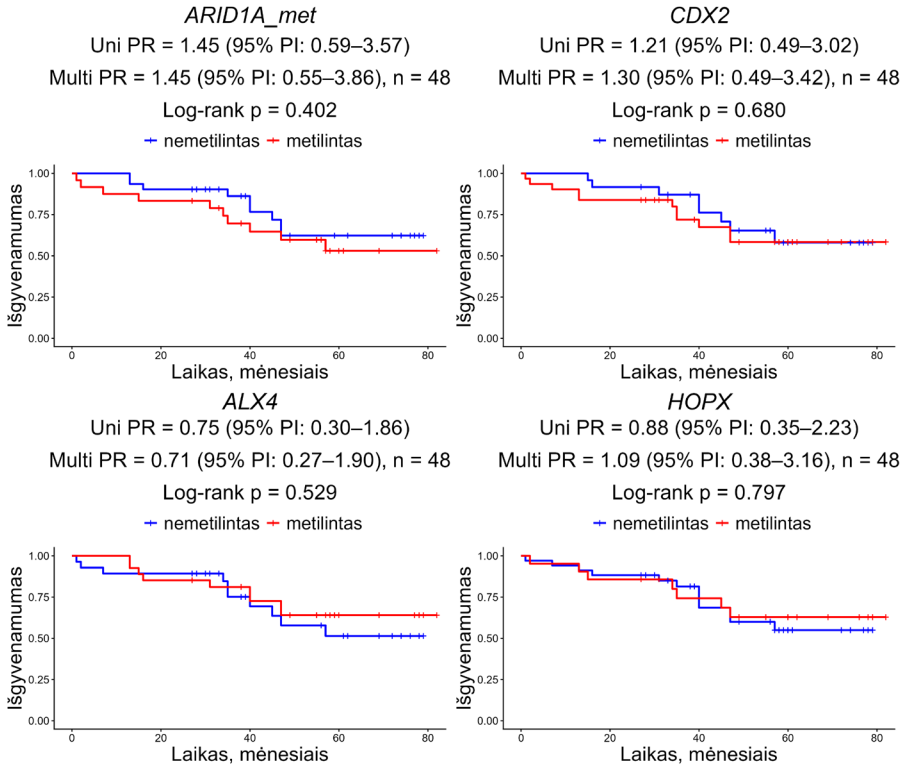
3.1.6 Su Notch, Wnt ir chromatino remodeliacija susijusių genų raiškos ir *ARID1A* bei HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso kombinacijų prognostinio potencialo įvertinimas

Analizuojant genų raiškos biožymenų sąsają su bendru KV pacienčių išgyvenamumu, tik *NOTCH3* ir *HES1* genų raiška rodė statistiškai patikimą sąsają palyginus didelės ir mažos raiškos grupes, atskirtas pagal medianą (atitinkamai p = 0,048 ir 0,045). *NOTCH3* raiškos sumažėjimas buvo susijęs su 1,47 karto didesne mirties nuo KV rizika (PR = 1,47, PI: 0,99−2,19), kuri buvo dar stipresnė atsižvelgiant į pacienčių amžių ir kraujo serumo biožymens CA125 koncentraciją diagnozės metu (PR = 1,53, PI: 0,97−2,41). *HES1* geno raiškos sumažėjimas priešingai, buvo susijęs su mažesne mirties rizika (PR = 0,76, 95% PI: 0,53−1,08, o pakoregavus pagal amžių ir CA125 koncentraciją PR = 0,85, 95% PI = 0,60−1,21) (**Pav. 3.19**).



Pav. 3.19 Išgyvenamumo analizė KV grupėje: Notch, Wnt signalinių kelių ir *ARID1A* genų raiškos biožymenys. Kaplan-Meier kreivėse didelė raiška = daugiau už medianą, maža raiška = mažiau už geno raiškos medianą. Sutrumpinimai: *Uni PR* = vienmatės kokso analizės PR; *Multi PR* = daugiamatės kokso analizės PR, koreguojant pagal amžių ir CA125 koncentraciją diagnozės metu

Genų *ARID1A*, *HOPX* ir *CDX2* promotorių metilinimas turėjo neigiamą įtaką išgyvenamumui, o *ALX4* – teigiamą, tačiau šios sąsajos nebuvo statistiškai patikimos (**Pav. 3.20**).

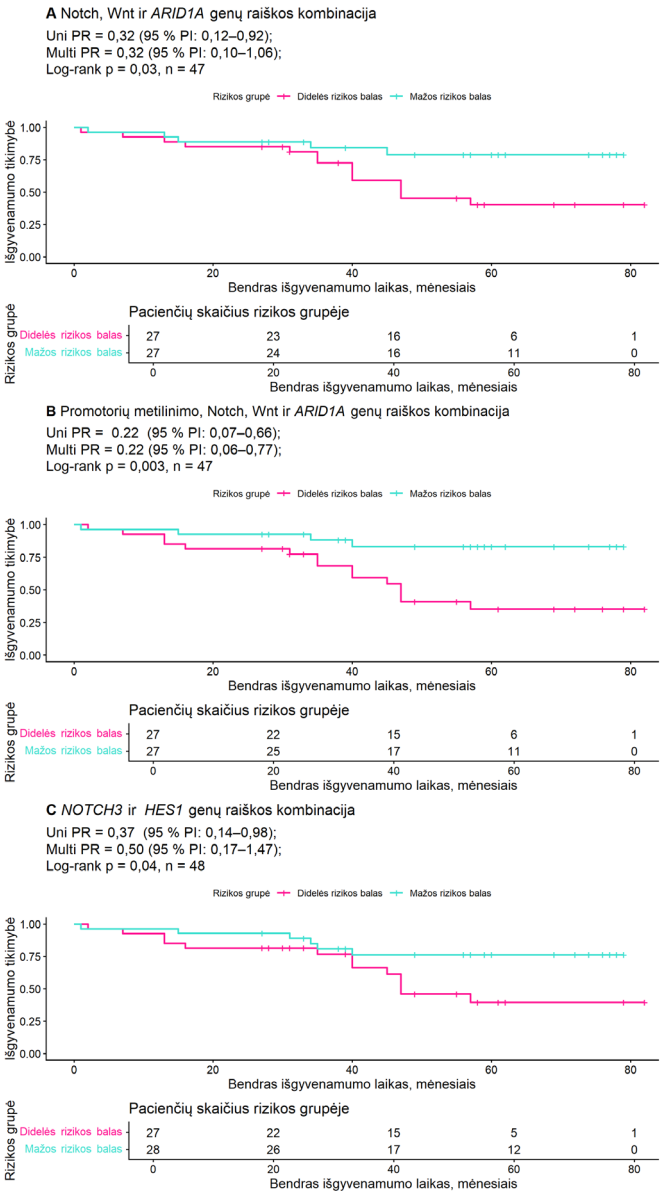


Pav. 3.20 Išgyvenamumo analizė KV grupėje: genų promotorių metilinimo statuso biožymenys. Sutrumpinimai: *Uni PR* = vienmatės kokso analizės PR; *Multi PR* = daugiafaktorinės kokso analizės PR, koreguojant pagal amžių ir CA125 koncentraciją diagnozės metu, *ARID1A_met – ARID1A* promotoriaus metilinimas

HGSOC navikų grupėje, tik *NOTCH2* geno mažesnė nei mediana raiška pasižymėjo statistiškai patikima sąsaja su geresniu bendru išgyvenamumu (PR = 0,79, 95 % PI: 0,42–1,47, log–rank p = 0,034, atsižvelgiant į CA125 ir amžių diagnozės metu, PR = 0,75, 95 % PI: 0,36–1,55), kitų biožymenų sąsajų su bendru išgyvenamumu nenustatyta (**Priedų pav. 2 ir Priedų pav. 3**).

KV mėginių imtyje, *ARID1A* ir Notch, Wnt signalinių kelių genų raiškos biožymenų kombinacija Kokso regresijos metodu rodė sąsają su bendru išgyvenamumu, o didelės rizikos balas buvo siejamas su trumpu išgyvenamumu (PR = 0,32, 96 % PI: 0,12−0,92 , p = 0,03) (**Pav. 3.21 A**). Kombinuojant visus 14 genų promotorių metilinimo ir genų raiškos biožymenis buvo nustatytas 10 % didesnis ryšys su išgyvenamumu (PR = 0,22, 96 % PI: 0,07−0,66, p = 0,003) palyginus su tik genų raiškos modeliu (**Pav. 3.21 B**). Kombinuojant dviejų su išgyvenamumu susijusių biožymenų *HES1* ir *NOTCH3* genų raišką, toks dviejų biožymenų modelis pasižymėjo

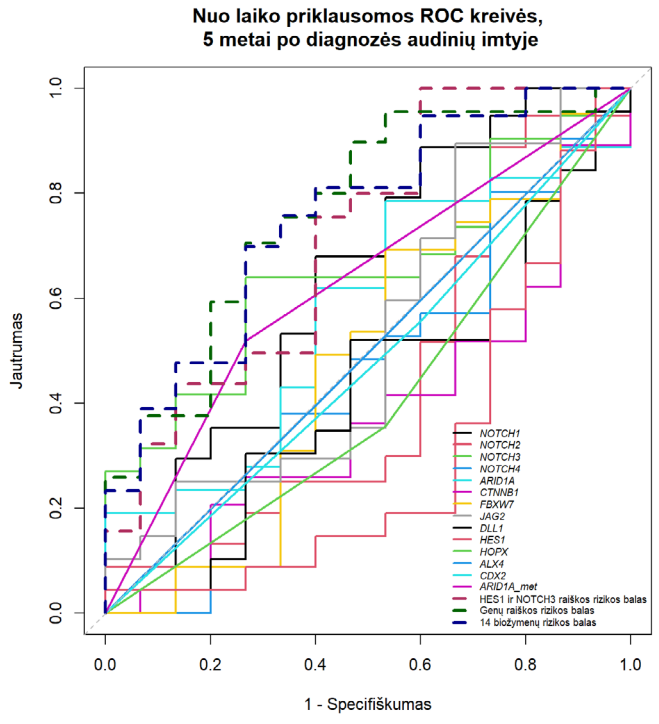
šiek tiek mažesne, tačiau taip pat statistiškai patikima sąsaja su išgyvenamumu, nei 10 ar 14 biožymenų modeliai (PR = 0,37, 95 % PI: 0,14−0,98, p = 0,04) (**Pav. 3.21 C**).



Pav. 3.21 Notch, Wnt ir *ARID1A* genų raiškos (**A**) bei šių genų ir *ARID1A* ir HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso biožymenų (**B**) ir *HES1* ir *NOTCH3* genų raiškos biožymenų (**C**) kombinacijų sąsaja su išgyvenamumu. Uni: vienmatis Kokso modelis, Multi: daugiamatis Kokso modelis, atsižvelgiant į amžių ir CA125 koncentraciją diagnozės metu

Palyginus prognostinį biožymenų ir jų kombinacijų gebėjimą KV audinių imtyje nuspėti 5−kerių metų išgyvenamumą visos 3 biožymenų kombinacijos pralenkė pavienius biožymenis: didžiausiu AUC iš pavienių biožymenų pasižymėjo *NOTCH3* AUC = 0,65, jautrumas = 0,64, specifiškumas 0,73, o visų trijų kombinacijų AUC buvo didesnis nei 0,7. Didžiausiu AUC pasižymėjo 14 biožymenų modelis, kombinuojantis genų raiškos ir genų promotorių metilinimo žymenis, pasiekęs AUC = 0,77, jautrumą = 0,71, specifiškumą 0,73. Palyginus 14 biožymenų modelį su pavieniais biožymenimis prognozuojant 5−kerių metų išgyvenamumą 14 biožymenų kombinacijos prognostinės savybės patikimai nesiskyrė tik nuo *ARID1A* genų raiškos ir promotoriaus metilinimo statuso bei *NOTCH1* ir *NOTCH3* genų raiškos biožymenų prognostinių savybių (*ARID1A* raiškos AUC = 0,57, *ARID1A* promotoriaus metilinimo statuso AUC = 0,63, *NOTCH1* raiškos AUC =0,63, *NOTCH3* raiškos AUC = 0,65, $p > 0,05$). Didesnis biožymenų skaičius kombinacijoje nebūtinai lėmė didesnę prognostinę vertę: 10 genų raiškos biožymenų kombinacija pasiekė mažesnį AUC nei dviejų su išgyvenamumu statistiškai patikimai susijusių genų – *NOTCH3* ir *HES1* kombinacija (10 genų kombinacijos AUC = 0,71, o dviejų genų raiškos biožymenų kombinacijos AUC = 0,75) (**Pav. 3.22**). Nors 14 biožymenų modelis pasiekė didžiausią AUC, šių trijų biožymenų kombinacijų nuo laiko priklausomos kreivės statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarpusavyje ($p > 0,05$), todėl visi trys modeliai turi panašų prognostinį potencialią.

Taigi, nors *HES1* ir *NOTCH3* parodė sąsajas su bendru išgyvenamumu, o *NOTCH3*, *NOTCH1* ir *ARID1A* genų raiškos ir *ARID1A* promotoriaus metilinimas rodė gebėjimą prognozuoti išgyvenamumą per 5−kerius metus, tačiau biožymenų kombinacijos, ypač kombinuojant genų raiškos ir genų promotorių biožymenis, pasižymėjo pranašesnėmis prognostinėmis savybėmis, todėl biožymenų kombinavimas į vieną prognostinį modelį yra strategija, padidinanti potencialaus KV testo prognostinį tikslumą ir leidžianti tiksliau skirstyti pacientes pagal mirties riziką.



ROC kriterijai

Prognostinis tikslumas 5 metų išgyvenamumui

Biožymuo	Laikas_mėn	AUC	Jautrumas	Specifiškumas
NOTCH1	60	0.630	0.888	0.400
NOTCH2	60	0.437	0.888	0.267
NOTCH3	60	0.653	0.639	0.733
NOTCH4	60	0.440	0.802	0.267
ARID1A	60	0.573	0.785	0.467
CTNNB1	60	0.380	0.892	0.133
FBXW7	60	0.484	0.692	0.467
JAG2	60	0.529	0.895	0.333
DLL1	60	0.429	0.521	0.533
HES1	60	0.301	1.000	0.067
HOPX	60	0.411	0.000	1.000
ALX4	60	0.498	0.000	1.000
CDX2	60	0.478	0.000	1.000
ARID1A_met	60	0.626	0.519	0.733
Genų raiškos rizikos balas	60	0.713	1.000	0.400
14 biožymenų rizikos balas	60	0.766	0.705	0.733
NOTCH3 ir HES1 rizikos balas	60	0.754	0.699	0.733

Pav. 3.22 Notch, Wnt ir *ARID1A* genų raiškos ir *ARID1A* ir HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso biožymenų bei šių biožymenų kombinacijų nuo laiko priklausomos ROC kreivės ir kriterijai. *ARID1A_met* – *ARID1A* geno promotoriaus metilinimas, Genų raiškos rizikos balas – genų raiškos kombinacija, 14 biožymenų rizikos balas – visų 14 genų raiškos ir genų promotorių metilinimo kombinacija

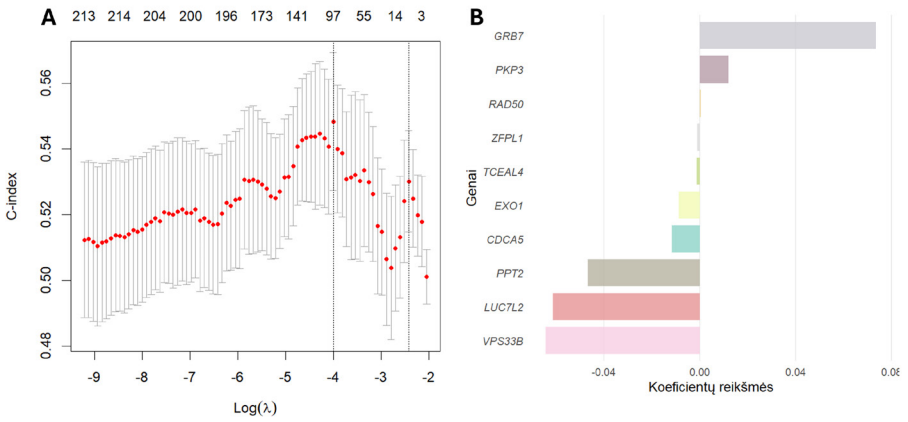
3.2 10–ties su įvairiomis vėžio funkcijomis susijusių genų raiškos tyrimas kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose statistiniais ir eksperimentiniais metodais

3.2.1 Genų raiškos žymenų parinkimas taikant statistinius metodus

TCGA–OV ir GTEx kiaušidžių audinių transkriptominių duomenų analizės tikslas buvo atrinkti genų raiškos biožymenis, kurie turėtų diagnostinį ir prognostinį potencialą. Pirmiausia buvo parsiųsti RNR sekoskaitos ir klinikininiai duomenys iš abiejų duomenų bazių. Transkriptominiai duomenys normalizuoti ir atrinkti baltymus koduojantys transkriptai, tokiu būdu prioretizuojant genus, turinčius žinomas biologines funkcijas ir pašalinti nekoduojančias RNR, kurios pasižymi didesniu variabilumu ir yra prasčiau aprašytos. Įvykdžius šiuos žingsnius, toliau GTEx ir TCGA–OV duomenys padalinti į mokymosi (489 mėginiai, 153 GTEx ir 336 TCGA–OV) ir testavimo (106 mėginiai, 27 GTEx ir 79 TCGA–OV) imtis. Žymenų atrinkimas buvo vykdomas naudojantis mokymosi imties duomenimis. Pirmiausia, siekiant atrinkti genus, kurių raiška geriausiai atskiria KV atvejus nuo sveikų kiaušidžių audinių, buvo pritaikytas elastinio tinklo algoritmas, pasirinkus $\alpha = 0{,}5$: tai reiškia vienodai subalansuojant L1 ir L2 reguliarizacijas. Elastinio tinklo regresijos algoritmas atrinko 214 genų, galinčių atskirti KV nuo GTEx kiaušidžių audinių. Pilnas atrinktų genų sąrašas ir jų raiška pateikta **Priedų pav. 4**. Genų ontologijos pagausinimo (angl. *gene ontology enrichment*) analizė parodė, jog elastinio tinklo algoritmo atrinkti genai, buvo daugiausiai susiję su mitoze ir ląstelių jungčių organizacija (**Priedų pav. 5**), tarp 214 atrinktų genų nebuvo nei vieno pirmoje tyrimo dalyje tyrinėto Wnt ir Notch signalinių kelių ar chromatino remodeliacijos veiksnio geno, tačiau atrinkti kiti chromatino remodeliacijos veiksnius koduojantys genai: *CHD4*, *SRCAP* ir *ASF1B*, bei Notch signalinio kelio genas *PSEN2*.

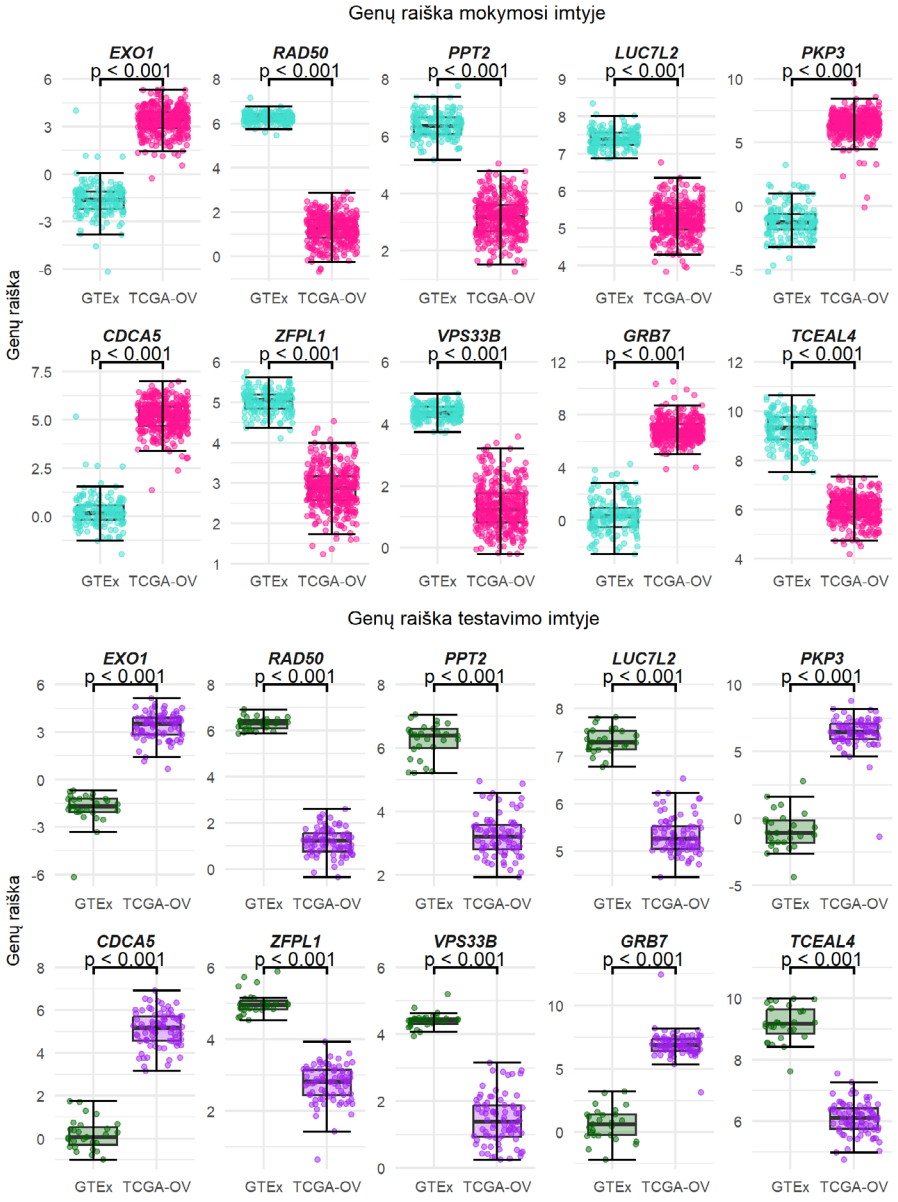
Elastinio tinklo algoritmo atrinkti 214 genai, atskiriantys TCGA–OV ir GTEx imtis, buvo toliau atrenkami pagal prognostines savybes pasitelkiant LASSO–kokso regresijos algoritmą mokymosi imtyje pasirinkus TCGA–OV mėginius su žinomu išgyvenamumu. Pagal kryžminės–validacijos grafiką geriausia prognostine verte pasižymi modeliai, įtraukiantys tarp 7 (1 standartinio nuokrypio – mažiausias duomenų kiekis) ir 97 (geriausiai duomenim prisitaikantis modelis) biožymenų (**Pav. 3.23 A**). Pasirinktas griežtas lambda koeficientas, pagal kurį modelyje liko 10 su KV išgyvenamumu susijusių genų (**Pav. 3.23 B**). Galutinis pasirinktų genų sąrašas

buvo: *EXO1*, *RAD50*, *PPT2*, *LUC7L2*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B*, *GRB7* ir *TCEAL4*. Šių genų funkcijos yra susiję su DNR reparacija (*EXO1*, *RAD50*), ląstelės replikacija (*CDCA5*), lizosomų funkcijomis (*VPS33B*, *PPT2*), genų raiškos reguliacija (*LUC7L2*, *ZFPL1*, *TCEAL4*) ir ląstelių signalų perdavimu (*GRB7*, *PKP3*) (**Lentelė 3.1**), visos šios funkcijos yra svarbios vėžio vystymuisi ir progresijai.



Pav. 3.23 Su išgyvenamumu susijusių KV modelių grafikai: kryžminės–validacijos grafikas, pagal kurį pasirinktas lambda parametras LASSO–kokso modelyje (**A**); pasirinktų biožymenų koeficientai LASSO–kokso modelyje (**B**)

Tiek mokymosi, tiek testavimo imtyse, pasirinktų 10 genų raiška, statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp GTEx ir TCGA–OV kohortų ($p < 0{,}001$) (**Pav. 3.24**). *EXO1*, *PKP3*, *CDCA5*, ir *GRB7* atvejais nustatyta didesnė raiška TCGA–OV kohortoje palyginus su nenavikiniais audiniais, o *RAD50*, *PPT2*, *LUC7L2*, *VPS33B*, *ZFPL1* ir *TCEAL4* raiška buvo mažesnė TCGA–OV atvejais, palyginus su GTEx mėginiais. Tiek mokymosi, tiek testavimo imtyse, didžiausiu raiškos padidėjimu pasižymėjo *PKP3* geno raiška (mokymosi imtyje $\log_2 SK = 7{,}63$, testavimo imtyje $\log_2 SK = 7{,}33$). Didžiausiu raiškos sumažėjimu kiaušidžių vėžio imtyje palyginus su normaliais kiaušidžių audiniais pasižymėjo *RAD50* geno raiška (mokymosi imtyje $\log_2 SK = -5{,}03$, testavimo imtyje $\log_2 SK = -5{,}11$).

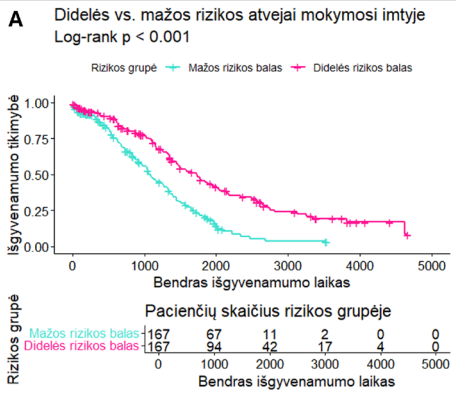


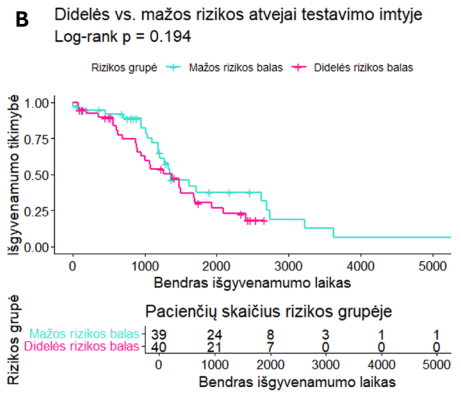
Pav. 3.24 Pasirinktų 10 genų raiškos biožymenų raiška mokymosi (**A**) ir testavimo (**B**) imtyse. TCGA–OV – KV audinių raiška, GTEx – normalių kiaušidžių audinių raiška

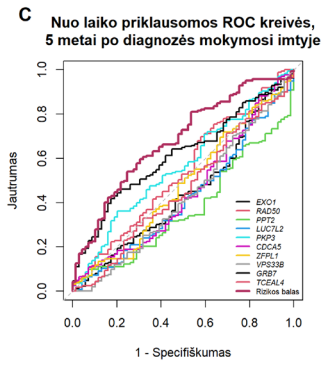
TCGA–OV mokymosi imtyje analizuojant sąryšius su klinikiniais rodikliais nepastebėta raiškos sąsajų su navikų stadija nei mokymosi nei testavimo imtyse (**Priedų pav. 6**), tačiau pastebėtas ryšys mokymosi imtyje tarp *CDCA5*, *VPS33B* ir *TCEAL4* genų raiškos ir navikų diferenciacijos laipsnio (atitinkamai p = 0,02, p = 0,03, p = 0,03), tačiau genų raiškos padidėjimas didesnio naviko diferenciacijos laipsnio atveju testavimo imtyje nustatytas tik *CDCA5* geno atveju (p = 0,002) (**Priedų pav. 3.7**). Su invazija į limfmazgius mokymosi imtyje buvo susijusi tik *LUC7L1* geno sumažėjusi raiška (p = 0,02), tačiau ši sąsaja nebuvo nustatyta testavimo imtyje, kur buvo nustatyta *ZFPL1* padidėjusi raiška atvejais, kai buvo invazija į limfmazgius (p = 0,05) (**Priedų pav. 8**). Nors su likutiniu naviku mokymosi imtyje nustatytas tik *GRB7* geno raiškos skirtumas tarp atvejų be makroskopiškai matomo likutinio naviko ir didesnio nei 20 mm skersmens likutinio naviko (p = 0,01), tačiau testavimo imtyje ši priklausomybė nenustatyta, tačiau buvo nustatytos *VPS33B* ir *PPT2* genų raiškos sąsajos su likutiniu naviku (p < 0,04) (**Priedų pav. 9**).

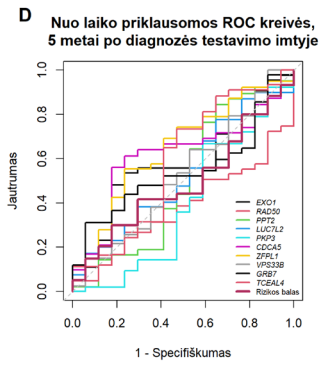
Vienintelis ir TCGA–OV ir GTEx imtyse prieinamas demografinis duomuo buvo amžius (intervalais). Nors mokymosi imtyje visų 10 genų raiška buvo susijusi su amžiaus kategorijom (p < 0,05), tačiau testavimo imtyje nei vieno 10 genų raiška nerodė statistiškai patikimos sąsajos su amžiumi (**Priedų pav. 10**).

Pagal LASSO–kokso modelio koeficientus galima spręsti jog trys genai (*RAD50*, *PKP3* ir *GRB7*) turėjo neigiamą įtaką bendram išgyvenamumui, o likę genai – teigiamą (**Pav. 3.23 B**). Kombinuojant šiuos genų raiškos žymenis ir jų koeficientus į vieną išgyvenamumo modelį, mokymosi imtyje, modelis rodė patikimą sąsają su bendru išgyvenamumu (p < 0,001), penkerių metų išgyvenamumo prognozavimas pasiekė AUC = 0,68, kuris pranoko atskirų genų raiškos žymenų prognostinę vertę (didžiausiu AUC pasižymėjo *GRB7* geno raiška AUC = 0,61), tačiau mažesnėje, testavimo imtyje, nenustatytas statistiškai patikimas ryšys su išgyvenamumu, o didžiausiu AUC testavimo imtyje prognozuojant penkerių metų išgyvenamumą pasižymėjo *ZFPL1* genas (AUC = 0,64) (**Pav. 3.25**).









ROC kriterijai

Prognostinis tikslumas 5 metų išgyvenimui

Biožymuo	Laikas_dienom	AUC	Jautrumas	Specifiškumas
EXO1	1825	0.445	0.899	0.130
RAD50	1825	0.538	0.698	0.420
PPT2	1825	0.370	0.098	0.928
LUC7L2	1825	0.419	0.065	0.942
PKP3	1825	0.564	0.362	0.797
CDCA5	1825	0.448	0.882	0.159
ZFPL1	1825	0.478	0.718	0.319
VPS33B	1825	0.425	0.962	0.043
GRB7	1825	0.614	0.419	0.826
TCEAL4	1825	0.462	0.713	0.304
10 Genų raiškos rizikos balas	1825	0.681	0.540	0.754

ROC kriterijai

Prognostinis tikslumas 5 metų išgyvenimui

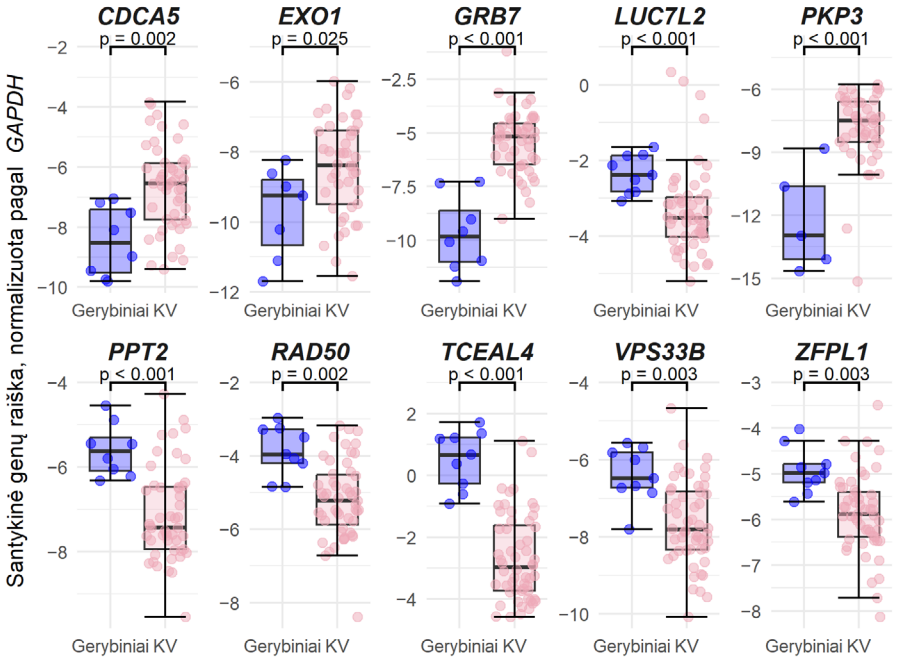
Biožymuo	Laikas_dienom	AUC	Jautrumas	Specifiškumas
EXO1	1825	0.578	0.480	0.824
RAD50	1825	0.394	0.113	1.000
PPT2	1825	0.501	0.845	0.353
LUC7L2	1825	0.528	0.777	0.353
PKP3	1825	0.395	0.669	0.412
CDCA5	1825	0.617	0.561	0.824
ZFPL1	1825	0.644	0.553	0.765
VPS33B	1825	0.524	1.000	0.118
GRB7	1825	0.547	0.311	0.941
TCEAL4	1825	0.572	0.734	0.529
10 Genų raiškos rizikos balas	1825	0.491	0.417	0.706

Pav. 3.25 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiškos modelio sąsaja su bendru išgyvenamumu: 10 genų raiškos biožymenų modelio Kaplan–Meier kreivė mokymosi (**A**) ir testavimo (**B**) imtyse, bei atskirų žymenų ir 10 genų raiškos biožymenų modelio nuo laiko priklausomos ROC kreivės, 5 metai po KV diagnozės mokymosi (**C**) ir testavimo (**D**) imtyse

3.2.2 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų tyrimas kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių audiniuose

Dešimties genų raiškos žymenų, atrinktų laisvos prieigos duomenų bazių analizės metu: *EXO1*, *RAD50*, *PPT2*, *LUC7L2*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B*, *GRB7* ir *TCEAL4* buvo analizuojami kiaušidžių vėžio pacienčių audinių imtyje.

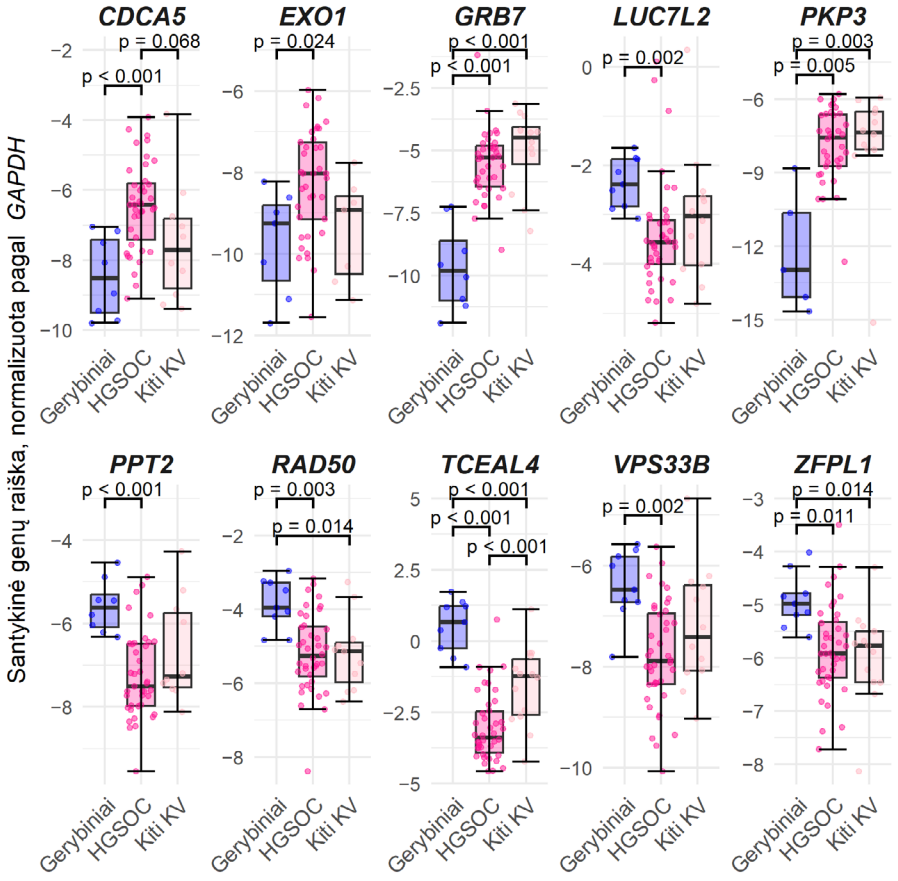
Visų dešimties genų raiška buvo statistiškai patikimai pakitusi KV atvejais palyginus su gerybinių pakitimų audiniais ($p < 0,03$), o raiškos pakitimai (sumažėjimas / padidėjimas) atitiko mokymosi ir testavimo imčių pakitimus. Genų *CDCA5*, *EXO1*, *GRB7* ir *PKP3* raiška buvo didesnė KV atvejais palyginus su gerybinių pakitimų audinių, o didžiausias skirtumas nustatytas *TCEAL4* geno atveju ($p < 0,001$, $\log_2SK = –4,14$) (**Pav. 3.26**).



Pav. 3.26 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiška KV audiniuose ir gerybinių pakitimų audiniuose

Palyginus HGSOC grupę su gerybinių pakitimų mėginiais, visų 10 genų raiška reikšmingai skyrėsi tarp šių grupių, *CDCA5*, *EXO1*, *GRB7* ir *PKP3* atveju didesnė HGSOC atvejais, o likusių genų – mažesnė, palyginus su gerybiniais pakitimais. Didžiausias raiškos skirtumas nustatytas *TCEAL4* geno raiškos atveju ($p < 0,001$, $\log_2SK = –4,24$). *GRB7*, *PKP3*, *RAD50*,

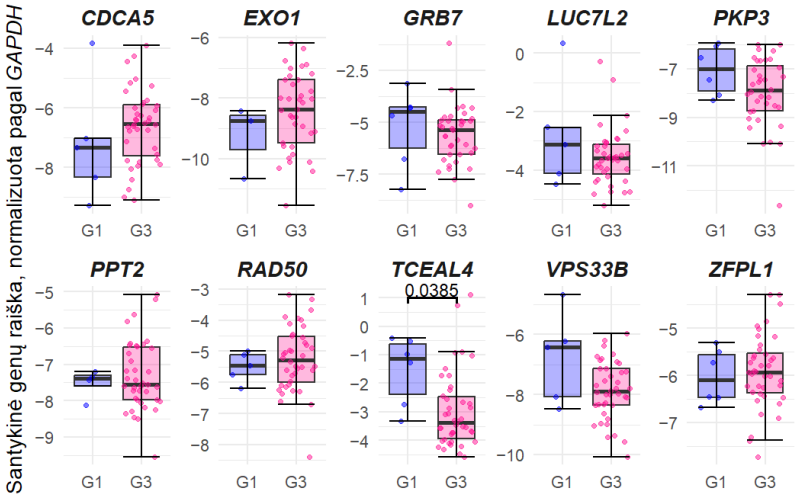
TCEAL4 ir *ZFPL1* raiška taip pat statistiškai patikimai skyrėsi tarp gerybinių pakitimų ir ne HGSOC tipo navikų grupių ($p \leq 0,01$), didžiausias skirtumas nustatytas *TCEAL4* atveju ($log_2SK = –2,11$). HGSOC atvejais palyginus su kitais KV, skyrėsi *TCEAL4* geno raiška ($p < 0,001$, $log_2SK = –0,75$), taip pat nustatyta *CDCA5* geno raiškos sumažėjimo kitų KV navikų grupėje lyginant su HGSOC tendencija ($p = 0,07$, $log_2SK = –1,24$) (**Pav. 3.27**).



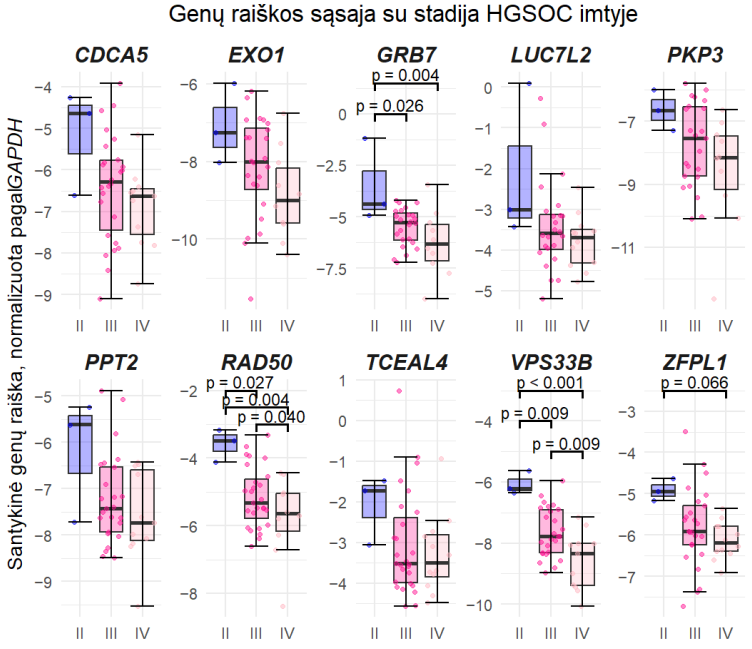
Pav. 3.27 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiška HGSOC audiniuose, ne HGSOC tipo (kitų KV) audiniuose ir gerybinių pakitimų audiniuose

Palyginus genų raišką tarp didelio naviko diferenciacijos laipsnio grupės (G3) ir mažo diferenciacijos laipsnio grupės (G1), statistiškai reikšmingas skirtumas nustatytas tik tarp *TCEAL4* geno raiškos G1 ir G3 navikų ($p = 0,04$, $log_2SK = –1,42$) (**Pav. 3.28**). HGSOC imtyje didesnės FIGO stadijos atvejais nustatyta sumažėjusi *RAD50*, *VPS33B* ir *GRB7* genų raiška ($p < 0,04$). *RAD50*

ir *VPS33B* atvejais, nustatytas skirtumas tarp visų trijų stadijų grupių, o *GRB7* atveju nustatytas skirtumas tarp FIGO IV ir FIGO III stadijų atvejuose palyginus su FIGO II stadijos audiniais (atitinkamai p = 0,03, log_2SK = –2.08 ir p = 0,004, log_2SK = –2,77) (**Pav. 3.29**).

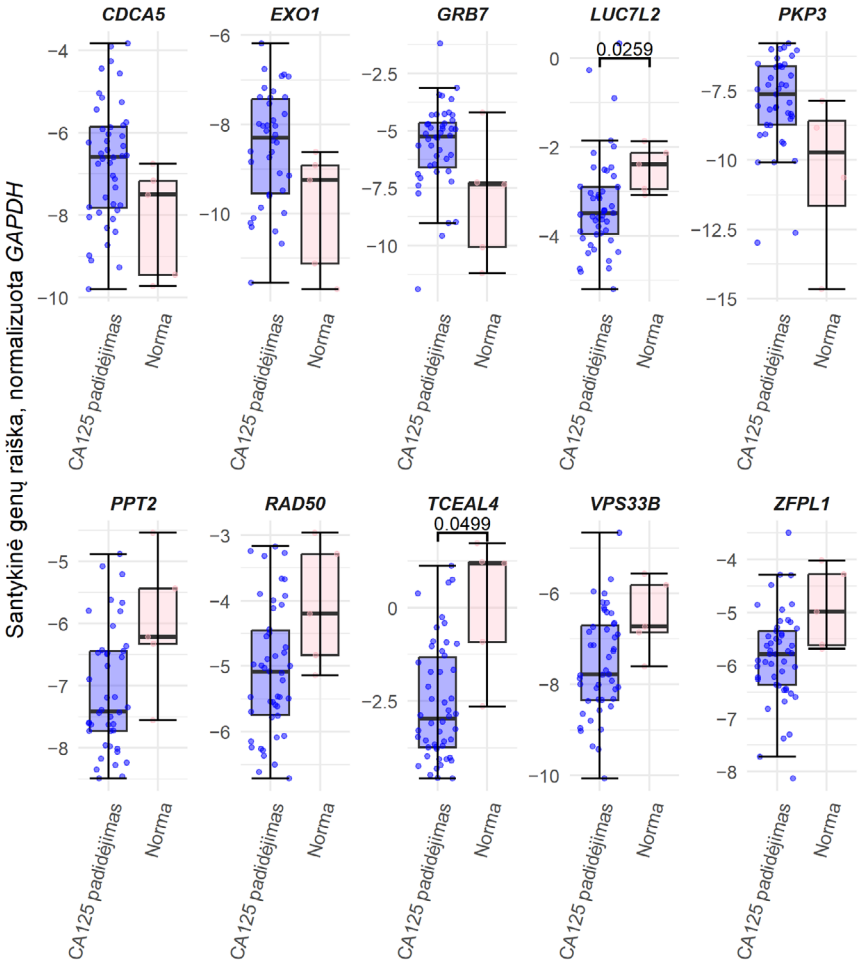


Pav. 3.28 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiška pagal naviko diferenciacijos laipsnį KV audiniuose

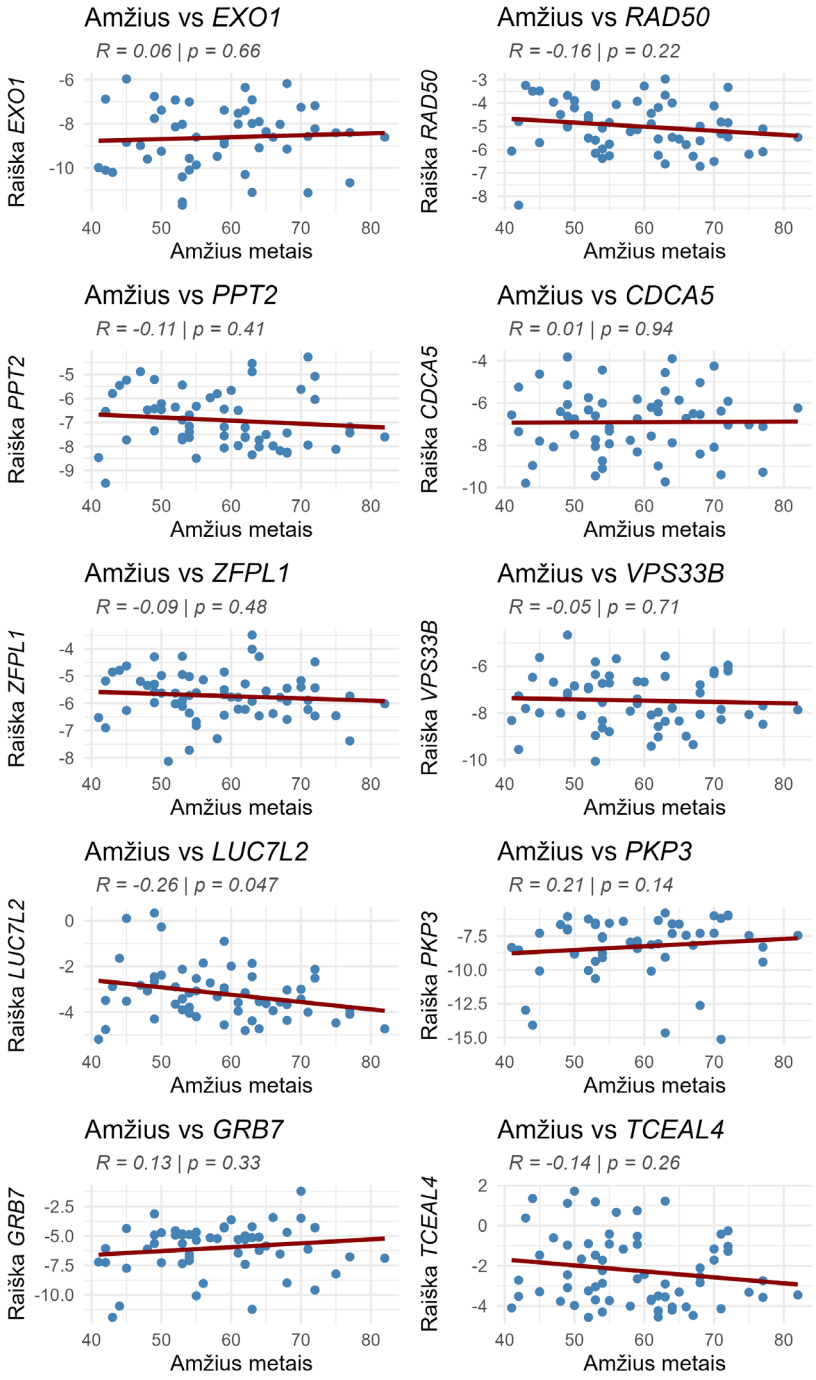


Pav. 3.29 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiška pagal FIGO stadiją HGSOC audiniuose

Genų raiškos sąsajos pastebėtos ir palyginus atvejus, kai pacientėms nustatytas CA125 serumo koncentracijos padidėjimas, su pacientėmis, kurioms nustatytas normalus šio biožymens kiekis: *LUC7L2* ir *TCEAL4* genų raiška buvo reikšmingai sumažėjusi palyginus su normalios CA125 serumo koncentracijos atvejais (*LUC7L2* p = 0,03, log_2SK = –1,08, *TCEAL4* p = 0,05, log_2SK = –3,36) (**Pav. 3.30**). Taip pat nustatyta silpna neigiama koreliacija tarp *LUC7L2* geno raiškos ir pacienčių amžiaus (R = – 0,26, p = 0,05) (**Pav. 3.31**).



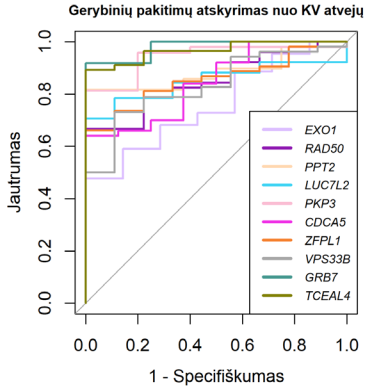
Pav. 3.30 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiška pagal CA125 serumo biožymens statusą. CA125 padidėjimas = CA125 > 35 U/ml



Pav. 3.31 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiška pagal pacienčių amžių kiaušidžių vėžio audinių imtyje

3.2.3 10–ties genų raiškos biožymenų diagnostinio potencialo įvertinimas

Analizuojant genų raiškos biožymenų diagnostinį potencialą – gebėjimą atskirti KV atvejus nuo gerybinių pakitimų didžiausiu plotu po kreive pasižymėjo *GRB7* geno raiška (AUC = 0,98), šis biožymuo taip pat pasižymėjo didžiausiu jautrumu (0,92) ir specifiškumu (1,00). Visi tirti genų raiškos biožymenys, išskyrus *VPS33B7* pasižymėjo 100 % specifiškumu, o mažiausias plotas po kreive nustatytas, palyginus su kitais 10 genų raiškos biožymenų buvo *EXO1* biožymens kreivei (AUC = 0,76), vis dėlto šis plotas po kreive statistiškai patikimai nesiskyrė nuo geriausiai KV nuo gerybinių pakitimų atskyrusio biožymens *GRB7* ploto po kreive (p = 0,07) (**Pav. 3.32**).



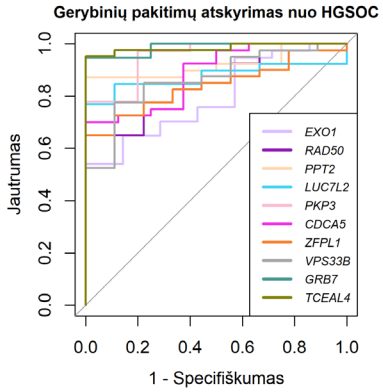
ROC kriterijai

Gerybinių pakitimų atskyrimas nuo KV atvejų

Biožymuo	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
GRB7	0.980	−7.253	0.930	0.918	1.000
TCEAL4	0.966	−0.927	0.908	0.893	1.000
PKP3	0.942	−8.791	0.830	0.812	1.000
PPT2	0.883	−6.344	0.842	0.816	1.000
ZFPL1	0.853	−5.617	0.710	0.660	1.000
RAD50	0.850	−4.866	0.717	0.667	1.000
LUC7L2	0.850	−3.078	0.750	0.706	1.000
CDCA5	0.845	−7.036	0.690	0.640	1.000
VPS33B	0.831	−6.875	0.754	0.731	0.889
EXO1	0.760	−8.186	0.549	0.477	1.000

Pav. 3.32 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų ROC kreivės ir kriterijai atskiriant kiaušidžių vėžio navikų grupę nuo gerybinių pakitimų audinių

Atskiriant HGSOC atvejus nuo gerybinių pakitimų didžiausiu plotu po kreive taip pat pasižymėjo *GRB7* geno raiška, kuri tik per 0,014 ploto vienetų atsiliko nuo pilno šių grupių atskyrimo (AUC = 0,986), šis biožymuo taip pat pasižymėjo didžiausiu jautrumu (0,946) ir specifiškumu (1,00). *TCEAL4* geno raiška taip pat beveik pilnai atskyrė HGSOC grupę nuo gerybinių atvejų ir nuo *GRB7* biožymens plotu po kreive nusileido tik per 0,02 ploto vienetų, tačiau pasižymėjo jautrumu (AUC = 0,984, jautrumas = 0,952, specifiškumas = 1,00). Mažiausias plotas po kreive atskiriant HGSOC atvejus nuo gerybinių pakitimų, palyginus su kitais 10 genų raiškos biožymenų buvo *EXO1* biožymens kreivės (AUC = 0,79), patikimai mažesnis už *TCEAL4* biožymens AUC (p = 0,02) (**Pav. 3.33**).



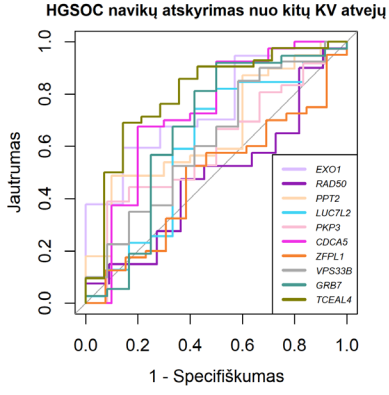
ROC kriterijai

Gerybinių pakitimų atskyrimas nuo HGSOC

Biožymuo	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
GRB7	0.986	−7.253	0.956	0.946	1.000
TCEAL4	0.984	−0.927	0.961	0.952	1.000
PKP3	0.950	−8.791	0.805	0.778	1.000
PPT2	0.920	−6.344	0.894	0.872	1.000
CDCA5	0.884	−6.898	0.750	0.700	1.000
LUC7L2	0.875	−3.078	0.812	0.769	1.000
VPS33B	0.864	−6.875	0.796	0.775	0.889
RAD50	0.847	−4.866	0.714	0.650	1.000
ZFPL1	0.839	−5.617	0.714	0.650	1.000
EXO1	0.795	−8.186	0.614	0.541	1.000

Pav. 3.33 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų ROC kreivės ir kriterijai atskiriant HGSOC navikų grupę nuo gerybinių pakitimų audinių

Kitus KV navikus nuo HGSOC atvejų geriausiai atskyrė *TCEAL4* geno raiška (AUC = 0,80, jautrumas = 0,69, specifiškumas = 0,86). Visi 10 analizuotų žymenų pasižymėjo gerokai mažesniu plotu po kreive atskiriant HGSOC nuo kitų KV atvejų, palyginus su atskyrimu nuo gerybinių pakitimų, tik *TCEAL4* biožymuo pasižymėjo plotu po kreive, statistiškai patikimai didesniu nei atsitiktinio klasifikatoriaus kreivė (AUC = 0,5) (p = 0,001) (**Pav. 3.34**).



ROC kriterijai

HGSOC navikų atskyrimas nuo kitų KV atvejų

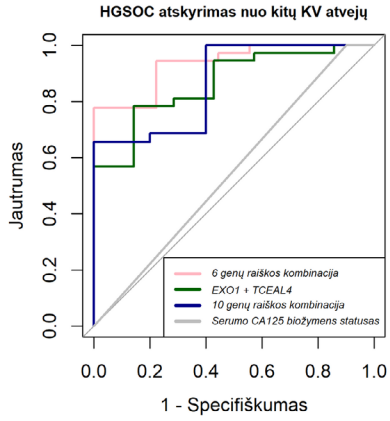
Biožymuo	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
TCEAL4	0.799	−2.791	0.732	0.690	0.857
EXO1	0.749	−8.407	0.636	0.595	0.857
CDCA5	0.730	−6.737	0.700	0.675	0.800
GRB7	0.662	−4.297	0.816	0.919	0.500
PPT2	0.656	−7.602	0.571	0.487	0.900
VPS33B	0.621	−6.706	0.750	0.850	0.417
LUC7L2	0.605	−3.135	0.706	0.744	0.583
PKP3	0.597	−8.318	0.521	0.389	0.917
RAD50	0.480	−5.464	0.510	0.475	0.636
ZFPL1	0.479	−5.894	0.547	0.525	0.615

Pav. 3.34 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų ROC kreivės ir kriterijai atskiriant HGSOC navikų grupę nuo kitų kiaušidžių vėžio tipų audinių

3.2.4 10–ties genų raiškos biožymenų kombinacijų diagnostinio potencialo įvertinimas

Kombinuojant genų raiškos biožymenis, geriausių dviejų biožymenų *GRB7* ir *TCEAL4* kombinacija pilnai (AUC = 1,00) atskyrė KV arba HGSOC nuo gerybinių navikų, kaip ir visų 10 genų raiškos kombinacija (**Priedų Pav. 11**). Iš viso 8 iš 45 galimų genų porų kombinacijų pilnai atskyrė HGSOC nuo gerybinių navikų (6 iš jų su *GRB7*) (**Priedų lentelė 3**), o KV nuo gerybinių navikų su AUC = 1,00 atskyrė tik 7 kombinacijos (**Priedų lentelė 4**).

Nei vienas iš analizuotų genų rinkinių nepasiekė AUC = 1,00 atskiriant HGSOC nuo kitų KV atvejų. Didžiausią atskyrimą pasiekė *RAD50*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B* ir *TCEAL4* genų raiškos rinkinys, pasiekęs AUC = 0,94, jautrumą = 0,78 ir specifiškumą = 1,00. Ši genų raiškos biožymenų kombinacija pralenkė ir visų 10 genų raiškos kombinaciją, kuri pasiekė AUC = 0,87, jautrumą = 0,66 ir specifiškumą = 1, tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai patikimas (p = 0,49). Palyginus su geriausių dviejų HGSOC ir kitų KV atskyrimo biožymenų kombinacija (*EXO1* ir *TCEAL4*), 10 genų kombinacija pasižymėjo tik 0,004 ploto vienetų didesniu AUC, tačiau dviejų genų kombinacija pasižymėjo 12,8 % didesniu jautrumu, bet 14,3 % mažesniu specifiškumu (**Pav. 3.35**). Taigi didinant biožymenų kiekį modelyje, nebūtinai yra pasiekiamas didesnis prognostinis potencialas.



ROC kriterijai

HGSOC atskyrimas kitų KV atvejų

Biožymenys	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
6 genų raiškos kombinacija	0.935	0.808	0.822	0.778	1.000
EXO1 + TCEAL4	0.865	0.831	0.795	0.784	0.857
10 genų raiškos kombinacija	0.869	0.820	0.703	0.656	1.000
Serumo CA125 biožymens statusas	0.550	0.500	0.809	1.000	0.100

Pav. 3.35 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų kombinacijų ROC kreivės ir kriterijai atskiriant HGSOC navikų grupę nuo ne HGSOC (kitų KV) atvejų. 6 genų raiškos kombinacija: *RAD50*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B* ir *TCEAL4*

Palyginus visus 24 ROC analize analizuotus biožymenis, didžiausiu AUC atskiriant KV atvejus nuo gerybinių pakitimų pasižymėjo *GRB7* (AUC

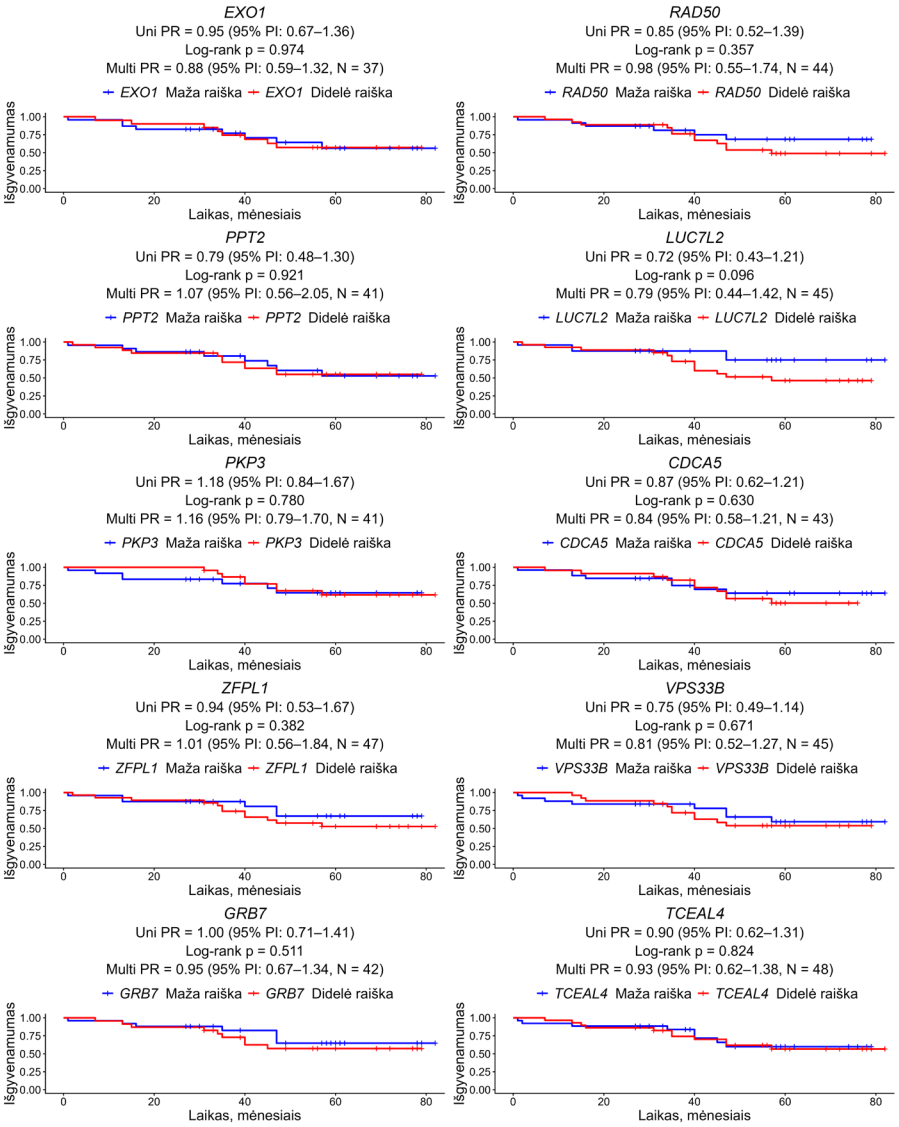
= 0,98) ir *TCEAL4* (AUC = 0,97), tačiau *GRB7* tik 0,03 ploto vienetų pralenkė geriausią hipotezėmis atrinktą biožymenį *CTNNB1* (AUC = 0,95). Nors visi minėti genai pasižymėjo idealiu specifiškumu, tačiau jų tikslumą nulėmė jautrumas, kuris *GRB7* atveju buvo didžiausias (**Pav. 3.13** ir **Pav. 3.32**).

Atskiriant HGSOC nuo gerybinių pakitimų audinių, taip pat gauti analogiški rezultatai kaip ir su bendra KV imtimi: *GRB7* (AUC = 0,99, jautrumas = 0,95, specifiškumas = 1) ir *TCEAL4* (AUC = 0,98, jautrumas = 0,95, specifiškumas = 1) geriausiai atskyrė HGSOC nuo gerybinių pakitimų audinių, tačiau *TCEAL4* tik 0,02 ploto vienetų pralenkė geriausią hipotezėmis atrinktą biožymenį *CTNNB1* (AUC = 0,97, jautrumas = 0,91, specifiškumas = 1). Tačiau palyginus geriausiai HGOSC nuo gerybinių pakitimų atskyrusį biožymenį *GRB7* su kitais analizuotais biožymenimis, jo ROC kreivės pranoko visų promotorių metilinimo biožymenų, 4 / 10 hipotezėmis atrinktų biožymenų (*ARID1A*, *NOCTH1*, *NOTCH3* ir *JAG2*) ir tik 3 statistiniais metodais parinktų biožymenų (*RAD50*, *LUC7L2* ir *ZFPL1*) gebėjimą atskirti šias grupes ($p < 0,05$). Apibendrinant, statistiniais metodais atrinkti biožymenys pasiekė AUC > 0,80, kai tik 6 / 14 hipoteze pasirinktų genų biožymenų pasiekė atitinkamą AUC (**Pav. 3.14** ir **Pav. 3.33**).

Priešingai, palyginus prognostinį potencialą atskiriant HGSOC nuo kitų tipų KV atvejų, vieninteliu AUC > 0,80 pasižymėjęs pagal hipotezes atrinktas biožymuo: *HES1* geno raiška (AUC = 0,83, jautrumas 0,88, specifiškumas 0,71), pasižymėjo 0,03 didesniu AUC, nei geriausiai šias grupes atskyręs statistiniais metodais pasirinktas biožymuo *TCEAL4* (AUC = 0,80, jautrumas = 0,69, specifiškumas = 0,86). *HES1* statistiškai patikimai geriau atskyrė HGSOC nuo kitų KV atvejų nei visi promotorių metilinimo žymenys ir 11 / 19 genų raiškos žymenų (tik *NOTCH1–4*, *FBXW7*, *CDCA5*, *EXO1* ir *TCEAL4* ROC kreivės statistiškai patikimai nesiskyrė nuo *HES1* kreivės) (**Pav. 3.15** ir **Pav. 3.34**). Taigi tiek statistiniais metodais, tiek hipotezėmis paremtas potencialių biožymenų parinkimas geba atrinkti žymenis, potencialiai tinkamus KV diagnostikai ir prognostikai.

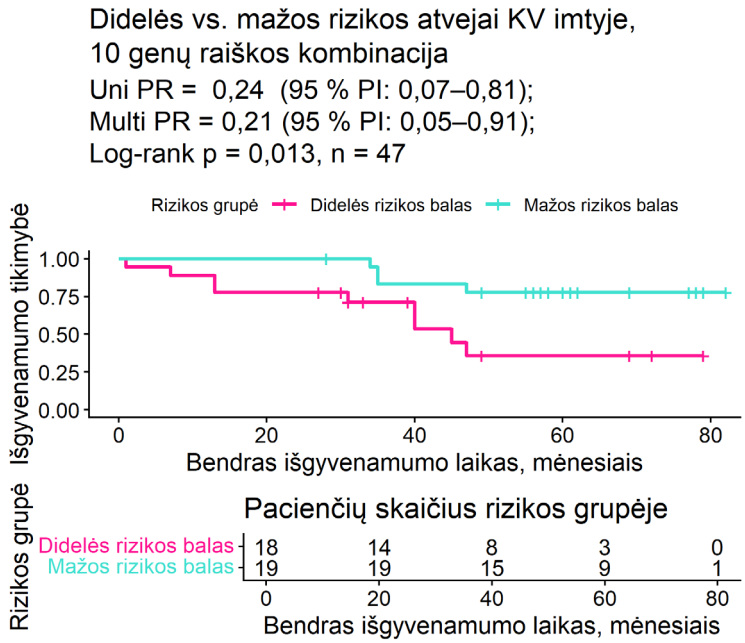
3.2.5 10–ties genų raiškos biožymenų kombinacijų prognostinio potencialo įvertinimas

Nei vieno iš 10−ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų sąsaja su bendru KV pacienčių išgyvenamumu nepasiekė statistiškai patikimo ryšio. Visų analizuotų genų, išskyrus *PKP3,* mažesnė raiška buvo siejama su geresniu išgyvenamumu (PR < 1, o *PKP3* PR = 1,18, 95 % PI: 0,84−1,67) (**Pav. 3.36**). Statistiškai patikimų sąryšių su išgyvenamumu nenustatyta ir HGSOC pacienčių imtyje (**Priedų pav. 12**).



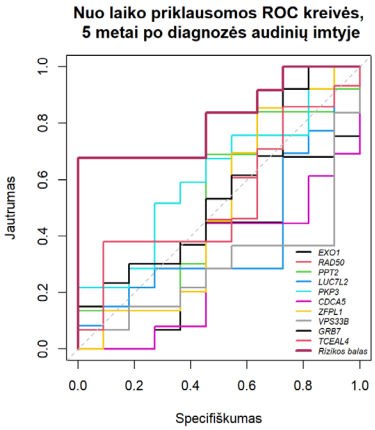
Pav. 3.36 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų išgyvenamumo analizė HGSOC grupėje Kaplan–Meier kreivėse didelė raiška = daugiau už medianą, maža raiška = mažiau už geno raiškos medianą. Sutrumpinimai: *Uni PR* = vienmatės kokso analizės PR; *Multi PR* = daugiafaktorinės kokso analizės PR, koreguojant pagal amžių ir CA125 koncentraciją diagnozės metu

Kombinuojant visus 10 statistiniais metodais atrinktus genų raiškos biožymenis, toks modelis statistiškai patikimai (p = 0,01) siejosi su bendru išgyvenamumu. Genų raiškos kombinacija buvo susijusi su didesne mirties rizika tiek atskirai, tiek kombinacijoje su amžiumi ir CA125 koncentracija diagnozės metu (PR = 0,24, 95 % PI: 0,07−0,81, o atsižvelgiant į klinikinius žymenis PR = 0,21, 95 % PI: 0,05−0,91) (**Pav. 3.37**).



Pav. 3.37 10−ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos kombinacijos sąsaja su išgyvenamumu. Uni: vienmatis Kokso modelis, Multi: Daugiaparametris Kokso modelis, atsižvelgiant į amžių ir CA125 koncentraciją diagnozės metu

Analizuojat 10 genų kombinacijos prognostinį potencialą, bendras rizikos balas pranoko visų 10 genų gebėjimą prognozuoti 5−kerių metų išgyvenamumą (rizikos balo AUC = 0,82, jautrumas = 0,68, specifiškumas = 1,00, o didžiausią AUC pasiekusio pavienio žymens *GRB7* AUC = 0,56, jautrumas = 0,92, specifiškumas 0,27) (**Pav. 3.38**).



ROC kriterijai

Prognostinis tikslumas 5 metų išgyvenimui

Biožymuo	Laikas_mėn	AUC	Jautrumas	Specifiškumas
EXO1	60	0.354	0.369	0.636
RAD50	60	0.497	0.218	0.909
PPT2	60	0.515	0.690	0.545
LUC7L2	60	0.395	1.000	0.091
PKP3	60	0.616	0.516	0.727
CDCA5	60	0.295	0.000	1.000
ZFPL1	60	0.495	0.853	0.364
VPS33B	60	0.295	0.068	1.000
GRB7	60	0.556	0.920	0.273
TCEAL4	60	0.527	0.381	0.909
10 Genų raiškos rizikos balas	60	0.816	0.677	1.000

Pav. 3.38 10−ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos ir šių biožymenų kombinacijos nuo laiko priklausomos ROC kreivės ir kriterijai

Nors pavieniai biožymenys neparodė statistiškai patikimo ryšio su išgyvenamumu, biožymenų kombinacija, kaip ir mokymosi imtyje, rodė sąsają su išgyvenamumu. Lietuvoje gydytų pacienčių kiaušidžių audinių imtyje biožymenų kombinacija pralenkė 5−kerių metų išgyvenamumo prognozę palyginus su didesnėmis TCGA−OV mokymosi ir testavimo imtimis (**Pav. 3.38** ir **Pav. 3.25**). Be to, 10−ties statistiniais metodais atrinktų genų kombinacija pralenkė ir 14 hipotezėmis atrinktų genų kombinaciją prognozuojant 5−kerių metų išgyvenamumą 0,05 ploto vienetų ir nors 2 % nusileido jautrumu, pasiekė 100 % specifiškumą, kuris 14 biožymenų modelyje buvo 27 % mažesnis (**Pav. 3.38** ir **Pav. 3.22**). Taigi, nors atskiri hipotezėmis parinkti biožymenys pasižymėjo statistiškai patikimu ryšiu su bendru išgyvenamumu, statistiniais metodais atrinktų biožymenų kombinacija pralenkė kitas biožymenų kombinacijas prognozuojant 5−kerių metų išgyvenamumą, todėl duomenimis paremtas biožymenų atrinkimas yra racionalus metodas, gebanti parinkti žymenis, turinčius diagnostinį ir prognostinį potencialą.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1 Notch ir Wnt signalinių kelių genų raiškos ir mutacijų palyginimas su kitais tyrimais

Notch ir Wnt yra svarbūs ląstelių signalo perdavimo keliai, reikalingi ne tik vystymuisi, bet kancerogenezei. KV atveju, šie keliai sąveikauja tarpusavyje: IGROV1 ir SKOV3 KV ląstelių linijose, Wnt kelio pagrindinio baltymo β–katenino inhibicija ICG-001 molekule padidino Notch ligando *JAG1* ir taikininių genų *HES1* ir *HEY1* raišką, o abiejų kelių inhibicija turėjo tokį patį neigiamą efektą ląstelių migracijai ir proliferacijai, kaip ir Wnt signalinio kelio inhibicija. Notch signalinio kelio inaktyvacija DAPT molekule, taip pat sumažino β–katenino raišką. Wnt ir Notch signalinių kelių aktyvacija yra siejama su EMT ir atsparumu chemoterapijai, todėl šių kelių inhibicija yra potencialus taikinys gydymui, siekiant padidinti chemoterapijos efektyvumą (Bocchicchio *et al*., 2019). Wnt ubikvitino ligazė FBXW7 taip pat yra svarbi KV ląstelių proliferacijai ir migracijai. FBXW7 baltymo lygis KV ląstelių linijose nustatomas mažesnis nei normaliose kiaušidžių ląstelėse, o jo kiekio padidėjimas sumažina β–katenino ir c–Myc baltymų lygį bei padidina VEGF kiekį (Zhong *et al*., 2021).

KV atveju Wnt signalinis kelias dažniausiai yra valdomas aktyvuojančių mutacijų, įprastai nustatomų β–katenino geno *CTNNB1* 3 egzone ir lemiančių lengvesnį β–katenino persikėlimą į branduolį. *CTNNB1* mutacijos dažniausios endometrioidinio tipo KV atvejais: net 43 % endometrioidinio tipo KV pasižymi *CTNNB1* mutacijomis, didžiausiu skaičiumi palyginus su *ARID1A* (36 %) bei PI3K kelio genų mutacijomis (*PIK3CA* 34 %, *PTEN* 29 %, *KRAS* 26%). KV atvejai su *CTNNB1* mutacijomis, dažniausiai yra nustatomi ankstyvuose (FIGO I / II) KV atvejuose (89 %), nepasižyminčiuose *TP53* mutacija, todėl yra siejami su gera prognoze (SR = 0,23, 95 % PI: 0,10 – 0,56, p = 0,01) (Hollis *et al*., 2020). *FBXW7* geno mutacijos nustatomos apie 2,5–8,3 % KV atvejų, specifiškai seroziniuose paribiniuose kiaušidžių navikuose, tačiau inaktyvacija siejama ne tik su mutacijomis, bet taip pat ir su promotorių metilinimu (Di Fiore *et al*., 2023). Tyrimo metu KV audiniuose nebuvo nustatyta nei vieno *FBXW7* pakitimo, galimai dėl palyginti retų šio geno pakitimų KV atvejuose. Nors nenustatyta *FBXW7* pakitimų, *CTNNB1* aktyvuojančios mutacijos buvo nustatytos 2 / 9 ne HGSOC tipo navikuose, vienu atveju endometrioidinio tipo navike (iš viso sekoskaitos metodu analizuoti du endometrioidinio tipo KV atvejai, todėl pakitimų skaičius atitinka literatūros duomenis), kitu atveju – šviesių ląstelių kiaušidžių navike.

Šviesių ląstelių KV atvejais *CTNNB1* mutacijos nustatomos apie 3 % atvejų (Kuo *et al*., 2009), todėl nustatytas pakitimas yra gana retas tirtoje KV grupėje.

Notch signalinio kelio reguliaciniai pakitimai nustatomi ir TCGA–OV / GTEx imtyje: *DLL1*, *JAG1* ir *NOCTH4* iRNR kiekis, kaip ir šio tyrimo imtyje buvo nustatytas statistiškai patikimai mažesnis navikiniuose audiniuose, palyginus su normalių kiaušidžių audiniais, o *HES1*, *JAG2*, *NOCTH1* ir *NOTCH3*, priešingai nei šio tyrimo imtyje – padidėjęs. Vienintelio *NOTCH2* iRNR kiekis KV atvejais statistiškai patikimai nesiskyrė nuo normalių kiaušidžių GTEx imties. ROC analizė TCGA–OV / GTEx tyrime parodė didesnius AUC nei šio tyrimo metu: *NOTCH3* = 0,739, *NOTCH4* = 0,948 ir *JAG2* = 0,769, o likusių Notch kelio genų AUC šiame tyrime buvo didesnis, palyginus su TCGA–OV / GTEx imtimi kur AUC buvo: *DLL1* AUC = 0,823, *HES1* AUC = 0,642, *NOTCH1* AUC = 0,602, *NOTCH2* = 0,532. TCGA–OV imtyje sumažėjusi *DLL3* ir *NOTCH4* raiška koreliavo su FIGO stadija (atitinkamai $p < 0,001$ ir 0,04), o padidėjusi *NOTCH3* raiška koreliavo su rase ir amžiumi (abiem atvejais $p = 0,04$). Mūsų tyrime priešingai – vieninteliai *NOTCH1* ir *NOTCH2* raiška buvo susijusi su HGSOC navikų stadija. Nors mūsų tyrime vieninteliai su išgyvenamumu statistiškai patikimai susiję biožymenys buvo *HES1* ir *NOTCH3* genų raiška, TCGA analizėje, tik *JAG2* ir *NOCTH1* siejosi su intervalu iki progresijos (angl. *progression–free interval*, atitinkamai $p = 0,01$ ir $p = 0,04$), o *DLL1* ir *NOTCH1* daugiaparametrinėje analizėje parodė gebėjimą prognozuoti intervalą iki atkryčio (SR = 2,10, $p < 0,001$, ir SR = 0,71, $p = 0,04$). Nors TCGA duomenų analizėje ne visi iRNR biožymenys rodė statistiškai patikimus ryšius su KV ar ligos klinikiniais rodikliais, tačiau beveik visų analizuotų genų atvejais nustatyta statistiškai patikima teigiama *Pearson'o* koreliacija tarp Notch signalinio kelio genų, išskyrus *DLL3* ir *NOTCH2* – nustatyta neigiama koreliacija tarp šių genų raiškos (B. Chen et al. 2023). Panašaus TCGA–OV / GTEx tyrimo metu nenustatyta statistiškai patikimo skirtumo *CTNNB1* iRNR kiekyje, tačiau kaip ir šio tyrimo atveju, nustatytas ryšys su FIGO stadija ($p = 0,03$) (AmeliMojarad *et al*., 2023).

Nors šiuo metu nėra publikuotų TCGA–OV ir GTEx *FBXW7* iRNR analizių, 126 kiaušidžių navikų analizė parodė statistiškai patikimai mažesnį *FBXW7* iRNR kiekį KV atvejais palyginus su gerybinais pakitimais ir paribiniais navikais ($p < 0,01$), mažiausia raiška palyginus tarp navikų histologinių grupių buvo nustatyta seroziniuose navikuose, o didžiausia – mucininiuose ir statistiškai patikimai skyrėsi tarp visų histologinių grupių ($p = 0,0005$). *FBXW7* raiška taip pat rodė skirtumo tendenciją palyginus FIGO I stadijos navikus su II, III ir IV stadijos grupėmis ($p = 0,05$). Sumažėjusi *FBXW7* raiška KV atvejais bei sąsaja su stadija nustatyta ir šiame tyrime.

Įdomu, jog *FBXW7* raiška nustatoma statistiškai patikimai mažesnė KV atvejais su *TP53* mutacijomis: šiais atvejais nustatomas *FBXW7* promotoriaus metilinimas. *TP53* mutacijos yra siejamos su DNMT1 baltymo raiškos padidėjimu, kuris gali metilinti genų promotorius, o eksperimentiniai duomenys rodo jog *FBXW7* promotorius yra vienas iš jų (Kitade *et al*., 2016).

4.2 Geno *ARID1A* raiškos ir mutacijų bei promotoriaus metilinimo palyginimas su kitais tyrimais

ARID1A yra antras dažniausiai mutavęs genas daugelyje navikų. ARID1A baltymas dalyvauja daugelyje ląstelės procesų, kurie gali būti išnaudoti kuriant naujas terapines galimybes. Pavyzdžiui, ARID1A ir p53 funkcinė priklausomybė atveria galimybes kurti naujas sintetinio letalumo principu paremtas terapines strategijas. Kadangi navikuose su sutrikusiu *ARID1A* nustatoma mažesnė p21 raiška, didesnė proapoptotinių genų *PUMA* ir *NOXA* raiška, mažesnis Chk2 fosforilinimas, todėl p53 reaktyvacija yra potenciali gydymo strategija *ARID1A* mutacijas turinčiuose navikuose (Z. Wang *et al*., 2024). Navikuose, kuriuose trūksta funkcionalaus ARID1A baltymo nustatomi PI3K ir Wnt kelių reguliacijos pakitimai, bendras chromatino struktūros pakitimas, dažnesnis DNR pažaidų kiekis, mikrosatelitų nestabilumas, didesnė programuotos mirties ligando 1 (PD–L1) raiška, didesnė limfocitų infiltracija į navikus, todėl yra daug terapinių galimybių tokiems navikams. Šiuo metu aktyviai vykdomi I / II fazės klinikiniai tyrimai su *ARID1A* mutacijas turinčiais navikais taikant įvairias gydymo strategijas nuo PARP, ATR inhibitorių (DNR pažaidų taisymo kelias), PI3K inhibitorių (dėl PI3K kelio aktyvacijos *ARID1A* mutacijas turinčiuose navikuose ir dažnų komutacijų PI3K kelio genuose), epigenetinių terapijų BET, EZH2, HDAC inhibitoriais, iki imuninės patikros taškų inhibitorių, kurie yra efektyvesni *ARID1A* mutacijas turinčiuose navikuose. Nors šiuo metu dar nėra *ARID1A* mutacijas turintiems navikams patvirtintų taikininės terapijos vaistų, tačiau klinikinių tyrimų rezultatai suteikia vilties ją turėti ateityje (Hein *et al*., 2024).

ARID1A yra vienas pagrindinių genų, koduojančių chromatino remodeliacijos komplekso SWI/SNF pamatinį baltymą. *ARID1A* yra antras dažniausiai mutuotas genas KV, jo mutacijos yra dažniausios šviesių ląstelių karcinomos atvejais (iki 70 %) (Yachida *et al*., 2020), tačiau itin retos serozinio KV atvejais, kadangi *ARID1A* pakitimai retai nustatomi kartu su *TP53* mutacijom, kurios yra randamos didžiojoje dalyje HGSOC navikų. Pats SWI/SNF kompleksas jungiasi su p53 per ARID1A baltymo C galą, o toks kompleksas jungiasi prie *CDKN1A* ir *SMAD3* promotorių, taigi *ARID1A* kartu

su *TP53* apsaugo ląsteles nuo kancerogenezės aktyvuodami navikų supresorius (Guan *et al*., 2011). *ARID1A* geno sąsaja su *TP53* taip pat gali būti vienas iš veiksnių, paaiškinančių *ARID1A* mutacijų teigiamą koreliaciją su ilgesniu išgyvenamumu – šiame tyrime KV atvejai su *ARID1A* mutacijom pasižymėjo gerokai ilgesniu išgyvenamumu, nei atvejai be mutacijų. Be to, *ARID1A* mutacijas turinčioms pacientėms rečiau pasireiškia atsparumas vaistams ir galima taikyti daugiau skirtingų gydymo strategijų (Hein *et al*., 2024).

ARID1A mutacijos dažniausiai lemia iRNR ir baltymo kiekio sumažėjimą (p = 0,03) (Shen *et al*., 2018). tačiau ši sąsaja nustatoma ne visais atvejais: manoma jog ARID1A baltymo raiškos praradimui reikalinga abiejų alelių inaktyvacija, galimai ne tik per mutacijas, bet ir per epigenetinius mechanizmus (Yachida *et al*., 2020). ARID1A baltymo raiškos praradimas taip pat negali būti paaiškintas vien mutacijomis: 11 % šviesių ląstelių ir 9 % endometrioidinio tipo KV atvejų neturi ARID1A baltymo raiškos nepaisant to, kad šiuose atvejuose nenustatytos *ARID1A* geno mutacijos (Wiegand *et al*., 2010). Nors atlikto tyrimo metu nebuvo nustatyta statistiškai patikimų *ARID1A* geno raiškos sąsajų nei su geno promotoriaus metilinimu, nei su mutacijomis, tačiau abiem atvejais nustatytas šiek tiek mažesnis *ARID1A* iRNR raiškos lygis atvejuose su promotoriaus metilinimu ar geno sekos pakitimais. Todėl nustatytoms sąsajoms įvertinti reikėtų atlikti didesnio masto eksperimentus bei įvertinti ARID1A baltymo raišką, tačiau galima pastebėti, jog tiek mutacijos, tiek promotoriaus metilinimas gali turėti įtaką *ARID1A* geno raiškai.

Nors *ARID1A* atveju nėra publikuotų kPGR ar RNR sekoskaitos rezultatų kiaušidžių navikų mėginiuose, *ARID1A* iRNR analizė *in situ* hibridizacijos metodu 63 šviesių ląstelių KV ir 43 endometrioidinio tipo KV FFPE audinių imtyje nustatė nedidelę *ARID1A* raišką 46 % šviesių ląstelių KV ir 35 % endometrioidinio tipo, kai endometriozės grupėje (n = 30) nedidelė *ARID1A* raiška nustatyta tik 30 % atvejų. Šviesių ląstelių KV grupėje *ARID1A* iRNR koreliavo su FIGO stadija (p = 0,03) ir bendru išgyvenamumu (p = 0,04) (Liu *et al*., 2017). Pilotinio tyrimo metu analizuojant *ARID1A* iRNR raišką kontroliniuose (13 atvejų, gimdos kūno audiniai) su endometrioze susijusiais KV (4 atvejai, šviesių ląstelių ir endometrioidinis KV) ir su endometrioze nesusijusiais KV (6 atvejai, serozinis ir mucininis KV) nustatytas raiškos sumažėjimas su endometrioze susijusiuose KV atvejuose (p = 0,02), tačiau patikimo raiškos padidėjimo mucininiuose ir seroziniuose navikuose nenustatyta (Winarto *et al*., 2017).

Sekoskaitos tyrimų metu Lietuvoje gydytų KV pacienčių imtyje (n = 50) nustatėme *ARID1A* sekos pakitimus 19 % (6 / 32) HGSOC ir 67 % (6 / 9) kitų

KV atvejų. Nors šie pakitimai nebuvo aprašyti kaip patogeninės mutacijos *ClinVar* duomenų bazėje, 4 /10 nustatytų pakitimų yra rėmelio poslinkio ar *nonsense* mutacijos, taigi turi didelę tikimybę sutrikdyti baltymo seką. Taip pat dviejuose atvejuose – viename šviesių ląstelių KV ir viename endometrioidinio tipo KV atvejuose, kartu su *ARID1A* sekos pakitimais, nustatytos patogeninės *CTNNB1* mutacijos. *FBXW7* geno mutacijų KV audiniuose nenustatėme, kaip ir šių tirtų genų mutacijų gerybinių pakitimų audiniuose. Greta *ARID1A* nustatyti pakitimai *CTNNB1* nestebina: tik *ARID1A* pakitimų dažnai nepakanka KV formavimuisi, todėl šalia *ARID1A* mutacijų dažnai pastebimi kitų signalinių kelių genų, ypač PI3K signalinio kelio genų *PIK3CA* ir *KRAS* komutacijos, tačiau dažni ir kitų genų pakitimai (Yachida *et al*., 2020).

Šiame darbe, tiek gerybinių pakitimų, tiek KV audiniuose nustatytas panašus *ARID1A* promotoriaus metilinimo statusas (atitinkamai 43 ir 44 %). HGSOC atvejais, nustačius *ARID1A* geno raiškos sąsajos su FIGO stadija tendenciją ($p = 0,05$), *ARID1A* promotoriaus metilinimo statuso analizėje taip pat nustatyta teigiama sąsaja su FIGO stadija ($p = 0,048$), kur didžiausios stadijos (FIGO IV) navikuose nustatyta didžiausias metilintų atvejų skaičius ir mažiausia raiška. Palyginus metilinimo tyrimų rezultatus su kitų autorių darbais, *ARID1A* sumažėjusi raiška ir teigiamas promotoriaus metilinimo statusas nustatomas endometriozės atvejais, palyginus su normaliu gimdos audiniu (30 porinių atvejų). Endometriozės ląstelėse padidėjęs ROS kiekis lėmė didesnę *DNTM1* iRNR ir baltymo raišką, kuri koreliavo su didesniu *ARID1A* promotoriaus metilinimu (Xie *et al*., 2017). Nors šiuo metu literatūroje nėra tikslinių mokslinių studijų, kurios būtų analizavę *ARID1A* promotoriaus metilinimą KV atvejais, tačiau invazinės krūties latakėlių karcinomos atvejais, nustatyta ne tik sumažėjusi *ARID1A* geno raiška, palyginus su normaliais krūties audiniais (maža raiška nustatyta 58 % atvejų), bet ir statistiškai patikimai didesnis promotoriaus metilinimo statusas ($p < 0,001$) ir didesnis represyvios histonų žymės H3K27me3 dažnis (Zhang *et al*., 2013).

4.3 HOX šeimos genų promotorių metilinimo statuso palyginimas su kitais tyrimais

Tyrimo metu buvo pasirinkta tirti genų promotorių metilinimo statusus, kurie iki šiol nebuvo išsamiai aprašyti KV audiniuose. Visų trijų tirtų HOX šeimos genų promotorių metilinimas buvo statistiškai patikimai dažnesnis KV atvejuose, palyginus su gerybinių pakitimų audiniais ($p < 0,04$), kadangi *ALX4* ar *CDX2* promotorių metilinimu pasižymėjo vos po vieną gerybinių pakitimų

atvejį (atitinkamai kiaušidės cista ir gerybinė mucininė cistadenoma – gerybinis kiaušdidės navikas), o *HOPX* atveju nei viename iš gerybinių pakitimų nenustatytas promotoriaus metilinimas. Tiesa, ir KV atvejais šių genų metilinimas buvo nustatytas maždaug pusėje atvejų – didžiausias metilinimas nustatytas *CDX2* atveju (55 %), mažiausias – *HOPX* (39 %), o *ALX4* promotoriaus metilinimas nustatytas pusėje (50 %) navikų audinių.

ALX4 promotoriaus metilinimas iki šiol nustatytas MSP metodu 69,5 % (75 / 108) krūtų navikų, tačiau nenustatytas normaliuose krūties audiniuose (0 / 8) (Yang *et al*., 2017). Storosios žarnos navikuose *ALX4* promotoriaus metilinimas nustatytas 68 % (17 / 25) atvejų, tačiau tik 12 % (3 / 25) normalių pacientų kraujo mėginių, šis skirtumas buvo statistiškai patikimas ($p < 0,001$) ir atskyrė storosios žarnos vėžio pacientus su 88 % jautrumu ir 68 % specifiškumu (Salehi *et al*., 2015). Palyginus, mūsų tyrime, *ALX4* metilinimas atskyrė KV atvejus nuo gerybinių pakitimų su 50 % jautrumu, tačiau didesniu 89 % specifiškumu. Plaučių vėžio atveju *ALX4* promotoriaus metilinimas nustatytas panašiu dažniu kaip ir šiame darbe tirtoje kiaušidžių imtyje: 55 % (54 / 98) pirminių plaučių navikų ir nei viename iš normalių plaučių audinių (0 / 20) (Liu *et al*., 2014). TCGA ir GEO duomenų bazių kiaušidžių audinių metilinimo duomenų analizė parodė, jog *ALX4* promotoriaus metilinimas buvo vienas iš labiausiai su atsparumu chemoterapijai susijusių biožymenų (SR = 16.46, $p = 0,04$), tačiau platesnės *ALX4* metilinimo analizės iki šiol kiaušidžių navikuose nebuvo atlikta (Duan *et al*., 2024).

CDX2 geno promotoriaus metilinimas iki šiol tirtas storosios žarnos vėžio atveju ir siekė 71,67 % (43 / 60) storosios žarnos vėžio, 55 % (33 / 60) gerybinių pakitimų bei 16,67 % (10 / 60) sveikų pacientų grupėje ($p < 0,001$) ir koreliavo su *CDX2* geno raiška. *CDX2* metilinimo lygis taip pat teigiamai koreliavo su naviko stadija ir buvo nepriklausomas prognostinis veiksnys bendram išgyvenamumui (SR = 0,23, $p = 0,01$) (Wang *et al*., 2018). Plaučių vėžio atveju taip pat nustatytas *CDX2* promotoriaus metilinimas (55,45 %, 61 / 110 atvejų), tačiau nenustatytas nei viename iš 5 normalių plaučių audinių (Liu *et al*., 2012), taigi plaučių navikuose nustatomas panašus *CDX2* promotoriaus metilinimo dažnis kaip ir kiaušidžių navikuose.

HOPX geno promotoriaus metilinimas šio tyrimo KV audinių imtyje buvo mažiausias, palyginus su kitais genais, tačiau kituose navikuose nustatoma didesnis *HOPX* geno metilinimas: storosios žarnos vėžio atveju nustatytas metilinimas 62,5 % (10/16) navikuose, bet nei viename iš porinių normalių audinių (0 / 16), MSP metodu įvertintas *HOPX* metilinimo lygis gebėjo atskirti 99 storosios žarnos audinius nuo 98 normalių audinių su AUC = 0,85, 100 % specifiškumu, bet tik 56,6 % jautrumu (Katoh *et al*., 2012). Palyginus, šio tyrimo imtyje *HOPX* taip pat pasižymėjo nedideliu

jautrumu (39%) tačiau 100 % specifiškumu. Skrandžio vėžio atveju nustatytas *HOPX* promotoriaus metilinimas 84 % (67 / 80) navikų ir tik 10 % (8 / 80) normalių audinių ($p < 0,001$) (Ooki *et al*., 2010). *HOPX* promotoriaus metlinimas ir sumažėjusi geno raiška taip pat nustatyta ir krūties, galvos ir kaklo, gimdos kūno, kepenų bei skrandžio navikuose (Gokulan *et al*., 2022), todėl galima daryti išvadą, jog HOX genai yra ne tik KV bet ir daugelio navikų supresoriai.

4.4 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų palyginimas su kitais tyrimais

Ankstesnių tyrimų duomenimis, *EXO1* geno raiška buvo statistiškai patikimai didesnė moterų navikuose (krūties, gimdos kaklelio, kiaušidžių, gimdos kūno navikuose – TCGA kohortų kombinuotoje imtyje) palyginus su GTEx audiniais ($p < 0,001$), o kiaušidžių vėžio imtyje *EXO1* geno raiška gebėjo atskirti TCGA nuo GTEx imties su AUC = 0,993, tačiau *EXO1* sąsajų su klinikiniais rodikliais TCGA–OV imtyje nenustatyta (Yu & Wu, 2025). *EXO1* yra ne tik potencialus diagnostinis biožymuo, bet ir potencialus taikinys vėžio terapijoje: *BRCA1* mutacijas turinčiuose kiaušidžių navikuose yra nustatoma didesnė *EXO1* raiška, tai svarbu, nes navikai, praradę veikiančią *BRCA1*, turi pasikliauti viengrandžių trūkių DNR reparacijos sistema, kurioje dalyvauja ir *EXO1* koduojamas baltymas. Nuslopinus *EXO1* raišką *BRCA1* mutacijas turinčiose ląstelėse, trūktų dviejų reparacijos sistemų, todėl šios ląstelės neišgyventų (van de Kooij *et al*., 2024).

Kitas DNR pažaidų reparacijos genas, atrinktas regresijos algoritmų, *RAD50*, koduoja baltymą MRN (Mre11–Rad50–Nbs1) komplekse, atsakingame už dvigrandžių trūkių aptikimą ir ATM pritraukimą prie nutrūkusių DNR galų, todėl dalyvaujančiame nehomologiniame galų sujungime ir homologinės rekombinacijos reparacijoje. Apie 18 % KV pacienčių, kurioms nustatomos *BRCA1/2* genų mutacijos taip pat turi ir *RAD50* iškritą, kuri gali lemti sumažėjusią geno raišką: šie atvejai yra siejami su geresniu išgyvenamumu, o *RAD50* raiškos nuslopinimas padidiną ląstelių atsaką į olaparibą ir cisplatiną (Zhang *et al*., 2016).

PPT2, lizosomų baltymą, koduojančio geno raiška KV atvejais nustatyta statistiškai patikimai mažesnė ne tik šiame tyrime, bet ir TCGA–OV / GTEx analizėje ir dar keturiose GEO duomenų bazės duomenų rinkiniuose, bei patvirtinta 45 KV ir 9 normalių kiaušidžių audinių imtyje kPGR metodu ($p < 0,001$). Maža *PPT2* iRNR raiška TCGA, GEO ir tyrimo metu analizuotų pacienčių imtyse buvo susijusi su trumpesniu išgyvenamumu bei jautrumu chemoterapijai ir koreliavo su padidėjusiu imuniniu aktyvumu, imuninių

ląstelių infiltracija į audinį, todėl pacientės su sumažėjusia *PPT2* raiška galimai turėtų teigiamą atsaką į imunoterapiją. OVCAR8 ir OVCA433 ląstelių linijose *PPT2* sumažėjusi raiška didino ląstelių proliferaciją ir invaziją, todėl manoma, jog *PPT2* navikuose gali prisidėti prie metastazių skatinimo (Xu *et al*., 2024).

LUC7L2 geno, koduojančio RNR splaisingo baltymą, iRNR buvo įtraukta į KV prognostinio modelio, suformuoto iš RNR prisijungiančių baltymų iRNR, algoritmą. Pačio *LUC7L2* sumažėjusi raiška GSE3149 imtyje siejosi su mažesniu išgyvenamu (SR = 0,52, 95 % PI: 0,30–0,87, p = 0,01), o LUC7L2 baltymo raiška KV audiniuose buvo silpna (He *et al*., 2021), kaip ir *LUC7L2* geno raiška šio tyrimo imtyje.

Plakofilino 3 geno (*PKP3*), koduojančio desmosomų baltymus, funkcija dažnai yra siejama su ląstelių proliferacija, nes PKP3 baltymas gali susijungti su fosforilintu RB baltymu citoplazmoje, taip padidinant E2F1 transkripcijos veiksnio aktyvumą ir ląstelės tranziciją iš G1 į S fazę (Müller *et al*., 2023). *PKP3* raiškos analizė imunohistocheminiu metodu 157 KV audiniuose parodė *PKP3* raišką 81 navike (51,6 % atvejų), o didelė *PKP3* raiška buvo siejama su metastazėmis į limfmazgius, didesne FIGO stadija ir 14 mėnesių trumpesniu bendru išgyvenamumu (SR = 1,60, 95 % PI: 1,01–2,53, p = 0,04). Atitinkamai *PKP3* didesnė geno raiška taip pat buvo siejama su prastesniu išgyvenamumu ir šiame tyrime. GEPIA duomenų bazės analizės duomenimis *PKP3* geno padidėjusi raiška taip pat buvo susijusi su trumpesniu bendru išgyvenamumu (PR = 1,4, p = 0,004) (Qian *et al*., 2019). Plakofilinų (*PKP1*, *PKP2*, *PKP3*) iRNR raiška yra padidėjusi visuose KV tipuose nuo HGSOC iki mucininių, endometrioidinių, mucininių ir šviesių ląstelių navikų, o PKP3 baltymo raiška buvo susijusi su bendru išgyvenamumu, išgyvenamumu iki ligos atkryčio, naviką infiltruojančių limfocitų ir imunomoduliatorių kiekiu (Gao *et al*., 2020). Taigi *PKP3* raiška gali daryti įtaką pacienčių išgyvenamumui ir atsakui į imunoterapiją ir yra potencialus prognostinis KV biožymuo.

CDCA5 – ląstelės ciklo baltymą koduojantis genas, kurio raiška, kitų tyrimų metu taip pat nustatoma padidėjusi KV atvejais: imunohistochemijos analizė parodė CDCA5 baltymo raiškos padidėjimą 54 % (146 / 269) KV audinių, teigiama koreliacija nustatyta su FIGO stadija, likutiniu naviku ir serumo CA125 koncentracija. GSE17260 imtyje *CDCA5* raiška koreliavo tiek su bendru išgyvenamumu (SR = 1,55, p = 0,03), tiek su PFS (SR = 1,41, p = 0,02) (X. Chen *et al*., 2023). Toje pačioje studijoje 91 epitelinio kiaušidžių vėžio ir 30 normalių kiaušidžių audinių analizėje kPGR metodu nustatė reikšmingą ($p < 0,001$) raiškos padidėjimą KV atvejais. A2780 ir SKOV3 ląstelių linijose *CDCA5* raiška taip pat buvo nustatyta didesnė už normalių kiaušidžių ląsteles, o *CDCA5* raiškos nuslopinimas lėmė sumažėjusią ląstelių

proliferaciją ir sustabdė ląstelių ciklą G2/M stadijoje (X. Chen *et al*., 2023). *CDCA5* geno padidėjusi raiška nustatyta ir šiame darbe. Taigi *CDCA5* skatina su ląstelių proliferacija ir yra susijęs su ląstelės ciklo sutrikdymu, o baltymo ir geno raiška yra potencialūs prognostiniai ir diagnostiniai biožymenys.

Nors su Goldžio aparatu susijusio transkripcijos veiksnio *ZFPL1* raiška iki šiol itin mažai tirta moterų navikuose, gimdos kūno navikuose ir ląstelių linijoje RL95–2, *ZFPL1* geno ir baltymo padidėjusi raiška lėmė proliferaciją, galimai per PI3K/Akt signalinio kelio sutrikdymą (Cai *et al*., 2018) nors šiame tyrime nustatyta sumažėjusi geno raiška kiaušidžių navikuose, taigi geno bei baltymo raiška galimai priklauso ir nuo lokalizacijos.

Vakuolių baltymų sortiravimo veiksnį koduojančio geno *VPS33B* raiška taip pat menkai tirta KV atveju, nors šiame tyrime nustatyta mažesnė *VPS33B* raiška KV nei gerybiniuose pakitimuose, tačiau kitų tyrimų metu VPS33B baltymo raiška yra nustatoma padidėjusi KV audiniuose, palyginus su normaliu kiaušidžių audiniu (nustatyta 75,4 % KV ir 51,1 % normalių audinių, $p < 0,001$). Padidėjusi raiška buvo susijusi su ląstelės ciklo sutrikimu G1 stadijoje, SKOV3 ir OVCAR3 KV ląstelių augimu ir rezistentiškumu cisplatinai bei augimo veiksnio EGFR/PI3K/AKT/c-MYC/p53/miR–133a–3p kelio inhibicija (Ning *et al*., 2021). Geno raiškos skirtumai, palyginus šį darbą su kitais tyrimais, galėjo atsirasti dėl skirtingų kontrolinių mėginių arba mėginių imties skirtumų.

Augimo receptorius prisijungiantį baltymą koduojančio geno *GRB7* raiška nustatyta padidėjusi tiek šio darbo KV audinių imtyje, tiek TCGA–OV / GTEx, tiek ir GEO duomenų bazės studijose (GSE6008, GSE36668, GSE66957, $p < 0,001$), be to, baltymo raiška taip pat padidėjusi KV audiniuose remiantis *cProCite* duomenų bazės informacija. *GRB7* raiška TCGA duomenyse taip pat buvo susijusi su išgyvenamumu (PR = 0,66, $p = 0,002$). *GRB7* padidėjusi raiška teigiamai koreliavo su M2 makrofagų kiekiu todėl buvo laikoma imunosupresyvia: pelėse, veikiamose imuninės patikros taško blokados gydymu, *GRB7* raiška buvo sumažėjusi į terapiją nereguojančiose pelėse. OVCAR3 ląstelių linijoje *GRB7* išveiklinimas lėmė sumažėjusią ląstelių migraciją ir proliferaciją. Taigi *GRB7* yra potencialus taikinys siekiant padidinti KV ląstelių jautrumą imunoterapijai (Wen *et al*., 2024). SKOV3 ląstelių linijoje, auginamoje ant žmogaus venos endotelio ląstelių (HUVEC) *GRB7* raiškos slopinimas sumažino HUVEC ląstelių proliferaciją, migraciją, invaziją ir tubulių formavimąsi, per vaskuliarinio endotelio augimo veiksnio A (VEGFA) raiškos ir sekrecijos sumažinimą, todėl *GRB7* kiaušidžių ląstelėse galimai skatina angiogenezę ir yra potencialus taikinys terapinėms intervencijoms (Q. Xu *et al*., 2021). Daugelyje navikų *GRB7* padidėjusi raiška nustatoma kartu su kito onkogeno *ERBB2*, lokalizuoto

netoli *GRB7* genomo sekoje, padidėjusia raiška, kuri siejama su mažesniu išgyvenamumu ir didesne ligos atsinaujinimo rizika. *GRB7* / *ERBB2* koamplifikacija siejama su ląstelių proliferacija, migracija. *GRB7* yra laikomas potencialiu krūties vėžio atsinaujinimo biožymeniu, be to, kuriami peptidai, kurie jungtųsi prie *GRB7* ir inhibuotų *GRB7* signalinį kelią (Chu *et al*., 2019). KV atveju *GRB7* taip pat turi prognostinį potencialą, kadangi šis genas buvo įtrauktas į su streso–granulėm susijusių genų prognostinį algoritmą (Chen *et al*., 2024).

Transkripcijos elongacijos veiksnį koduojančio geno *TCEAL4* iRNR, kuri mūsų tyrime pasižymėjo sumažėjusia raiška KV atvejuose, taip pat buvo įtraukta į su hipoksija susijusių genų KV prognostinį algoritmą, sukurtą naudojantis GSE duomenų imtimis. *TCEAL4* raiška buvo nepriklausomas prognostinis biožymuo GSE duomenų imtyse (SR = 0,22, p = 0,005) (Sheng & Bai, 2022). *TCEAL4* taip pat buvo identifikuotas kaip vienas iš geriausių 100 genų, kurių raiška padidėjusi mucininio, endometrioidinio ir šviesių ląstelių tipų navikuose, palyginus su normaliais kiaušidžių audiniais naudojantis kombinuotais mikrogardelių duomenų rinkiniais (Chang *et al*., 2016).

4.5 Biožymenų kombinacijų palyginimas su kitais tyrimais

KV yra heterogeniška liga: net vienos histologinės grupės kiaušidžių navikai gali pasižymėti skirtingais genetiniais požymiais ir ligos eiga. Pavyzdžiui, nors *TP53* yra laikomas pagrindiniu HGSOC genetiniu požymiu, tačiau tik 79 % (23 / 29) tirtos imties HGSOC mėginių pasižymėjo šio geno patologinėmis mutacijomis (Žilovič *et al*., 2023). Pavieniai biožymenys dažnai pasižymi mažu jautrumu arba specifiškumu: jei biožymuo tiksliai nusako ligos fenotipą, toks biožymuo gali neatskirti ligos su netipiniais požymiais, tačiau biožymenys, kurie nusako bendras molekulines ligos priežastis, yra nespecifiški, jei molekuliniai mechanizmai, kuriuos biožymuo nusako, dalyvauja ir kituose organizmo procesuose (Heinzel *et al*., 2014). Kelių biožymenų, atspindinčių skirtingus ligos aspektus kombinacijos gali pasižymėti didesniu jautrumu ir specifiškumu, kadangi kombinuojant biožymenis sumažinama biožymens variabilumo rizika, bei ligos heterogiškumo keliama problema, kai to paties tipo navikai pasižymi skirtingais genetiniais pokyčiais.

Šio tyrimo metu logistinės ir kokso regresijos buvo panaudotos kombinuoti skirtingus biožymenis, remiantis hipoteze, jog keli biožymenys kartu turės didesnę diagnostinę ar prognostinę galią nei žymenys atskirai. Tokia logika jau naudojama diagnostiniuose KV algoritmuose kombinuojant

kraujo serumo biožymenis (pavyzdžiui CA125 ir HE4 kombinuojantis ROMA įvertis), tačiau iki šiol tokios kombinacijos nepasiekė 100 % specifiškumo, reikalingo diagnostiniams testams (Dochez *et al*., 2019). Nors pavieniai biožymenys mūsų tyrime pasižymėjo aukšta diagnostine verte (*CTNNB1* AUC = 0,97, *GRB7* AUC = 0,99), tačiau kombinuojant biožymenis, buvo pasiektas pilnas (AUC = 1,00) HGSOC ar KV atvejų atskyrimas nuo gerybinių pakitimų navikų, o pavieniai biožymenys, nors ir specifiniai KV (daugelio biožymenų specifiškumas 100 %), tačiau neturėjo idealaus jautrumo (*CTNNB1* jautrumas = 83,9 %, *GRB7* jautrumas = 91,8 %), taigi biožymenų kombinavimas gali padidinti potencialaus diagnostinio testo jautrumą ir diagnostinę vertę.

Kombinuojant biožymenis, pasiektos didesnės AUC reikšmės tiek atskiriant HGSOC ar KV nuo gerybinių navikų, tiek siekiant atskirti HGSOC atvejus nuo kitų KV, palyginus su pavieniais biožymenimis. Pastaruoju atveju, metilinimo ir genų raiškos biožymenų kombinacija pasiekė didesnį jautrumą nei tik genų raiškos biožymenų kombinacijos (14 biožymenų kombinacijos AUC = 0,96, jautrumas = 0,86, specifiškumas = 0,92, 10–ties literatūros analize atrinktų biožymenų AUC = 0,87, jautrumas = 0,78, specifiškumas = 0,86, o geriausios statistiniais metodais atrinktų biožymenų kombinacijos *RAD50*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B* ir *TCEAL4* AUC = 0,94, jautrumas = 0,78 ir specifiškumas = 1,00). Siekiant didesnio prognostinio potencialo skirtingų biožymenų grupių – genų promotorių metilinimo ir genų raiškos kombinavimas taip pat parodė stipresnę sąsają su bendru išgyvenamumu, bei 0,05 ploto vienetų didesniu AUC nei tik hipotezėmis parinktų genų raiškos biožymenų modelis. Todėl skirtingų biožymenų kombinacijos turi didesnį prognostinį potencialą ir turi potencialą geriau atspindėti skirtingus ligos aspektus ir atskirti heterogeniškas navikų grupes, kaip kad ne HGSOC tipo navikų atveju. Panašius rezultatus gauna ir kiti vėžio multiominiai modeliai: kepenų vėžio laisvai cirkuliuojančios DNR *KRAS* mutacijų kombinacija kartu su serumo biožymenimis CA19-9, CEA, HGF ir OPN pasiekė 64 % jautrumą ir 99,5 % specifiškumą, o mažiausių navikų grupėje (mažesnių nei 1,5 cm) tokia kombinacija nustatė 46 % atvejų, kai tik serumo biožymenų kombinacija nustatė 38 %, o *KRAS* mutacija tik 21 % atvejus (Cohen *et al*., 2017). Priešinės liaukos vėžio atveju serumo biožymens sPD-L1 ir šlapimo nuosėdų genų *AR*, *PSMA* ir *PCA3* raiškos kombinacija padidino pT3 stadijos navikų atskyrimą nuo pT2 ir pT1 stadijų navikų (tik genų raiškos žymenų kombinacijos AUC = 0,74, kombinacijos su sPDL-L1 AUC = 0,94) (Žvirblė *et al*., 2025).

Didesnis modelyje įtraukiamų biožymenų kiekis nebūtinai reiškė didesnę diagnostinę ar prognostinę vertę: atliekant statistinę TCGA–OV ir GTEx

kiaušidžių audinių duomenų analizę, geriausia prognostine verte pasižymėjo modeliai įtraukiantys tarp 7 ir 97 biožymenų, tačiau analizuojant diagnostinę biožymenų kombinacijų vertę šio darbo imtyje vos dviejų biožymenų, atrinktų naudojant statistinės analizės algoritmus, kombinacijos pilnai atskyrė KV nuo gerybinių navikų, kaip ir didesnės kombinacijos, tačiau palyginus su HGSOC atskyrimu nuo kitų KV atvejų, 10 genų raiškos biožymenų kombinacija pasižymėjo mažesniu AUC nei 6 genų raiškos biožymenų *RAD50*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B* ir *TCEAL4* kombinacija. Daugiau žymenų įtraukiantys modeliai turi didesnę riziką pernelyg gerai prisitaikyti prie mokymosi duomenų ir neatitikti testavimo – šiuo atveju visi 10 biožymenų labiau pritaikyti HGSOC atskyrimui nuo gerybinių pakitimų, nei KV tipų atskyrimui tarpusavyje ar išgyvenamumo prognozei. Nors dešimties statistiniais metodais atrinktų žymenų kombinacija testavimo imtyje nebuvo susijusi su išgyvenamumu, mokymosi imties nuo laiko priklausomos ROC kreivės, prognozuojant penkerių metų išgyvenamumą AUC (0,68) iš esmės atitiko dalies kitų literatūroje aprašytų modelių AUC, kurie variavo nuo 0,62 iki 0,80 (**Lentelė 1.2**), o mažesnėje audinių imtyje pasiektas dar didesnis AUC (0,82). Nors testavimo imtyje (prieš biožymenų parinkimą atskirtoje nuo mokymosi imties) koreliacijos su išgyvenamumu ir klinikiniais rodikliais neatsikartojo, svarbu pastebėti, jog tiek mokymosi, tiek testavimo imtyje atskiriant vėžinius audinius nuo sveikų kiaušidžių audinių, tiek šio tyrimo audinių imtyje atskiriant KV nuo gerybinių ginekologinių pakitimų audinių, nustatyti ne tik genų raiškos skirtumai, bet ir vienodos genų raiškos pakitimų kryptys (pvz. *EXO1* raiška padidėjusi KV audiniuose tiek šio darbo imtyje palyginus su gerybiniais navikais, tiek KV audiniuose palyginus TCGA−OV imtis su GTEx imtimis). Taip pat nustatytos ir vienodos *TCEAL4* geno raiškos tendencijos su naviko diferenciacijos laipsniu tiek TCGA−OV mokymosi tiek mūsų audinių imtyse, nors statistiškai patikimos koreliacijos su diferenciacijos laipsniu nebuvo nustatyta testavimo imtyje. Skirtumai su testavimo imtimi ir kitais tyrimais galėjo susidaryti dėl palyginti mažo tiriamųjų skaičiaus mūsų tyrimo audinių imtyje, sumažinančio statistinę galią.

Gauti rezultatai suteikia nemažai vilties, jog tiek *ARID1A*, Notch ir Wnt signalinių kelių genų, tiek HOX šeimos genų promotorių ar statistinės analizės algoritmais atrinkti su įvairiomis vėžio funkcijomis susijusių genų raiškos biožymenys ir jų kombinacijos galėtų būti panaudoti kaip potencialūs KV diagnostiniai ar prognostiniai žymenys, tačiau siekiant pritaikyti šiuos biožymenis klinikinėje praktikoje yra reikalinga atlikti didesnės imties tyrimus. Šio darbo imtis turėjo keletą trūkumų, į kuriuos verta atsižvelgti vertinant rezultatus: Lietuvoje gydytų kiaušidžių vėžio ir gerybinių kiaušidžių pakitimų audinių imtis buvo gana nedidelė ir nesubalansuota – įtraukti 39

HGSOC pacienčių mėginiai, tačiau kaip kontrolinėms grupėms prieinami buvo tik 14 kitų, ne HGSOC tipo, KV mėginių ir 9 gerybinių pakitimų audiniai. Šie skirtumai atsirado dėl gerokai dažnesnio HGSOC tipo navikų nustatymo, palyginus su kitais navikais. Taip pat tyrimo imtis neturėjo ne vėžinių audinių kiaušidžių, kaip kad GTEx kohortoje, vietoje to buvo naudojami gerybinių kiaušidžių pakitimų audiniai. Ateityje būtų galima atlikti tyrimus su kiaušintakių audiniais ar nepakitusiais kiaušidžių audiniais. Nors audiniuose pasirinkti biožymenys pasižymėjo diagnostiniam testui reikalingais jautrumo ir specifiškumo rodikliais, tačiau idealus diagnostinis testas, pritaikytas prevencinėms vėžio programoms, turėtų būti atliekamas kaip įmanoma mažiau invazyviai – kūno skysčių mėginiuose. Todėl gauti biožymenys ir jų kombinacijos, siekiant pritaikyti jas klinikinėje praktikoje vėžio patikros programų testams, turėtų būti toliau tiriamos didesnėse, skystosios biopsijos duomenų imtyse.

IŠVADOS

1. Literatūros analize pasirinkto *CTNNB1* geno raiška nebuvo prastesnis biožymuo atskiriant HGSOC atvejus nuo gerybinių kiaušidžių pakitimų nei statistine duomenų analize atrinkto *GRB7* raiška ($p > 0,05$).
2. *GRB7* geno raiška pasižymi diagnostiniu potencialu (AUC = 0,99), o *NOTCH3* prognostiniu potencialu ($p = 0,048$).
3. Biožymenų kombinacijos (*TCEAL4* ir *GRB7*) geba pilnai atskirti HGSOC ir gerybinius kiaušidžių pakitimus (AUC = 1), o 10−ties statistiniais metodais parinktų genų raiškos žymenų kombinacija turi prognostinę vertę (AUC = 0,82).
4. *CTNNB1*, *FBXW7*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *RAD50*, *VPS33B* ir *GRB7* genų raiška bei *ARID1A* geno promotoriaus metilinimas rodė sąsają su naviko stadija HGSOC atvejais, o *HES1*, *CTNNB1*, *TCEAL4* genų raiška rodė sąsają su KV diferenciacijos laipsniu ($p < 0,05$).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Akaishi, Junko, Masamitsu Onda, Junichi Okamoto, et al. 2006. “Down-Regulation of Transcription Elogation Factor A (SII) like 4 (TCEAL4) in Anaplastic Thyroid Cancer.” *BMC Cancer* 6 (1): 1–8. https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-260.
2. Allemani, Claudia, Tomohiro Matsuda, Veronica Di Carlo, et al. 2018. “Global Surveillance of Trends in Cancer Survival 2000–14 (CONCORD-3): Analysis of Individual Records for 37 513 025 Patients Diagnosed with One of 18 Cancers from 322 Population-Based Registries in 71 Countries.” *The Lancet* 391 (10125): 1023–75. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
3. Altman, Naomi, and Martin Krzywinski. 2018. “The Curse(s) of Dimensionality This-Month.” *Nature Methods* 15 (6): 399–400. https://doi.org/10.1038/s41592-018-0019-x.
4. AmeliMojarad, Mandana, Melika AmeliMojarad, Xiaonan Cui, and Parvin Shariati. 2023. “Pan-Cancer Analysis of CTNNB1 with Potential as a Therapeutic Target for Human Tumorigenesis.” *Informatics in Medicine Unlocked* 42 (12): 101331. https://doi.org/10.1016/j.imu.2023.101331.
5. Aso, Tatsuya, Hiroshi Uozaki, Shigeki Morita, Arisa Kumagai, and Masato Watanabe. 2015. “Loss of ARID1A, ARID1B, and ARID2 Expression During Progression of Gastric Cancer.” *Anticancer Research* 35 (12): 6819–27.
6. “Atviri Statistiniai Duomenys - Nacionalinis Vėžio Institutas.” m.n. Prieiga Gruodžio 6, 2023. https://www.nvi.lt/naujausi-duomenys/.
7. Aust, Stefanie, Lauriane Eberst, Olivier Tredan, et al. 2020. “Detailed Overview on Rare Malignant Ovarian Tumors.” *Bulletin Du Cancer* 107 (3): 385–90. https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.01.011.
8. Bai, Zhen J., Yi P. Li, Jie Huang, et al. 2014. “The Significance of Notch Ligand Expression in the Peripheral Blood of Children with Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD).” *BMC Infectious Diseases* 14 (1): 337. https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-337.
9. Bell, D., A. Berchuck, M. Birrer, et al. 2011. “Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma.” *Nature* 474 (7353): 609–15. https://doi.org/10.1038/nature10166.
10. Benjaminit, Yoav, and Yosef Hochberg. 1995. “Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.” *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology* 57 (1): 289–300. https://doi.org/10.1111/J.2517-6161.1995.TB02031.X.
11. Berek, Jonathan S., Malte Renz, Sean Kehoe, Lalit Kumar, and Michael Friedlander. 2021. “Cancer of the Ovary, Fallopian Tube, and Peritoneum: 2021 Update.” *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 155 (S1): 61–85. https://doi.org/10.1002/IJGO.13878.

12. Bocchicchio, Sebastián, Marta Tesone, and Griselda Irusta. 2019. "Convergence of Wnt and Notch Signaling Controls Ovarian Cancer Cell Survival." *Journal of Cellular Physiology* 234 (12): 22130–43. https://doi.org/10.1002/JCP.28775.
13. Bradner, James E., Denes Hnisz, and Richard A. Young. 2017. "Transcriptional Addiction in Cancer." *Cell* 168 (4): 629–43. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.12.013.
14. Bray, Freddie, Mathieu Laversanne, Hyuna Sung, et al. 2024. "Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 74 (3): 229–63. https://doi.org/10.3322/caac.21834.
15. Breuninger, Sonja, Sonja Reidenbach, Christian Georg Sauer, et al. 2010. "Desmosomal Plakophilins in the Prostate and Prostatic Adenocarcinomas." *The American Journal of Pathology* 176 (5): 2509–19. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2010.090737).
16. Cabasag, Citadel J., Melina Arnold, Mark Rutherford, et al. 2023. "Shifting Incidence and Survival of Epithelial Ovarian Cancer (1995-2014): A SurvMark-2 Study." *International Journal of Cancer* 152 (9): 1763–77. https://doi.org/10.1002/IJC.34403.
17. Cai, Mei Juan, Feng Xia Zhan, Xiang Nan Kong, Shu Zhen Zhu, Yu Cui, and Qian Wang. 2018. "RING Domain of Zinc Finger Protein like 1 Is Essential for Cell Proliferation in Endometrial Cancer Cell Line RL95-2." *Gene* 677: 17–23. https://doi.org/10.1016/J.GENE.2018.07.053.
18. Cai, Xintong, Jie Lin, Li Liu, et al. 2024. "A Novel TCGA-Validated Programmed Cell-Death-Related Signature of Ovarian Cancer." *BMC Cancer* 24 (1): 1–17. https://doi.org/10.1186/s12885-024-12245-2.
19. "Cancer Today." m.n. Prieiga Kovo 21, 2025. https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&sexes=2&cancers=25&group_cancers=0&multiple_cancers=0.
20. Celik, Safiye, Benjamin A. Logsdon, Stephanie Battle, et al. 2016. "Extracting a Low-Dimensional Description of Multiple Gene Expression Datasets Reveals a Potential Driver for Tumor-Associated Stroma in Ovarian Cancer." *Genome Medicine* 8 (1): 66. https://doi.org/10.1186/s13073-016-0319-7.
21. Chang, Chia Ming, Chi Mu Chuang, Mong Lien Wang, et al. 2016. "Gene Set-Based Integrative Analysis Revealing Two Distinct Functional Regulation Patterns in Four Common Subtypes of Epithelial Ovarian Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (8): 1272. https://doi.org/10.3390/ijms17081272.
22. Chen, Buze, Ke'er Jiang, Haihong Wang, et al. 2023. "NOTCH Pathway Genes in Ovarian Cancer: Clinical Significance and Associations with Immune Cell Infiltration." *Frontiers in Bioscience - Landmark* 28 (9): 220. https://doi.org/10.31083/j.fbl2809220.

23. Chen, Xiaohong, Meiying Zhou, Shouye Ma, Huifang Wu, and Hui Cai. 2023. “KLF5-Mediated CDCA5 Expression Promotes Tumor Development and Progression of Epithelial Ovarian Carcinoma.” *Experimental Cell Research* 429 (1): 113645. https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2023.113645.
24. Chen, Xiaoqi, Qianqian Han, Jing Song, and Yongqiang Pu. 2024. “Identification and Validation of a Novel Defined Stress Granule-Related Gene Signature for Predicting the Prognosis of Ovarian Cancer via Bioinformatics Analysis.” *Medicine* 103 (47): e40608. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000040608.
25. Cheutin, Thierry, and Giacomo Cavalli. 2018. “Loss of PRC1 Induces Higher-Order Opening of Hox Loci Independently of Transcription during Drosophila Embryogenesis.” *Nature Communications 2018 9:1* 9 (1): 1–11. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05945-4.
26. Chu, Pei Yu, Yu Ling Tai, and Tang Long Shen. 2019. “Grb7, a Critical Mediator of EGFR/ErbB Signaling, in Cancer Development and as a Potential Therapeutic Target.” *Cells* 8 (5): 435. https://doi.org/10.3390/CELLS8050435.
27. Clarke-Pearson, Daniel L. 2009. “Clinical Practice. Screening for Ovarian Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 361 (2): 170–77. https://doi.org/10.1056/NEJMCP0901926.
28. Clementz, Anthony G., Allison Rogowski, Kinnari Pandya, Lucio Miele, and Clodia Osipo. 2011. “NOTCH-1 and NOTCH-4 Are Novel Gene Targets of PEA3 in Breast Cancer: Novel Therapeutic Implications.” *Breast Cancer Research* 13 (3): 1–18. https://doi.org/10.1186/bcr2900.
29. Cohen, Joshua D., Ammar A. Javed, Christopher Thoburn, et al. 2017. “Combined Circulating Tumor DNA and Protein Biomarker-Based Liquid Biopsy for the Earlier Detection of Pancreatic Cancers.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (38): 10202–7. https://doi.org/10.1073/pnas.1704961114.
30. Colombo, N., C. Sessa, A. Du Bois, et al. 2019. “ESMO-ESGO Consensus Conference Recommendations on Ovarian Cancer: Pathology and Molecular Biology, Early and Advanced Stages, Borderline Tumours and Recurrent Disease.” *Annals of Oncology* 30 (5): 672–705. https://doi.org/10.1093/annonc/mdz062.
31. Di Fiore, Riccardo, Sherif Suleiman, Rosa Drago-Ferrante, et al. 2023. “The Role of FBXW7 in Gynecologic Malignancies.” *Cells* 12 (10): 1415. https://doi.org/10.3390/cells12101415.
32. Dochez, Vincent, Hélène Caillon, Edouard Vaucel, Jérôme Dimet, Norbert Winer, and Guillaume Ducarme. 2019. “Biomarkers and Algorithms for Diagnosis of Ovarian Cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a Review.” *Journal of Ovarian Research* 12 (1): 28. https://doi.org/10.1186/S13048-019-0503-7.
33. Duan, Changling, Zhongxin Yan, Cailiang Wu, Xuexin Zhou, and Wei Bao. 2024. “DNA Methylation Characteristics Associated with

Chemotherapy Resistance in Epithelial Ovarian Cancer." *Heliyon* 10 (5): e27212. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27212.
34. Dundr, Pavel, Naveena Singh, Barbora Nožičková, Kristýna Němejcová, Michaela Bártů, and Ivana Stružinská. 2021. "Primary Mucinous Ovarian Tumors vs. Ovarian Metastases from Gastrointestinal Tract, Pancreas and Biliary Tree: A Review of Current Problematics." *Diagnostic Pathology* 16 (1): 20. https://doi.org/10.1186/S13000-021-01079-2.
35. Erfani, Mehran, Seyed Vahid Hosseini, Maral Mokhtari, et al. 2020. "Altered ARID1A Expression in Colorectal Cancer." *BMC Cancer* 20 (1): 1–13. https://doi.org/10.1186/s12885-020-6706-x.
36. Faaborg, Louise, Rikke Fredslund Andersen, Marianne Waldstrøm, et al. 2021. "Analysis of HOXA9 Methylated ctDNA in Ovarian Cancer Using Sense-Antisense Measurement." *Clinica Chimica Acta* 522 (2021): 152–157. https://doi.org/10.1016/J.CCA.2021.08.020.
37. Fontana, Beatrice, Giulia Gallerani, Irene Salamon, Ilaria Pace, Roberta Roncarati, and Manuela Ferracin. 2023. "ARID1A in Cancer: Friend or Foe?" *Frontiers in Oncology* 13: 1136248. https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1136248.
38. Fragkiadaki, Persefoni, Nikolaos Soulitzis, Stavros Sifakis, et al. 2015. "Downregulation of Notch Signaling Pathway in Late Preterm and Term Placentas from Pregnancies Complicated by Preeclampsia." *PLoS ONE* 10 (5): 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126163.
39. Gaitskell, Kezia, Carol Hermon, Isobel Barnes, et al. 2022. "Ovarian Cancer Survival by Stage, Histotype, and Pre-Diagnostic Lifestyle Factors, in the Prospective UK Million Women Study." *Cancer Epidemiology* 76 (2022): 102074. https://doi.org/10.1016/J.CANEP.2021.102074.
40. Gao, Lingling, Xiao Li, Qian Guo, et al. 2020. "Identification of PKP 2/3 as Potential Biomarkers of Ovarian Cancer Based on Bioinformatics and Experiments." *Cancer Cell International* 20 (1): 509. https://doi.org/10.1186/S12935-020-01602-3.
41. Garzon, Simone, Antonio Simone Laganà, Jvan Casarin, et al. 2020. "Secondary and Tertiary Ovarian Cancer Recurrence: What Is the Best Management?" *Gland Surgery* 9 (4): 1118. https://doi.org/10.21037/GS-20-325.
42. Giro, Alexia, Tressie Herrmann, Arthur Bauer, et al. 2025. "Predictive and Prognostic Factors in Epithelial Ovarian Cancer: A Review." *Indian Journal of Gynecologic Oncology* 23 (1): 1–11. https://doi.org/10.1007/S40944-025-00964-8/TABLES/3.
43. Gokulan, Ravindran Caspa, Lee Fah Yap, and Ian C. Paterson. 2022. "HOPX: A Unique Homeodomain Protein in Development and Tumor Suppression." *Cancers* 14 (11): 2764. https://doi.org/10.3390/CANCERS14112764.
44. González-Martín, A., P. Harter, A. Leary, et al. 2023. "Newly Diagnosed and Relapsed Epithelial Ovarian Cancer: ESMO Clinical Practice

Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 34 (10): 833–48. https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2023.07.011.
45. Gotovac, Jovana R., David S.H. Liu, Michael J. Yates, et al. 2020. "GRB7 Is an Oncogenic Driver and Potential Therapeutic Target in Oesophageal Adenocarcinoma." *The Journal of Pathology* 252 (3): 317. https://doi.org/10.1002/PATH.5528.
46. Guadalupe, Dania, Solis Cano, Hugo Alberto, et al. 2021. "Sensitivity and Specificity of Ultrasonography Using Ovarian-Adnexal Reporting and Data System Classification Versus Pathology Findings for Ovarian Cancer." *Cureus* 13 (9): e17646. https://doi.org/10.7759/CUREUS.17646.
47. Guan, Bin, Tian Li Wang, and Ie Ming Shih. 2011. "ARID1A, a Factor That Promotes Formation of SWI/SNF-Mediated Chromatin Remodeling, Is a Tumor Suppressor in Gynecologic Cancers." *Cancer Research* 71 (21): 6718–27. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1562.
48. Guo, Wenna, Liucun Zhu, Minghao Yu, Rui Zhu, Qihan Chen, and Qiang Wang. 2018. "A Five-DNA Methylation Signature Act as a Novel Prognostic Biomarker in Patients with Ovarian Serous Cystadenocarcinoma." *Clinical Epigenetics* 10 (1): 1–10. https://doi.org/10.1186/S13148-018-0574-0/FIGURES/4.
49. Guo, Yiran, Shuai Zhao, and Gang Greg Wang. 2021. "Polycomb Gene Silencing Mechanisms: PRC2 Chromatin Targeting, H3K27me3 'Readout', and Phase Separation-Based Compaction." *Trends in Genetics* 37 (6): 547–65. https://doi.org/10.1016/J.TIG.2020.12.006.
50. Gupta, Neha, Mahima Yadav, Vikas Gupta, Deepshikha Chaudhary, and Shashikant C. U. Patne. 2019. "Distribution of Various Histopathological Types of Ovarian Tumors: A Study of 212 Cases from a Tertiary Care Center of Eastern Uttar Pradesh." *Journal of Laboratory Physicians* 11 (01): 075–081. https://doi.org/10.4103/jlp.jlp_117_18.
51. Hamilton, William, Tim J. Peters, Clare Bankhead, and Deborah Sharp. 2009. "Risk of Ovarian Cancer in Women with Symptoms in Primary Care: Population Based Case-Control Study." *BMJ* 339 (7721): 616. https://doi.org/10.1136/BMJ.B2998.
52. Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.
53. He, Chaofan, Fuxin Huang, Kejia Zhang, Jun Wei, Ke Hu, and Meng Liang. 2021. "Establishment and Validation of an RNA Binding Protein-Associated Prognostic Model for Ovarian Cancer." *Journal of Ovarian Research* 14 (1): 1–11. https://doi.org/10.1186/s13048-021-00777-1.
54. He, Yizhou Joseph, Khyati Meghani, Marie Christine Caron, et al. 2018. "DYNLL1 Binds to MRE11 to Limit DNA End Resection in BRCA1-

Deficient Cells." *Nature* 563 (7732): 522–26. https://doi.org/10.1038/S41586-018-0670-5.
55. Hein, Kyaw Z., Bettzy Stephen, and Siqing Fu. 2024. "Therapeutic Role of Synthetic Lethality in ARID1A-Deficient Malignancies." *Journal of Immunotherapy and Precision Oncology* 7 (1): 41–52. https://doi.org/10.36401/JIPO-22-37.
56. Heinzel, Andreas, Irmgard Mühlberger, Raul Fechete, Bernd Mayer, and Paul Perco. 2014. "Functional Molecular Units for Guiding Biomarker Panel Design." *Methods in Molecular Biology* 1159: 109–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0709-0_7.
57. Hentze, Julie L., Claus K. Høgdall, and Estrid V. Høgdall. 2019. "Methylation and Ovarian Cancer: Can DNA Methylation Be of Diagnostic Use? (Review)." *Molecular and Clinical Oncology* 10 (3): 323–30. https://doi.org/10.3892/MCO.2019.1800.
58. Herawati, Netti, Ameliana Wijayanti, Agus Sutrisno, Nusyirwan, and Misgiyati. 2024. "The Performance of Ridge Regression, LASSO, and Elastic-Net in Controlling Multicollinearity: A Simulation and Application." *Journal of Modern Applied Statistical Methods* 23 (2). https://doi.org/10.56801/Jmasm.V23.i2.4.
59. Herrera-Goepfert, Roberto, Teresa Vela-Chávez, Adela Carrillo-García, et al. 2013. "High-Risk Human Papillomavirus (HPV) DNA Sequences in Metaplastic Breast Carcinomas of Mexican Women." *BMC Cancer* 13 (1): 445. https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-445.
60. Hervouet, Eric, Paul Peixoto, Régis Delage-Mourroux, Michaël Boyer-Guittaut, and Pierre François Cartron. 2018. "Specific or Not Specific Recruitment of DNMTs for DNA Methylation, an Epigenetic Dilemma." *Clinical Epigenetics* 10 (1): 1–18. https://doi.org/10.1186/S13148-018-0450-Y.
61. Hollis, Robert L. 2023. "Molecular Characteristics and Clinical Behaviour of Epithelial Ovarian Cancers." *Cancer Letters* 555 (2023): 216057. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216057.
62. Hollis, Robert L., John P. Thomson, Barbara Stanley, et al. 2020. "Molecular Stratification of Endometrioid Ovarian Carcinoma Predicts Clinical Outcome." *Nature Communications* 11 (1): 1–10. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18819-5.
63. Hong, Mun Kun, and Dah Ching Ding. 2025. "Early Diagnosis of Ovarian Cancer: A Comprehensive Review of the Advances, Challenges, and Future Directions." *Diagnostics* 15 (4): 406. https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS15040406.
64. Huang, Daosheng, Guoji Guo, Ping Yuan, et al. 2017. "The Role of Cdx2 as a Lineage Specific Transcriptional Repressor for Pluripotent Network during the First Developmental Cell Lineage Segregation." *Scientific Reports* 7 (1): 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16009-w.
65. Huang, Hsuan-Shun, Sung-Chao Chu, Che-Fang Hsu, et al. 2015. "Mutagenic, Surviving and Tumorigenic Effects of Follicular Fluid in the

Context of P53 Loss: Initiation of Fimbria Carcinogenesis." *Carcinogenesis* 36 (11): 1419–28. https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGV132.
66. Huang, Yan, Yuqi Zhou, and Meiqin Zhang. 2023. "Identification of Seven Hypoxia-Related Genes Signature and Risk Score Models for Predicting Prognosis for Ovarian Cancer." *Functional and Integrative Genomics* 23 (1): 1–13. https://doi.org/10.1007/s10142-022-00956-3.
67. Humardani, Farizky Martriano, Lisa Thalia Mulyanata, Theresa Adeodata Tanaya, et al. 2023. "Methylation Specific PCR (MSP): Nested PCR vs Unnested PCR." *Proceedings of the Conference on Natural Resources and Life Scienc*. Atlantis Press. https://doi.org/10.2991/978-94-6463-322-1_12.
68. Hutter, Carolyn, and Jean Claude Zenklusen. 2018. "The Cancer Genome Atlas: Creating Lasting Value beyond Its Data." *Cell* 173 (2): 283–85. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.03.042.
69. Katoh, Hiroshi, Keishi Yamashita, Mina Waraya, et al. 2012. "Epigenetic Silencing of HOPX Promotes Cancer Progression in Colorectal Cancer." *Neoplasia* 14 (7): 559–71. https://doi.org/10.1593/neo.12330.
70. Kessler, Mirjana, Karen Hoffmann, Volker Brinkmann, et al. 2015. "The Notch and Wnt Pathways Regulate Stemness and Differentiation in Human Fallopian Tube Organoids." *Nature Communications* 6: 416. https://doi.org/10.1038/ncomms9989.
71. King, Bryan, Thomas Trimarchi, Linsey Reavie, et al. 2013. "The Ubiquitin Ligase FBXW7 Modulates Leukemia-Initiating Cell Activity by Regulating MYC Stability." *Cell* 153 (7): 1552. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.041.
72. Kitade, Shoko, Ichiro Onoyama, Hiroaki Kobayashi, et al. 2016. "FBXW7 Is Involved in the Acquisition of the Malignant Phenotype in Epithelial Ovarian Tumors." *Cancer Science* 107 (10): 1399–405. https://doi.org/10.1111/cas.13026.
73. Köbel, Martin, and Eun Young Kang. 2022. "The Evolution of Ovarian Carcinoma Subclassification." *Cancers* 14 (2): 416. https://doi.org/10.3390/cancers14020416.
74. Koh, Iemasa, Takao Hinoi, Kazuhiro Sentani, et al. 2016. "Regulation of Multidrug Resistance 1 Expression by CDX2 in Ovarian Mucinous Adenocarcinoma." *Cancer Medicine* 5 (7): 1546–55. https://doi.org/10.1002/cam4.697.
75. Kooij, Bert van de, Anne Schreuder, Raphael Pavani, et al. 2024. "EXO1 Protects BRCA1-Deficient Cells against Toxic DNA Lesions." *Molecular Cell* 84 (4): 659-674.e7. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2023.12.039.
76. Koukoura, Ourania, Demetrios A. Spandidos, Alexandros Daponte, and Stavros Sifakis. 2014. "DNA Methylation Profiles in Ovarian Cancer: Implication in Diagnosis and Therapy (Review)." *Molecular Medicine Reports* 10 (1): 3–9. https://doi.org/10.3892/MMR.2014.2221/HTML.

77. Kuo, Kuan Ting, Tsui Lien Mao, Siân Jones, et al. 2009. “Frequent Activating Mutations of PIK3CA in Ovarian Clear Cell Carcinoma.” *The American Journal of Pathology* 174 (5): 1597. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2009.081000.
78. Kurman, Robert J, and Ie-Ming Shih. 2011. “Molecular Pathogenesis and Extraovarian Origin of Epithelial Ovarian Cancer. Shifting the Paradigm.” *Human Pathology* 42 (7): 918–31. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.03.003.
79. Lachej, Nadezda, Daiva Dabkeviciene, Julija Simiene, et al. 2022. “Components of NOTCH Signaling for Uterine Cancer Patients ’ Prognosis.” *Journal of Oncology* 2022: 8199306. https://doi.org/10.1155/2022/8199306.
80. Lauko, Adam, Josephine Volovetz, Soumya M. Turaga, et al. 2022. “SerpinB3 Drives Cancer Stem Cell Survival in Glioblastoma.” *Cell Reports* 40 (11): 111348. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2022.111348.
81. Li, He, Nayiyuan Wu, Zhao Yi Liu, Yong Chang Chen, Quan Cheng, and Jing Wang. 2021. “Development of a Novel Transcription Factors-Related Prognostic Signature for Serous Ovarian Cancer.” *Scientific Reports* 11 (1): 7207. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86294-z.
82. Liang, Zixi, Zhen Liu, Chao Cheng, et al. 2019. “VPS33B Interacts with NESG1 to Modulate EGFR/PI3K/AKT/c-Myc/P53/miR-133a-3p Signaling and Induce 5-Fluorouracil Sensitivity in Nasopharyngeal Carcinoma.” *Cell Death & Disease* 10 (4): 1–16. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1457-9.
83. Liu, Aijun, Qiong Wang, Lingxiong Wang, and Xiaohui Ding. 2017. “Expression and Significance of ARID1A mRNA in Endometri-Osis-Associated Ovarian Cancer.” *J BOUN* 22 (5): 1314–21.
84. Liu, Wen Bin, Fei Han, Xing Hua Du, et al. 2014. “Epigenetic Silencing of Aristaless-like Homeobox-4, a Potential Tumor Suppressor Gene Associated with Lung Cancer.” *International Journal of Cancer* 134 (6): 1311–22. https://doi.org/10.1002/IJC.28472.
85. Liu, Xuefeng, Xiaomei Zhang, Qimin Zhan, Malcolm V. Brock, James G. Herman, and Mingzhou Guo. 2012. “CDX2 Serves as a Wnt Signaling Inhibitor and Is Frequently Methylated in Lung Cancer.” *Cancer Biology and Therapy* 13 (12): 1152–57. https://doi.org/10.4161/cbt.21344.
86. Matsumaru, Daisuke, Ryuma Haraguchi, Anne M. Moon, et al. 2013. “Genetic Analysis of the Role of Alx4 in the Coordination of Lower Body and External Genitalia Formation.” *European Journal of Human Genetics* 22 (3): 350–57. https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.160.
87. Momenimovahed, Zohre, Azita Tiznobaik, Safoura Taheri, and Hamid Salehiniya. 2019. “Ovarian Cancer in the World: Epidemiology and Risk Factors.” *International Journal of Women’s Health* 11: 287–99. https://doi.org/10.2147/IJWH.S197604.

88. Montavon, Céline, Brian S. Gloss, Kristina Warton, et al. 2012. "Prognostic and Diagnostic Significance of DNA Methylation Patterns in High Grade Serous Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 124 (3): 582–88. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.11.026.
89. Moore, Lisa D., Thuc Le, and Guoping Fan. 2012. "DNA Methylation and Its Basic Function." *Neuropsychopharmacology* 38 (1): 23–38. https://doi.org/10.1038/npp.2012.112.
90. Müller, Lisa, René Keil, and Mechthild Hatzfeld. 2023. "Plakophilin 3 Facilitates G1/S Phase Transition and Enhances Proliferation by Capturing RB Protein in the Cytoplasm and Promoting EGFR Signaling." *Cell Reports* 42 (1): 112031. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2023.112031.
91. Murali, Roopak, Vaishnavi Balasubramaniam, Satish Srinivas, et al. 2023. "Deregulated Metabolic Pathways in Ovarian Cancer: Cause and Consequence." *Metabolites* 13 (4): 560. https://doi.org/10.3390/METABO13040560.
92. Ning, Yingxia, Zhaoyang Zeng, Yuao Deng, et al. 2021. "VPS33B Interacts with NESG1 to Suppress Cell Growth and Cisplatin Chemoresistance in Ovarian Cancer." *Cancer Science* 112 (5): 1785–97. https://doi.org/10.1111/CAS.14864.
93. Nishiyama, Atsuya, and Makoto Nakanishi. 2021. "Navigating the DNA Methylation Landscape of Cancer." *Trends in Genetics* 37 (11): 1012–27. https://doi.org/10.1016/J.TIG.2021.05.002.
94. Ooki, A, K Yamashita, S Kikuchi, et al. 2010. "Potential Utility of HOP Homeobox Gene Promoter Methylation as a Marker of Tumor Aggressiveness in Gastric Cancer." *Oncogene* 29 (22): 3263–75. https://doi.org/10.1038/onc.2010.76.
95. Pan, Xin, and Xiaoxin Ma. 2020. "A Novel Six-Gene Signature for Prognosis Prediction in Ovarian Cancer." *Frontiers in Genetics* 11: 540331. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.01006.
96. Piatek, Szymon, Grzegorz Panek, Zbigniew Lewandowski, Dominika Piatek, Przemyslaw Kosinski, and Mariusz Bidzinski. 2021. "Nadir CA-125 Has Prognostic Value for Recurrence, but Not for Survival in Patients with Ovarian Cancer." *Scientific Reports* 11 (1): 1–7. https://doi.org/10.1038/s41598-021-97564-1.
97. Qian, Hua, Donglan Yuan, Jingjing Bao, et al. 2019. "Increased Expression of Plakophilin 3 Is Associated with Poor Prognosis in Ovarian Cancer." *Medicine* 98 (10): e14608. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000014608.
98. Ravindran, Febina, Bibha Choudhary, Febina Ravindran, and Bibha Choudhary. 2021. "Ovarian Cancer: Molecular Classification and Targeted Therapy." *Ovarian Cancer - Updates in Tumour Biology and Therapeutics*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.95967.

99. Reyes, Henry D., Eric J. Devor, Akshaya Warrier, et al. 2019. "Differential DNA Methylation in High-Grade Serous Ovarian Cancer (HGSOC) Is Associated with Tumor Behavior." *Scientific Reports* 9 (1): 17996. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54401-w.
100. Romero, Ignacio, and Robert C. Bast. 2012. "Minireview: Human Ovarian Cancer: Biology, Current Management, and Paths to Personalizing Therapy." *Endocrinology* 153 (4): 1593–602. https://doi.org/10.1210/en.2011-2123.
101. Saini, Ashok, Yashaswi Rawat, Kritika Jain, and Indra Mani. 2023. "State-of-the-Art Techniques to Study Epigenetics." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 197: 23–50. https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2023.02.004.
102. Salani, Ritu, Floor J. Backes, Michael Fung Kee Fung, et al. 2011. "Posttreatment Surveillance and Diagnosis of Recurrence in Women with Gynecologic Malignancies: Society of Gynecologic Oncologists Recommendations." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 204 (6): 466–78. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.03.008.
103. Salehi, Rasoul, Norollah Atapour, Nasimeh Vatandoust, Najmeh Farahani, Fatemeh Ahangari, and AhmadReza Salehi. 2015. "Methylation Pattern of ALX4 Gene Promoter as a Potential Biomarker for Blood-Based Early Detection of Colorectal Cancer." *Advanced Biomedical Research* 4 (1): 252. https://doi.org/10.4103/2277-9175.170677.
104. Shen, Jianfeng, Zhenlin Ju, Wei Zhao, et al. 2018. "ARID1A Deficiency Promotes Mutability and Potentiates Therapeutic Antitumor Immunity Unleashed by Immune Checkpoint Blockade." *Nature Medicine* 24 (5): 556–62. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0012-z.
105. Sheng, Wei, and Wen-Pei Bai. 2022. "Identification of Hypoxia-Related Prognostic Signature for Ovarian Cancer Based on Cox Regression Model." *European Journal of Gynaecological Oncology* 43 (2): 247–56. https://doi.org/10.31083/j.ejgo4302031.
106. Shi, Qingmiao, Chen Xue, Yifan Zeng, et al. 2024. "Notch Signaling Pathway in Cancer: From Mechanistic Insights to Targeted Therapies." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9 (1): 1–37. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01828-x.
107. Shih, Ie Ming, Yeh Wang, and Tian Li Wang. 2021. "The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape." *The American Journal of Pathology* 191 (1): 26–39. https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2020.09.006.
108. The GTEx Consortium. 2020. "The GTEx Consortium Atlas of Genetic Regulatory Effects across Human Tissues." *Science* 369 (6509): 1318–30. https://doi.org/10.1126/science.aaz1776.
109. Toss, Angela, Chiara Tomasello, Elisabetta Razzaboni, et al. 2015. "Hereditary Ovarian Cancer: Not Only BRCA 1 and 2 Genes." *BioMed Research International* 2015: 341723. https://doi.org/10.1155/2015/341723.

110. Verhaak, Roel G.W., Pablo Tamayo, Ji Yeon Yang, et al. 2013. "Prognostically Relevant Gene Signatures of High-Grade Serous Ovarian Carcinoma." *The Journal of Clinical Investigation* 123 (1): 517–25. https://doi.org/10.1172/JCI65833.
111. Wang, Ke, Hua Yang Fan, Xing Pang, et al. 2021. "Dll4/Notch1 Signalling Pathway Is Required in Collective Invasion of Salivary Adenoid Cystic Carcinoma." *Oncology Reports* 45 (3): 1011. https://doi.org/10.3892/OR.2021.7939.
112. Wang, Minmin, Yanxin Bi, Yinzi Jin, and Zhi-Jie Zheng. 2024. "Global Incidence of Ovarian Cancer According to Histologic Subtype: A Population-Based Cancer Registry Study." *JCO Global Oncology*, 10: 2300393. https://doi.org/10.1200/GO.23.00393.
113. Wang, Qingyi, Xiaoling Feng, Xiaofang Liu, and Siyu Zhu. 2022. "Prognostic Value of Elevated Pre-Treatment Serum CA-125 in Epithelial Ovarian Cancer: A Meta-Analysis." *Frontiers in Oncology* 12: 868061. https://doi.org/10.3389/FONC.2022.868061/FULL.
114. Wang, Yunshuai, Zhaohui Li, Wenxian Li, Shuaifeng Liu, and Baowei Han. 2016. "Methylation of Promoter Region of CDX2 Gene in Colorectal Cancer." *Oncology Letters* 12 (5): 3229. https://doi.org/10.3892/OL.2016.5109.
115. Wang, Yunshuai, Zhaohui Li, Wenxian Li, Shuaifeng Liu, and Baowei Han. 2018. "Methylation of CDX2 Gene Promoter in the Prediction of Treatment Efficacy in Colorectal Cancer." *Oncology Letters* 16 (1): 195–98. https://doi.org/10.3892/ol.2018.8670.
116. Wang, Zihuan, Xu Zhang, Yuchen Luo, et al. 2024. "Therapeutic Targeting of ARID1A-Deficient Cancer Cells with RITA (Reactivating P53 and Inducing Tumor Apoptosis)." *Cell Death and Disease* 15 (5): 375. https://doi.org/10.1038/s41419-024-06751-1.
117. Wei, Yi Fan, Li Ning, Yi Lin Xu, et al. 2025. "Worldwide Patterns and Trends in Ovarian Cancer Incidence by Histological Subtype: A Population-Based Analysis from 1988 to 2017." *eClinicalMedicine* 79: 102983. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2024.102983
118. Wen, Liang, Wei Hu, Sen Hou, et al. 2024. "GRB7 Plays a Vital Role in Promoting the Progression and Mediating Immune Evasion of Ovarian Cancer." *Pharmaceuticals* 17 (8): 1043. https://doi.org/10.3390/PH17081043/S1.
119. WHO Classification of Tumours Editorial Board. 2020. "Female Genital Tumours." *WHO Female Genital Tumours*, red. C Simon Herrington, t. 4. International Agency for Research on Cancer. https://www.research.ed.ac.uk/en/publications/who-classification-of-tumours-female-genital-tumours.
120. Widschwendter, Martin, Sophia Apostolidou, Allison A. Jones, et al. 2009. "HOXA Methylation in Normal Endometrium from Premenopausal Women Is Associated with the Presence of Ovarian Cancer: A Proof of

Principle Study." *International Journal of Cancer* 125 (9): 2214–18. https://doi.org/10.1002/IJC.24599.
121. Wiegand, Kimberly C, Sohrab P Shah, Osama M Al-Agha, Yongjun Zhao, and Et Al. 2010. "ARID1A Mutations in Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas." *He New England Journal of Medicine* 363 (16): 1532–43. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008433.
122. Winarto, Hariyono, Marselina Irasonia Tan, Mohamad Sadikin, and Septelia Inawati Wanandi. 2017. "ARID1A Expression Is Down-Regulated by Oxidative Stress in Endometriosis and Endometriosis-Associated Ovarian Cancer." *Translational Oncogenomics* 9: 1177272716689818. https://doi.org/10.1177/1177272716689818.
123. Xie, Qi, Zuowang Cheng, Xiaocui Chen, Corrinne G. Lobe, and Ju Liu. 2017. "The Role of Notch Signalling in Ovarian Angiogenesis." *Journal of Ovarian Research* 10 (1): 1–8. https://doi.org/10.1186/s13048-017-0308-5.
124. Xu, Fei, Jiajia Li, Mengdong Ni, et al. 2021. "FBW7 Suppresses Ovarian Cancer Development by Targeting the N6-Methyladenosine Binding Protein YTHDF2." *Molecular Cancer* 20 (1): 1–16. https://doi.org/10.1186/s12943-021-01340-8.
125. Xu, Hui, Yan Zhang, Zhen Xie, et al. 2024. "Investigating PPT2's Role in Ovarian Cancer Prognosis and Immunotherapy Outcomes." *Journal of Ovarian Research* 17 (1): 198. https://doi.org/10.1186/S13048-024-01527-9.
126. Xu, Jing, Chengxiang Zhu, Yue Yu, et al. 2019. "Systematic Cancer-Testis Gene Expression Analysis Identified CDCA5 as a Potential Therapeutic Target in Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *eBioMedicine* 46: 54–65. https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2019.07.030.
127. Xu, Qiong, Zequn Liu, Zhi qin Zhu, et al. 2021. "Knockdown of Growth Factor Receptor Bound Protein 7 Suppresses Angiogenesis by Inhibiting the Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor A in Ovarian Cancer Cells." *Bioengineered* 12 (2): 12179–90. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2005225.
128. Xu, Xuemeng, Qiu Peng, Xianjie Jiang, et al. 2023. "Metabolic Reprogramming and Epigenetic Modifications in Cancer: From the Impacts and Mechanisms to the Treatment Potential." *Experimental & Molecular Medicine* 55 (7): 1357–70. https://doi.org/10.1038/s12276-023-01020-1.
129. Yachida, Nozomi, Kosuke Yoshihara, Kazuaki Suda, et al. 2020. "ARID1A Protein Expression Is Retained in Ovarian Endometriosis with ARID1A Loss-of-Function Mutations: Implication for the Two-Hit Hypothesis." *Scientific Reports* 10 (1): 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-020-71273-7.
130. Yang, Juntang, Fei Han, Wenbin Liu, et al. 2017. "ALX4, an Epigenetically down Regulated Tumor Suppressor, Inhibits Breast Cancer Progression by Interfering Wnt/β-Catenin Pathway." *Journal of*

Experimental and Clinical Cancer Research 36 (1): 170. https://doi.org/10.1186/S13046-017-0643-9.

131. Yilmaz, Ercan, Nurhan Sahin, Isil Koleli, et al. 2019. "RETROSPECTIVE ANALYSIS OF BORDERLINE OVARIAN TUMORS: OUTCOMES AT A SINGLE CENTER." *Acta Clinica Croatica* 58 (1): 29–36. https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.01.04.
132. Yu, Cong, and Guoying Wu. 2025. "Deciphering the Multifaceted Role of EXO1 in Female-Related Cancers: Implications for Prognosis and Therapeutic Responsiveness." *Frontiers in Immunology* 16: 1591505. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2025.1591505.
133. Yuan, Chang Fei, Zhi Yong Xiong, Jian Shi, et al. 2020. "Overexpression of PPT2 Represses the Clear Cell Renal Cell Carcinoma Progression by Reducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *Journal of Cancer* 11 (5): 1151. https://doi.org/10.7150/JCA.36477.
134. Yuan, Hong, Hiroaki Kajiyama, Satoko Ito, et al. 2015. "HOXB13 and ALX4 Induce SLUG Expression for the Promotion of EMT and Cell Invasion in Ovarian Cancer Cells". *Oncotarget* 6 (15): 13359–70. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3673.
135. Zhang, Min, Guoyan Liu, Fengxia Xue, et al. 2016. "Copy Number Deletion of RAD50 as Predictive Marker of BRCAness and PARP Inhibitor Response in BRCA Wild Type Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 141 (1): 57–64. https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2016.01.004.
136. Zhang, Mingfeng, Jueping Shi, Yide Huang, and Laijun Lai. 2012. "Expression of Canonical WNT/β-CATENIN Signaling Components in the Developing Human Lung." *BMC Developmental Biology* 12: 21. https://doi.org/10.1186/1471-213X-12-21.
137. Zhang, Xianyu, Qian Sun, Ming Shan, et al. 2013. "Promoter Hypermethylation of ARID1A Gene Is Responsible for Its Low mRNA Expression in Many Invasive Breast Cancers." *PLOS ONE* 8 (1): e53931. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0053931.
138. Zhang, Xin Yu, Lian Lian Hong, and Zhi Qiang Ling. 2025. "MUC16/CA125 in Cancer: New Advances." *Clinica Chimica Acta* 565 (2025): 119981. https://doi.org/10.1016/J.CCA.2024.119981.
139. Zhong, Liping, Yuefen Pan, and Junjun Shen. 2021. "FBXW7 Inhibits Invasion, Migration and Angiogenesis in Ovarian Cancer Cells by Suppressing VEGF Expression through Inactivation of B-catenin Signaling." *Experimental and Therapeutic Medicine* 21 (5): 514. https://doi.org/10.3892/etm.2021.9945.
140. Zhou, Jinhua, Yunfei Wang, You Wang, et al. 2014. "FOXM1 Modulates Cisplatin Sensitivity by Regulating EXO1 in Ovarian Cancer." *PLoS ONE* 9 (5): e96989. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0096989.
141. Zhou, Lei, Dong Wang, Dandan Sheng, et al. 2020. "NOTCH4 Maintains Quiescent Mesenchymal-like Breast Cancer Stem Cells via

Transcriptionally Activating SLUG and GAS1 in Triple-Negative Breast Cancer." *Theranostics* 10 (5): 2405–21. https://doi.org/10.7150/thno.38875.

142. Zhou, Min, Shasha Hong, Bingshu Li, et al. 2021. "Development and Validation of a Prognostic Nomogram Based on DNA Methylation-Driven Genes for Patients With Ovarian Cancer." *Frontiers in Genetics* 12: 675197. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.675197.
143. Zhu, Jie Wei, Parsa Charkhchi, and Mohammad R. Akbari. 2022. "Potential Clinical Utility of Liquid Biopsies in Ovarian Cancer." *Molecular Cancer* 21 (1): 114. https://doi.org/10.1186/s12943-022-01588-8.
144. Žilovič, Diana, Ieva Vaicekauskaitė, Rūta Čiurlienė, Rasa Sabaliauskaitė, and Sonata Jarmalaitė. 2023. "Uterine Cavity Lavage Mutation Analysis in Lithuanian Ovarian Cancer Patients." *Cancers* 15 (3): 868. https://doi.org/10.3390/CANCERS15030868.
145. Žvirblė, Margarita, Ieva Vaicekauskaitė, Žilvinas Survila, et al. 2025. "Liquid-Based Diagnostic Panels for Prostate Cancer: The Synergistic Role of Soluble PD-L1, PD-1, and mRNA Biomarkers." *International Journal of Molecular Sciences* 26 (2): 704. https://doi.org/10.3390/ijms26020704.

PRIEDAI

Priedų lentelė 1. Genų raiškos tyrimų pradmenų sekos

Genas	**Pradmuo**	**Seka (5‘→ 3‘)**	**Tm °C**	**CG%**	**Pradmens ilgis, nt**	**Produkto ilgis, nt**	**Geno seka**	**Pradmenų sekos šaltinis**
JAG2	Tiesioginis	GCTGCTACGACCTGGTCAATGA	68,8	54,5	22	195	NM_002226.5	(Lauko *et al*., 2022)
	Atvirkštinis	AGGTGTAGGCATCGCACTGGAA	70,1	54,5	22			
DLL1	Tiesioginis	GGGTCATCCTTGTCCTCAT	61,9	52,6	19	341	NM_005524.4	(Bai *et al*., 2014)
	Atvirkštinis	CTTGGTGTCACGCTTGCT	63,3	55,6	18			
HES1	Tiesioginis	ACGTGCGAGGGCGTTAATAC	66,3	55	20	90	NM_005618.4	(Wang *et al*., 2021)
	Atvirkštinis	GGGGTAGGTCATGGCATTGA	67,2	55	20			
FBXW7	Tiesioginis	GTGATAGAACCCCAGTTTCA	59,5	45	20	139	NM_001013415.2	(King *et al*., 2013)
	Atvirkštinis	CTTCAGCCAAAATTCTCCAG	61,8	45	20			
ARID1A	Tiesioginis	CAGTAAGGGAGGGCAAGAAG	63,1	55	20	191	NM_006015.6	(Aso *et al*., 2015)
	Atvirkštinis	GAGGAGAGAAAGGAGACTGA	58,2	50	20			
CTNNB1	Tiesioginis	TCTGAGGACAAGCCACAAGATTACA	68	44	25	122	NM_001904.4	(Zhang *et al*., 2012)
	Atvirkštinis	TGGGCACCAATATCAAGTCCAA	68,5	45,5	22			
NOTCH1	Tiesioginis	CAGCCTCAACATCCCCTACAAG	67	54,5	22	127	NM_017617.5	(Fragkiadaki *et al*., 2015)
	Atvirkštinis	GCAGCCCACGAAGAACAGAA	68	55	20			
NOTCH2	Tiesioginis	GTGGATGGGGTCAACACTTACA	66,1	50	22	169	NM_024408.4	(Fragkiadaki *et al*., 2015)
	Atvirkštinis	CACTCCAGCCGTTGACACATAC	67	54,5	22			
NOTCH3	Tiesioginis	CGTGGCTTCTTTCTACTGTGC	64,2	52,4	21	194	NM_000435.3	(Zhou *et al*., 2020)
	Atvirkštinis	CGTTCACCGGATTTGTGTCAC	67,9	52,4	21			
NOTCH4	Tiesioginis	AACTCCTCCCCAGGAATCTG	64.7	55	20	168	NM_004557.4	(Clementz *et al*., 2011)
	Atvirkštinis	CCTCCATCCAGCAGAGGTT	64,7	57,9	19			

Priedų lentelė 1. Genų raiškos tyrimų pradmenų sekos (tęsinys)

Genas	Pradmuo	Seka (5‘→ 3‘)	Tm °C	CG%	Pradmens ilgis, nt	Produkto ilgis, nt	Geno seka	Pradmenų sekos šaltinis
EXO1	Tiesioginis	CCTCGTGGCTCCCTATGAAG	66,2	60	20	93	NM_003686.4	(Zhou *et al*., 2014)
	Atvirkštinis	AGGAGATCCGAGTCCTCTGTAA	63,4	50	22			
RAD50	Tiesioginis	TACTGGAGATTTCCCTCCTGG	64,5	52,4	21	228	NM_005732.4	(He *et al*., 2018)
	Atvirkštinis	AGACTGACCTTTTCACCATGC	63,5	47,6	21			
PPT2	Tiesioginis	ACCATCCCAATGCCACAGTA	65,5	50	20	185	NM_138717.3	(Yuan *et al*., 2020)
	Atvirkštinis	CAACCCAAAAGAATCCCGCA	69,2	50	20			
LUC7L2	Tiesioginis	GGAGATACAACTCGTCAACGAAT	63,5	43,5	23	148	NM_001270643.2	*primerbank* 347446677c1
	Atvirkštinis	CCGCTCTTAAAGCCAGGTCA	66,7	55	20			
PKP3	Tiesioginis	TGATGAGCTTCGCAAAAATG	64,2	40	20	223	NM_007183.4	(Breuninger *et al*., 2010)
	Atvirkštinis	CTGAGAGGCTGAGCTGAGGT	64,4	60	20			
CDCA5	Tiesioginis	AGAAAGTCAGGCGTTCCTACAG	63,9	50	22	210	NM_080668.4	(Xu *et al*., 2019)
	Atvirkštinis	GGGAGATTCCAGGGAGAGTCAT	66,9	54,5	22			
ZFPL1	Tiesioginis	GCCAAGTGCATCGTCCAGT	66,8	57,9	19	126	NM_006782.4	*primerbank* 62857884c2
	Atvirkštinis	AAAGAGATCATAGCAGACAAGGC	62,9	43,5	23			
VPS33B	Tiesioginis	ATGAGCCCTTTGGATCGAATTG	68,2	45,5	22	131	NM_018668.5	(Liang *et al*., 2019)
	Atvirkštinis	ATGCGGGGTCTGACCAAGA	68,4	57,9	19			
GRB7	Tiesioginis	GCCTTCCGCCTCTTCAAGTA	65,8	55	20	106	NM_005310.5	(Gotovac *et al*., 2020)
	Atvirkštinis	CACTTCTCAAGGGTGGGGAG	66,3	60	20			
TCEAL4	Tiesioginis	GAAAAGGAGGGGAAATCTCG	64	50	20	111	NM_001300901.2	(Akaishi *et al*., 2006)
	Atvirkštinis	GGCTTTCTCTCGTCTTGTGG	64,3	55	20			
GAPDH	Tiesioginis	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTT	67,6	50	22	148	NM_002046.7	(Herrera-Goepfert *et al*., 2013)
	Atvirkštinis	ATGGGTGGAATCATATTGGAAC	63,7	40,9	22			

Priedų lentelė 2. MSP tyrimų pradmenų sekos

Genas	Pradmuo	Seka (5'→ 3') (Paryškinti citozinai CpG salose)	Tm °C	CG%	Prademens ilgis, nt	Produkto ilgis, nt	Geno seka	Pradmenų sekos šaltinis
ALX4	Metilintos sekos tiesioginis	GTTAGGTATGAATGTTGAGATTTG**C**	61,8	36	25	178	NC_000011.10	(Liu *et al*., 2014)
	Metilintos sekos atvirkštinis	GAATCCCTATACTTTAAC**G**AC**G**AC	61	41,7	24			
	Nemetilintos sekos tiesioginis	TAGGTATGAATGTTGAGATTTGTGT	60,7	32	25	177		
	Nemetilintos sekos atvirkštinis	CAAATCCCTATACTTTAACAACAAC	59	32	25			
CDX2	Metilintos sekos tiesioginis	**C**GAAAATAAATCACTA**C**GA**C**G	59,3	38,1	21	198	NC_000013.11	(Wang *et al*., 2016)
	Metilintos sekos atvirkštinis	AAAGGATATTGGAGAGTATTTTA**G**	56	29,2	24			
	Nemetilintos sekos tiesioginis	ATTCAAAATAAAAATCACTACAACA	57,8	20	24	202		
	Nemetilintos sekos atvirkštinis	AAAGGATATTGGAGAGTATTTTAG	56	29,2	24			

Priedų lentelė 2. MSP tyrimų pradmenų sekos (tęsinys)

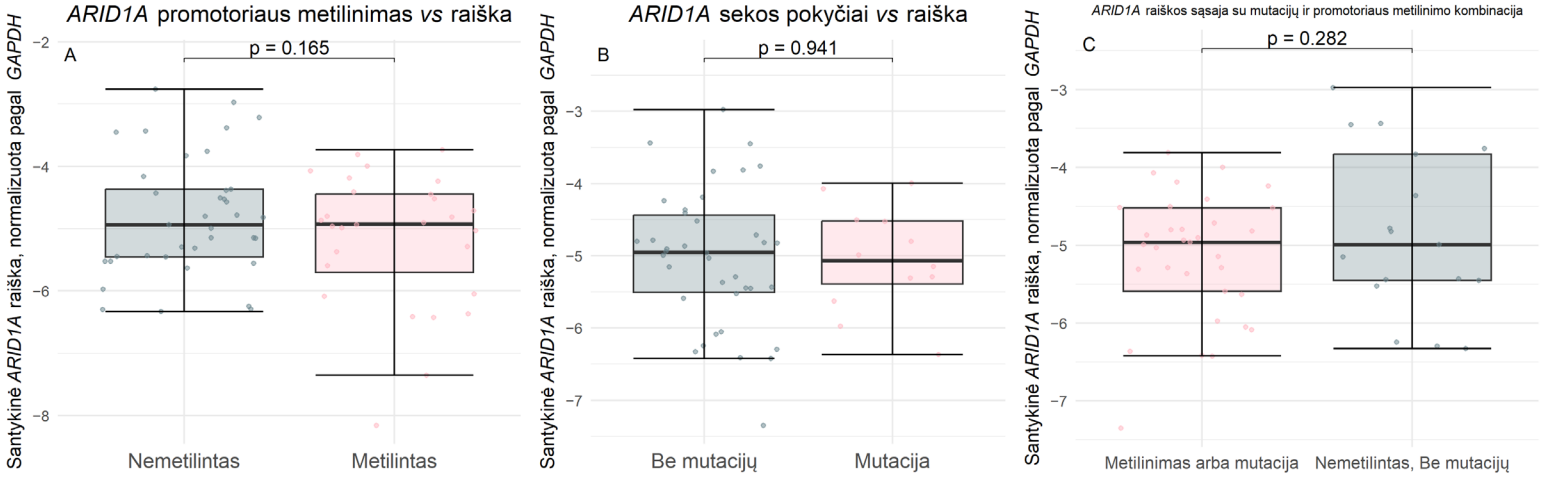
Genas	**Pradmuo**	**Seka (5‘→ 3‘)(Paryškinti citozinai CpG salose)**	**Tm °C**	**CG %**	**Prademens ilgis, nt**	**Produkto ilgis, nt**	**Geno seka**	**Pradmenų sekos šaltinis**
HOPX	Metilintos sekos tiesioginis	G**C**GAATTAGGAGGTTGAGGT**C**	64,1	52,4	21	144	NC_000004.12	Sukurta su *Methyl Primer Express* programa
	Metilintos sekos atvirkštinis	TC**G**AAACCAAATCTCC**G**TAACT	63,9	40,9	22			
	Nemetilintos sekos tiesioginis	TTGGTGAATTAGGAGGTTGAGGTT	65,8	41,7	24	147		
	Nemetilintos sekos atvirkštinis	TCAAAACCAAATCTCCATAACTTCA	64,6	32	25			
ARID1A	Metilintos sekos tiesioginis	GG**C**GTAGGTTTTAGAGATGC	60,8	50	20	153	NC_000001.11	(Erfani *et al*., 2020)
	Metilintos sekos atvirkštinis	AAAC**G**AACTC**G**CTCCCTT	61,9	50	18			
	Nemetilintos sekos tiesioginis	GGTGTAGGTTTTAGAGATGT	52,8	40	20	153		
	Nemetilintos sekos atvirkštinis	AAACAAACTCACTCCCTT	54,1	38,9	18			

Priedų lentelė 3. Sekoskaitos eksperimentų metu nustatyti genų *CTNNB1* ir *ARID1A* pakitimai

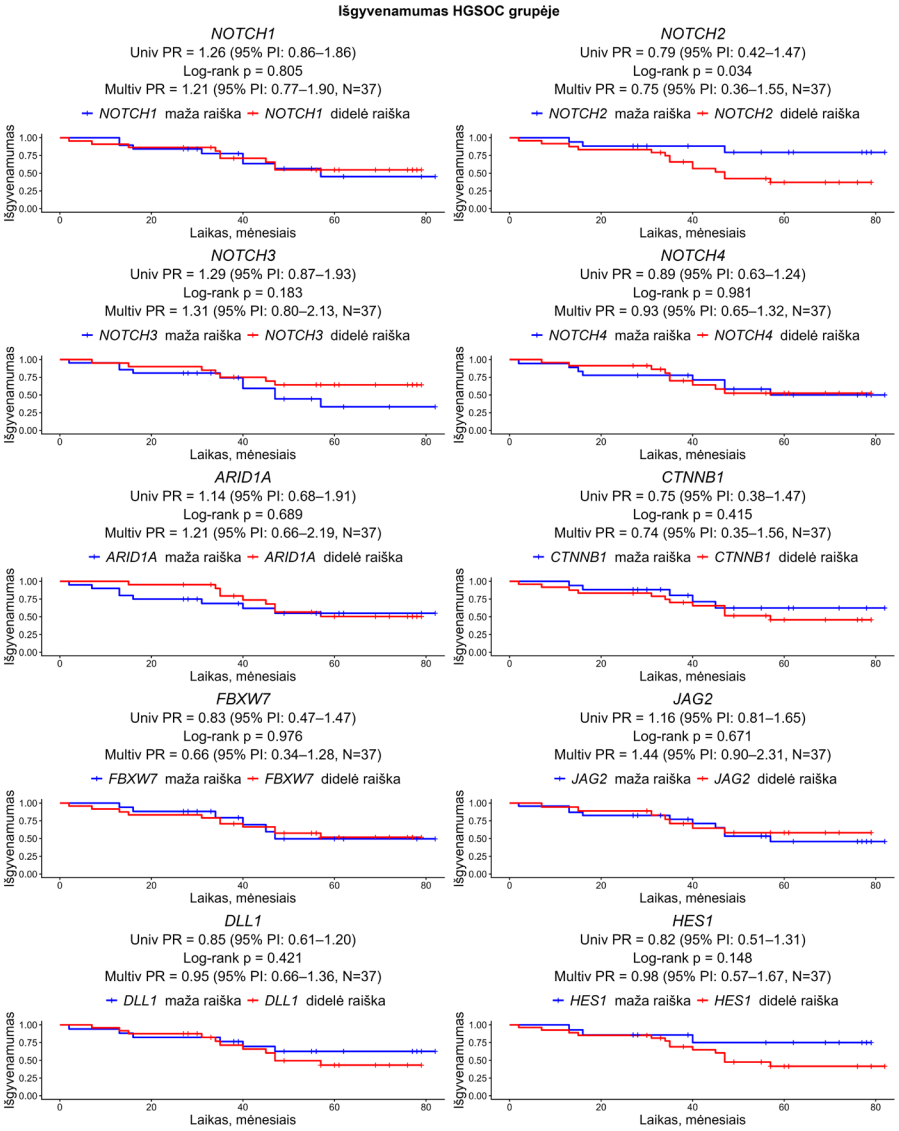
Nr.	Mėginiai	Naviko tipas	Genominė lokacija	Genas	Geno sekos pakitimas	Nukleorūgšties sekos pakitimas	Pakitimo tipas	ClinVar
1	KN–043	Endometrioidinis gimdos ir kiaušidžių vėžys	chr3:41266104	*CTNNB1*	c.101G>A	p.Gly34Glu	*missense*	Patogeniška / galimai patogeniška
2	KN–071	Šviesių ląstelių KV	chr3:41266113	*CTNNB1*	c.110C>G	p.Ser37Cys	*missense*	Patogeniška / galimai patogeniška
3	KN–071	Šviesių ląstelių KV	chr1:27057961	*ARID1A*	c.1670_1674delAGTCT	p.Gln557ProfsTer64	Rėmelio poslinkio iškrita	
4	KN–013	Endometrioidinis gimdos ir kiaušidžių vėžys	chr1:27099367	*ARID1A*	c.3606delG	p.Asn1203IlefsTer3	Rėmelio poslinkio iškrita	
5	KN–043	Endometrioidinis gimdos ir kiaušidžių vėžys	chr1:27106364	*ARID1A*	c.5975C>A	p.Ser1992Ter	*nonsense*	
6	KN–018	HGSOC	chr1:27099478	*ARID1A*	c.3715G>A	p.Ala1239Thr	*missense*	
7	KN–073	HGSOC	chr1:27023961	*ARID1A*	c.1067G>A	p.Arg356Lys	*missense*	
8	KN–019	HGSOC	chr1:27106228	*ARID1A*	c.5839C>G	p.Gln1947Glu	*missense*	
9	KN–033	HGSOC	chr1:27101532	*ARID1A*	c.4814C>T	p.Pro1605Leu	*missense*	
	KN–064	Serozinis paribinis KV						
10	KN–025	Mucininis paribinis KV	chr1:27089762	*ARID1A*	c.2718C>G	p.Asn906Lys	*missense*	Nežinomo patogeniškumo / galimai nepatogeniška

Priedų lentelė 3. Sekoskaitos eksperimentų metu nustatyti genų *CTNNB1* ir *ARID1A* pakitimai (tęsinys)

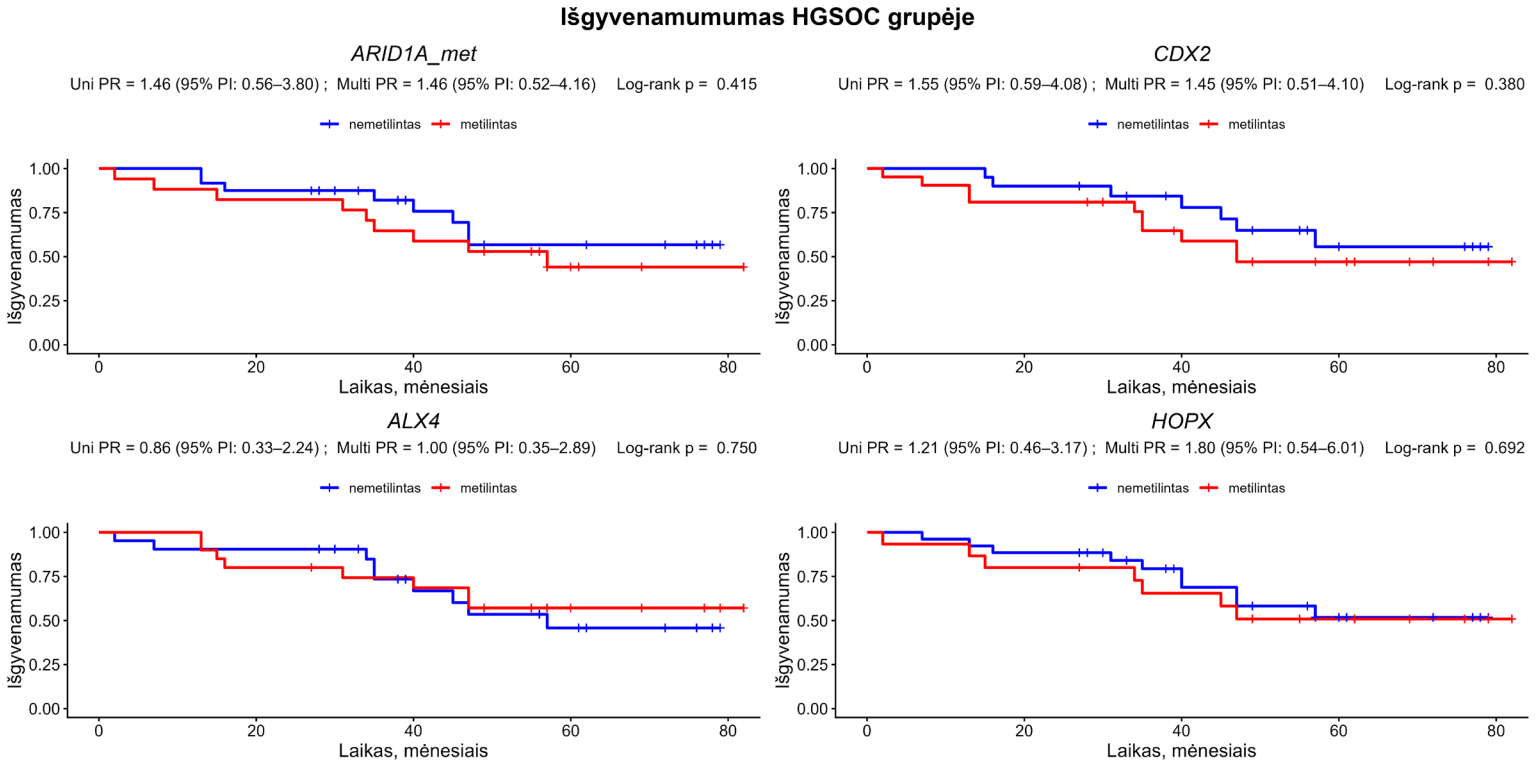
Nr.	Mėginiai	Naviko tipas	Genominė lokacija	Genas	Geno sekos pakitimas	Nukleorūgšties sekos pakitimas	Pakitimo tipas	ClinVar
11	KN–062	Mucininis paribinis KV	chr1:27101504	*ARID1A*	c.4786G>T	p.Glu1596Ter	*nonsense*	
12	KN–030	HGSOC	chr1:27105686	*ARID1A*	c.5297A>T	p.Glu1766Val	*missense*	



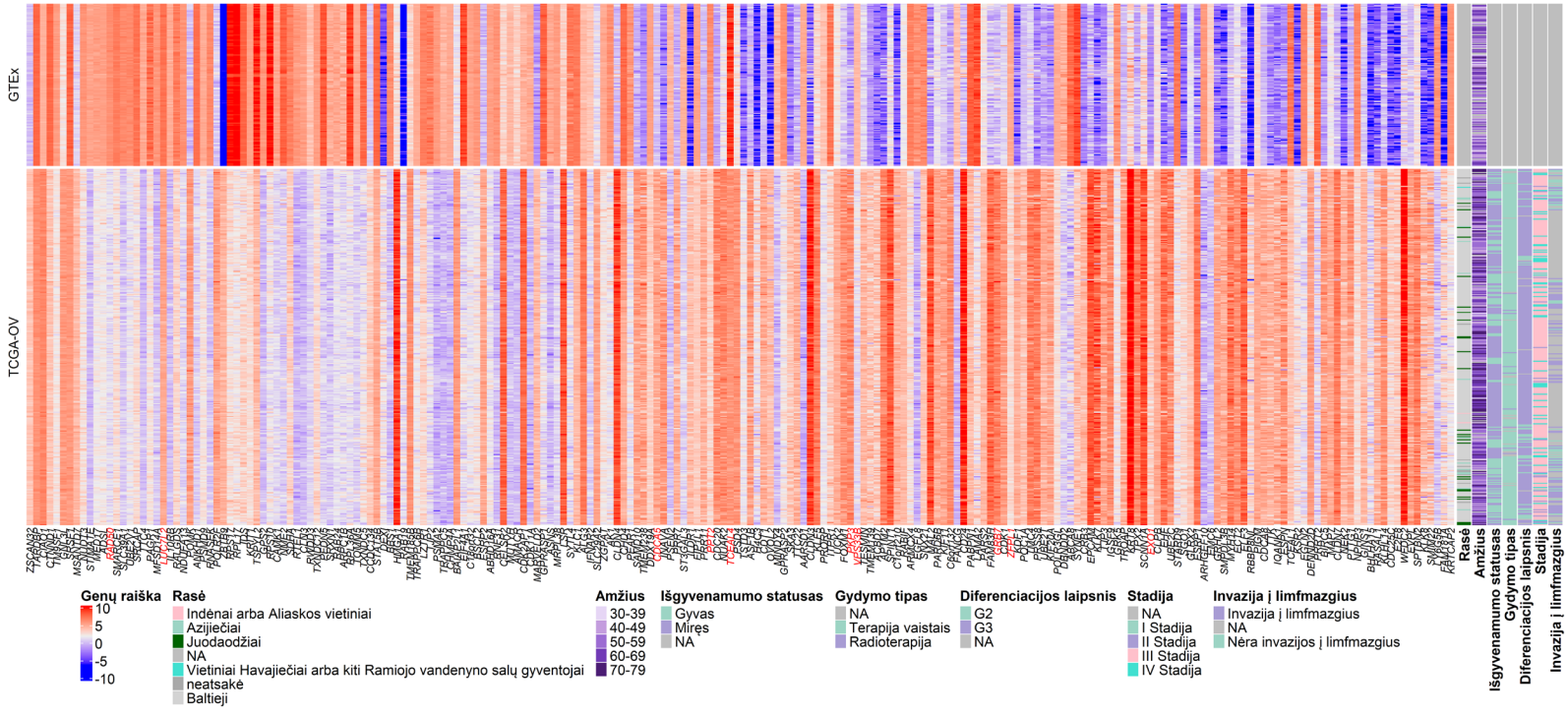
Priedų pav. 1 *ARID1A* raiška pagal *ARID1A* promotoriaus metilinimo statusą (**A**); *ARID1A* geno sekos pakitimus (**B**), *ARID1A* geno promotoriaus metilinimo statuso ir geno sekos pakitimų kombinaciją (**C**)



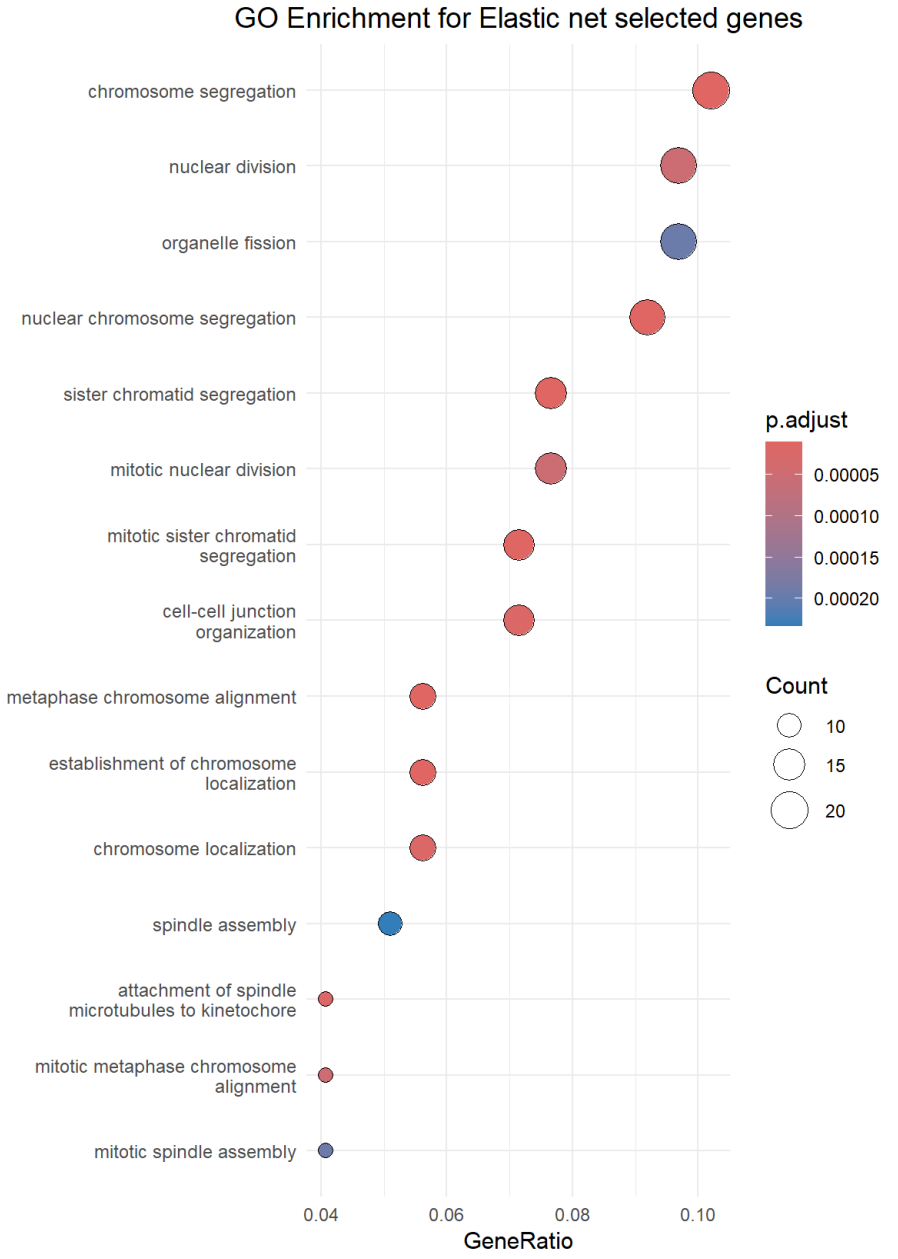
Priedų pav. 2 Išgyvenamumo analizė HGSOC grupėje: Notch, Wnt signalinių kelių ir *ARID1A* genų raiškos biožymenys. Kaplan–Meier kreivėse didelė raiška = daugiau už medianą, maža raiška = mažiau už geno raiškos medianą. Sutrumpinimai: *Uni PR* = vienmatės kokso analizės PR; *Multi PR* = daugiamatės kokso analizės PR, koreguojant pagal amžių ir CA125 koncentraciją diagnozės metu



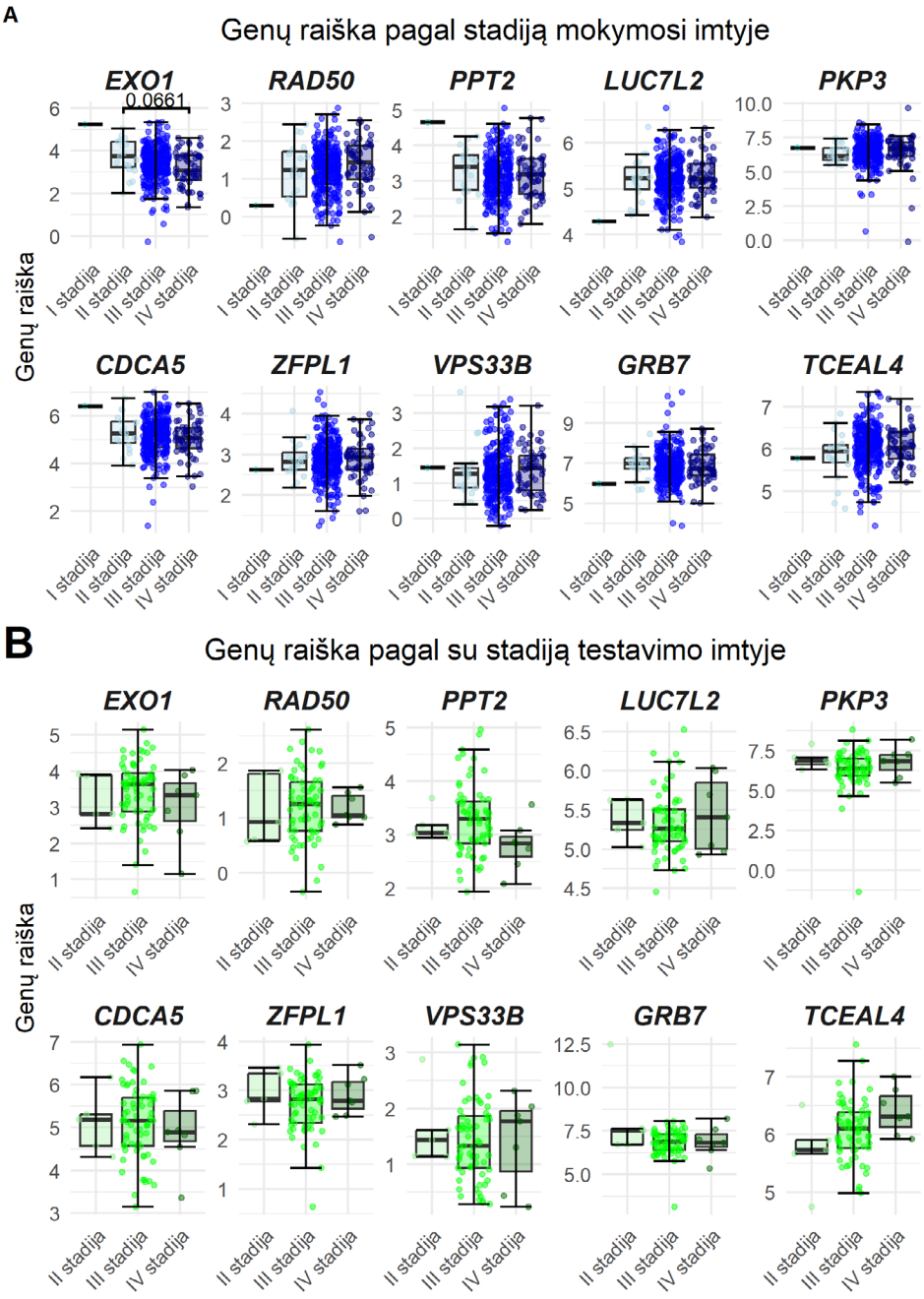
Priedų pav. 3 Išgyvenamumo analizė HGSOC grupėje: genų promotorių metilinimo statuso biožymenys. Sutrumpinimai: *Uni PR* = vienmatės kokso analizės PR; *Multi PR* = daugiafaktorinės kokso analizės PR, koreguojant pagal amžių ir CA125 koncentraciją diagnozės metu



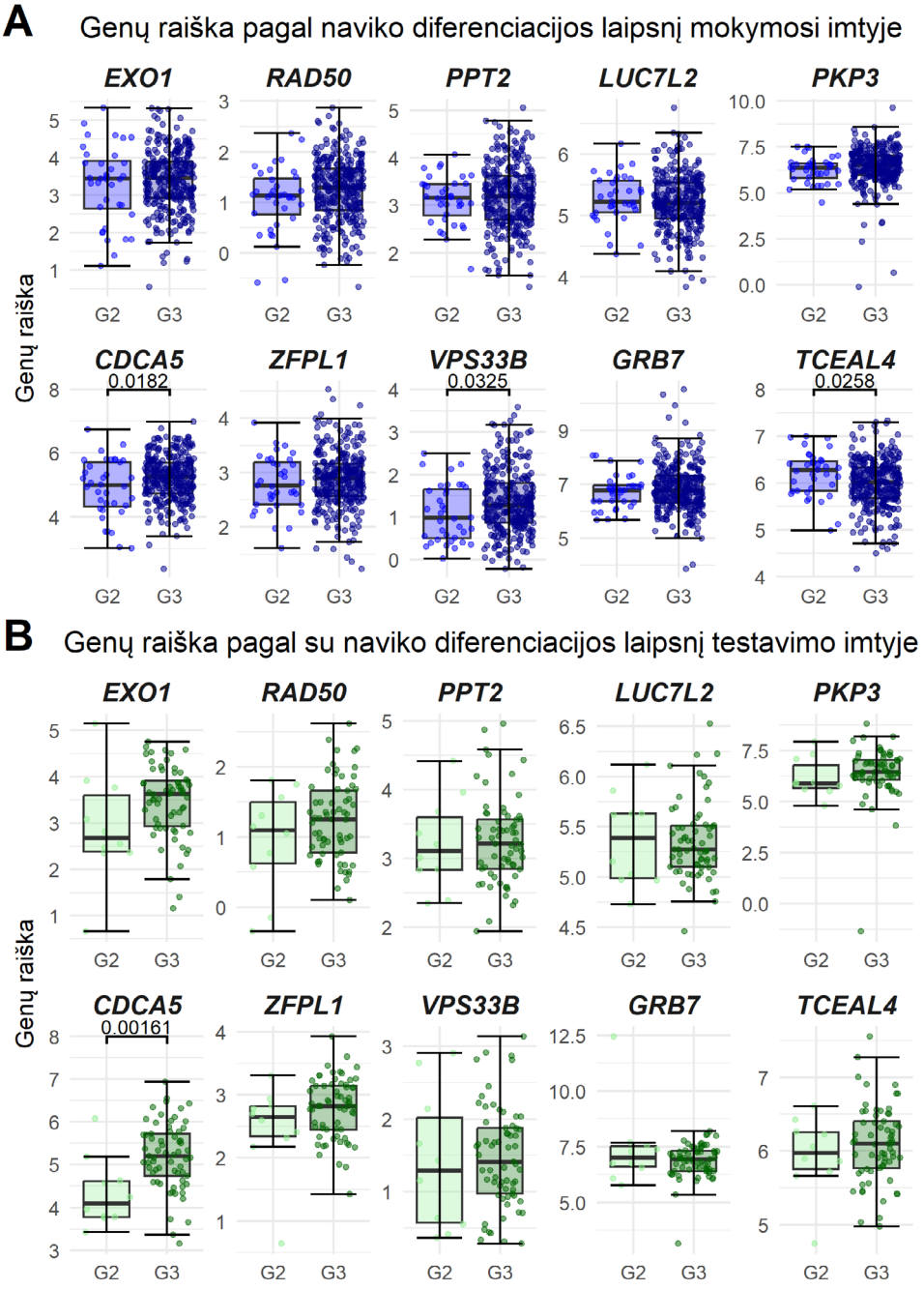
Priedų pav. 4 Mokymosi imtyje elastinio tinklo algoritmo atrinktų genų, atskiriančių KV (TCGA–OV) nuo sveikų kiaušidžių audinių (GTEx), raiškos šiluminis žemėlapis. Raudonai pažymėti genai, pasirinkti LASSO–kokso algoritmo



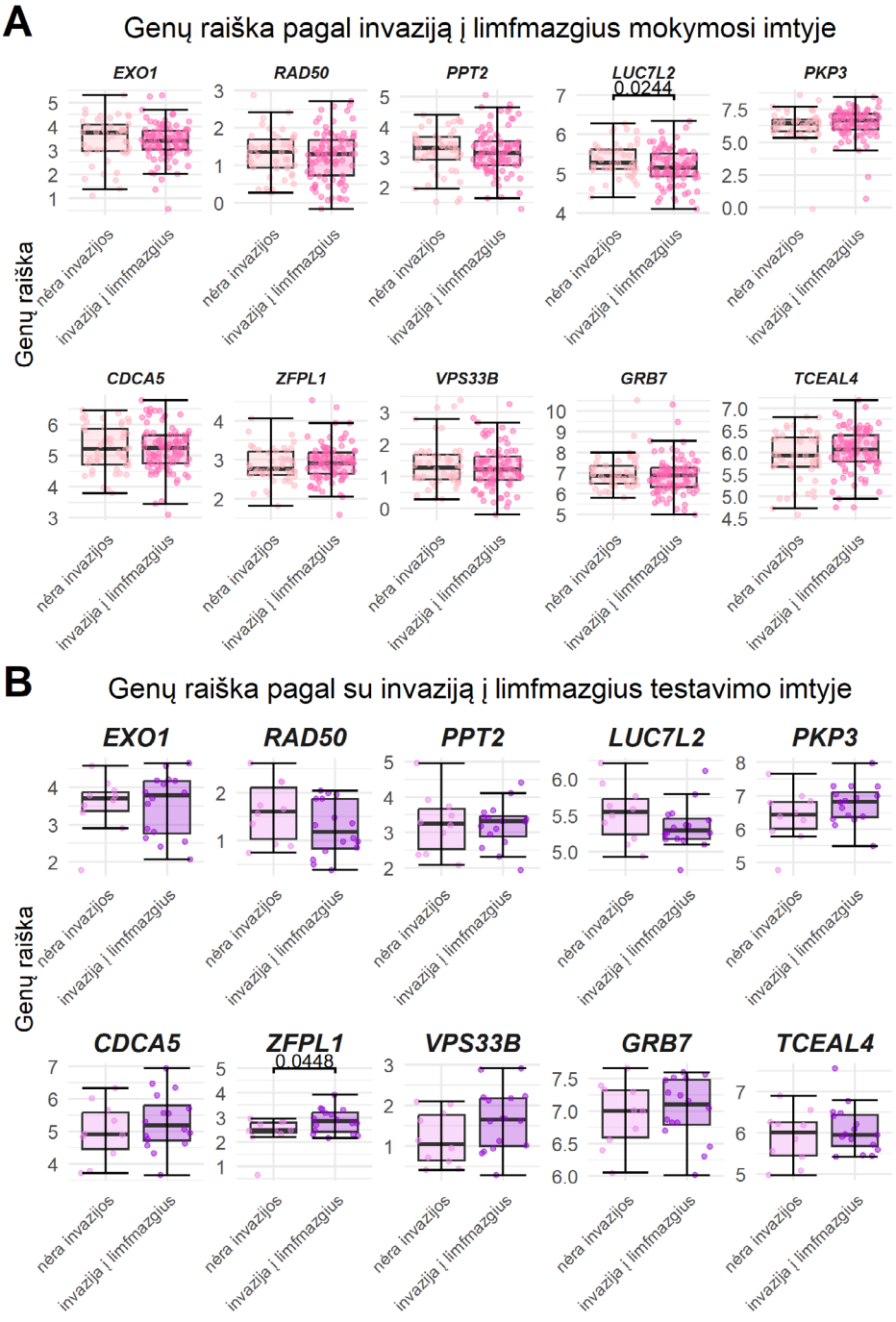
Priedų pav. 5 Mokymosi imtyje elastinio tinklo algoritmo atrinktų genų, atskiriančių KV nuo sveikų kiaušidžių audinių, svarbiausios funkcijos (15 svarbiausių) pagal genų ontologijos pagausinimo analizę. *GeneRatio* – genų santykis, *Count* – genų skaičius. Pagrindinės kategorijos susiję su mitoze ir ląstelių jungčių organizacija



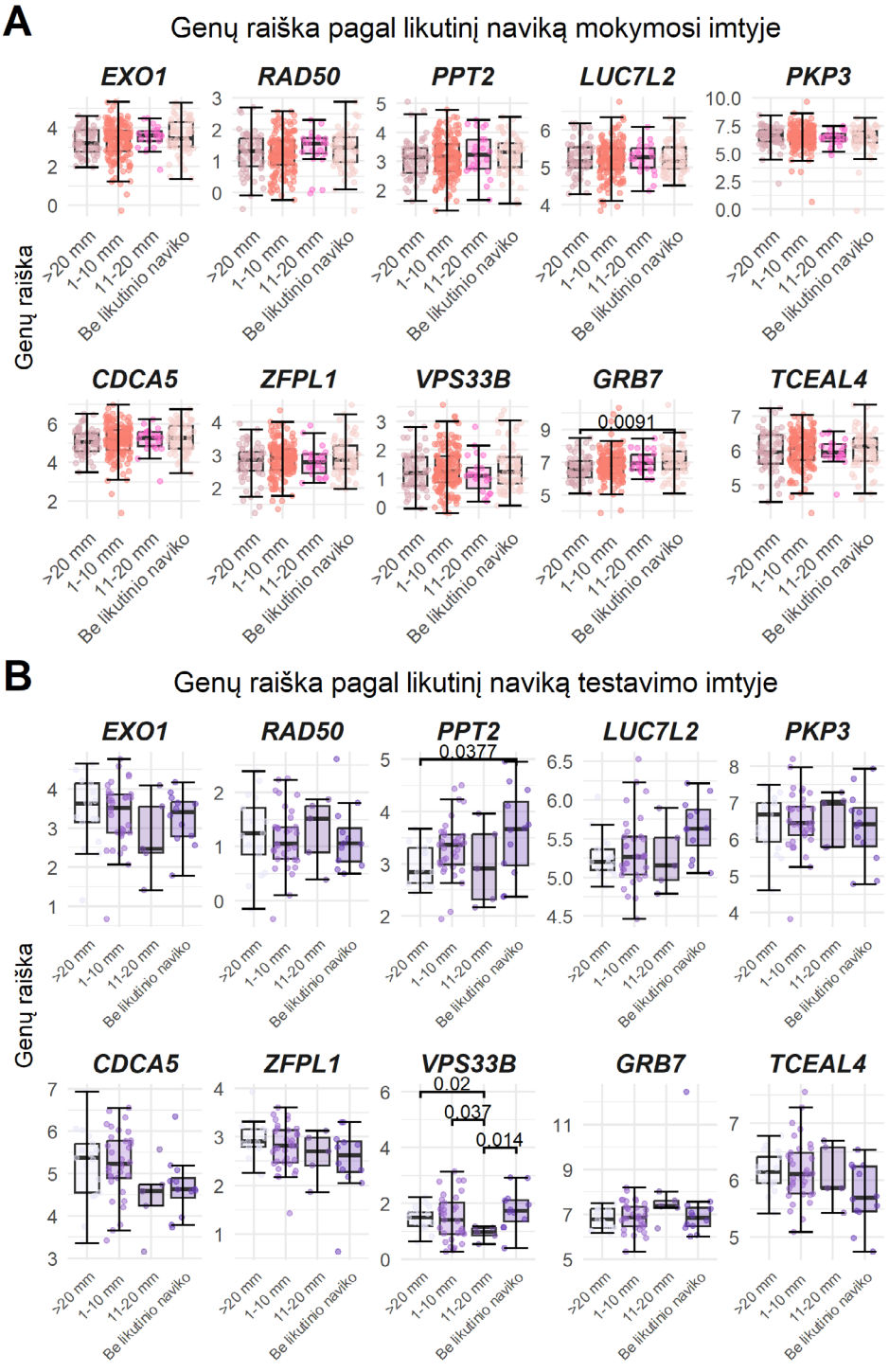
Priedų pav. 6 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiška pagal naviko stadiją mokymosi (**A**) ir testavimo (**B**) imtyse



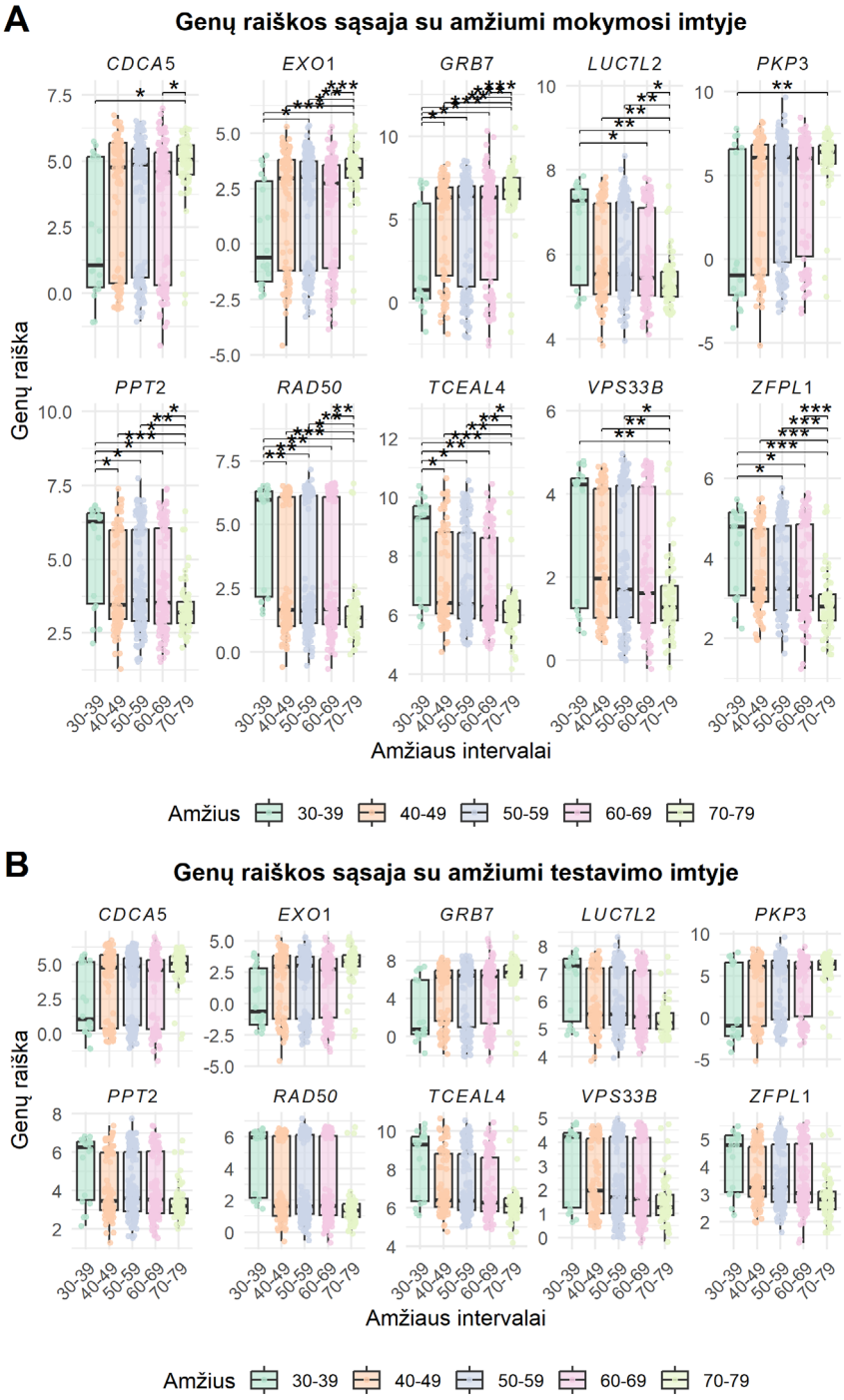
Priedų pav. 7 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiška pagal naviko diferenciacijos laipsnį mokymosi (**A**) ir testavimo (**B**) imtyse



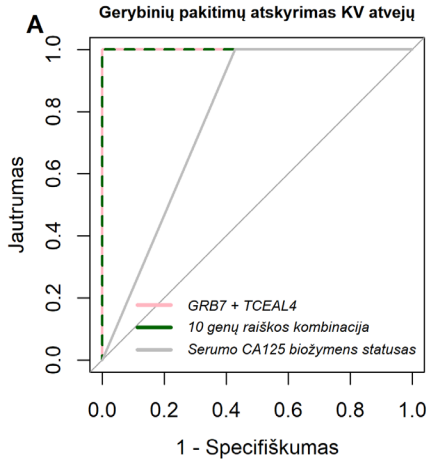
Priedų pav. 8 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiška pagal invaziją į limfmazgius mokymosi (**A**) ir testavimo (**B**) imtyse

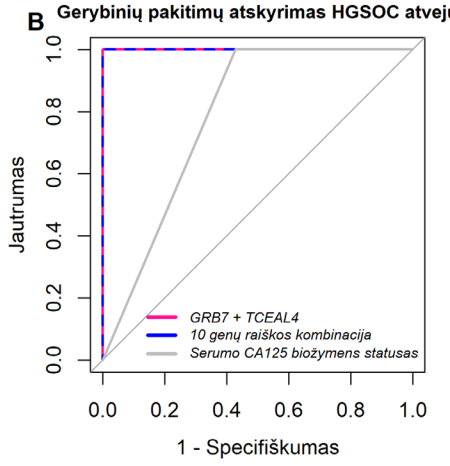


Priedų pav. 9 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiška pagal likutinio naviko statusą mokymosi (**A**) ir testavimo (**B**) imtyse



Priedų pav. 10 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiška pagal pacienčių su amžių mokymosi (**A**) ir testavimo (**B**) imtyje, * – $p \leq 0{,}05$, ** – $p < 0{,}001$, *** – $p < 0{,}001$





ROC kriterijai

Gerybinių pakitimų atskyrimas nuo KV atvejų

Biožymenys	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
GRB7 + TCEAL4	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000
10 genų raiškos kombinacija	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000
Serumo CA125 biožymens statusas	0.775	0.500	0.926	0.979	0.571

ROC kriterijai

Gerybinių pakitimų atskyrimas nuo HGSOC atvejų

Biožymenys	plotas po kreive	slenkstinė vertė	tikslumas	jautrumas	specifiškumas
GRB7 + TCEAL4	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000
10 genų raiškos kombinacija	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000
Serumo CA125 biožymens statusas	0.786	0.500	0.932	1.000	0.571

Priedų pav. 11 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų raiškos modelių diagnostinis potencialas atskiriant KV nuo gerybinių pakitimų atvejų (**A**) ir HGSOC nuo gerybinių pakitimų atvejų (**B**)

Priedų lentelė 3 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų porų kombinacijų ROC kriterijai atskiriant HGSOC atvejus nuo gerybinių pakitimų

Nr.	Genas 1	Genas 2	AUC	Tikslumas	Jautrumas	Specifiškumas	Gerybinių pakitimų atvejų skaičius	HGSOC atvejų skaičius
1	*EXO1*	*VPS33B*	1	1	1	1	7	36
2	*RAD50*	*GRB7*	1	1	1	1	8	37
3	*PPT2*	*GRB7*	1	1	1	1	7	36
4	*LUC7L2*	*GRB7*	1	1	1	1	8	34
5	*PKP3*	*TCEAL4*	1	1	1	1	5	36
6	*ZFPL1*	*GRB7*	1	1	1	1	8	36
7	*VPS33B*	*GRB7*	1	1	1	1	8	37
8	*GRB7*	*TCEAL4*	1	1	1	1	8	37
9	*CDCA5*	*TCEAL4*	0,990625	0,958333	0,95	1	8	40
10	*PKP3*	*ZFPL1*	0,988889	0,95122	0,944444	1	5	36
11	*VPS33B*	*TCEAL4*	0,988889	0,979592	0,975	1	9	40
12	*RAD50*	*TCEAL4*	0,986111	0,979592	0,975	1	9	40
13	*CDCA5*	*GRB7*	0,984556	0,909091	0,891892	1	7	37
14	*CDCA5*	*VPS33B*	0,983974	0,978723	0,974359	1	8	39
15	*RAD50*	*PKP3*	0,983333	0,926829	0,916667	1	5	36
16	*ZFPL1*	*TCEAL4*	0,983333	0,959184	0,95	1	9	40
17	*LUC7L2*	*TCEAL4*	0,982906	0,9375	0,923077	1	9	39
18	*PPT2*	*PKP3*	0,982857	0,925	0,914286	1	5	35
19	*PPT2*	*TCEAL4*	0,980769	0,93617	0,923077	1	8	39

Priedų lentelė 3 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų porų kombinacijų ROC kriterijai atskiriant HGSOC atvejus nuo gerybinių pakitimų (tęsinys)

Nr.	Genas 1	Genas 2	AUC	Tikslumas	Jautrumas	Specifiškumas	Gerybinių pakitimų atvejų skaičius	HGSOC atvejų skaičius
20	*EXO1*	*TCEAL4*	0,980695	0,954545	0,945946	1	7	37
21	*PKP3*	*VPS33B*	0,977778	0,902439	0,888889	1	5	36
22	*PKP3*	*GRB7*	0,977143	0,95	0,942857	1	5	35
23	*EXO1*	*GRB7*	0,971429	0,878049	0,857143	1	6	35
24	*PPT2*	*CDCA5*	0,970395	0,934783	0,921053	1	8	38
25	*PKP3*	*CDCA5*	0,966667	0,853659	0,833333	1	5	36
26	*LUC7L2*	*PKP3*	0,964706	0,846154	0,823529	1	5	34
27	*CDCA5*	*ZFPL1*	0,961538	0,87234	0,846154	1	8	39
28	*EXO1*	*PKP3*	0,948529	0,815789	0,794118	1	4	34
29	*EXO1*	*PPT2*	0,93254	0,837209	0,805556	1	7	36
30	*LUC7L2*	*CDCA5*	0,932432	0,777778	0,72973	1	8	37
31	*RAD50*	*CDCA5*	0,929487	0,787234	0,74359	1	8	39
32	*PPT2*	*VPS33B*	0,916667	0,893617	0,871795	1	8	39
33	*PPT2*	*ZFPL1*	0,914474	0,891304	0,868421	1	8	38
34	*PPT2*	*LUC7L2*	0,912162	0,888889	0,864865	1	8	37
35	*EXO1*	*ZFPL1*	0,910204	0,809524	0,771429	1	7	35
36	*RAD50*	*PPT2*	0,898026	0,804348	0,763158	1	8	38
37	*EXO1*	*RAD50*	0,891892	0,931818	0,972973	0,714286	7	37
38	*RAD50*	*VPS33B*	0,88604	0,854167	0,820513	1	9	39

Priedų lentelė 3 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų porų kombinacijų ROC kriterijai atskiriant HGSOC atvejus nuo gerybinių pakitimų (tęsinys)

Nr.	Genas 1	Genas 2	AUC	Tikslumas	Jautrumas	Specifiškumas	Gerybinių pakitimų atvejų skaičius	HGSOC atvejų skaičius
39	*EXO1*	*LUC7L2*	0,885714	0,785714	0,742857	1	7	35
40	*EXO1*	*CDCA5*	0,884921	0,767442	0,722222	1	7	36
41	*ZFPL1*	*VPS33B*	0,874644	0,854167	0,846154	0,888889	9	39
42	*LUC7L2*	*VPS33B*	0,861862	0,804348	0,783784	0,888889	9	37
43	*RAD50*	*LUC7L2*	0,855856	0,73913	0,675676	1	9	37
44	*RAD50*	*ZFPL1*	0,853801	0,744681	0,684211	1	9	38
45	*LUC7L2*	*ZFPL1*	0,836257	0,787234	0,763158	0,888889	9	38

Priedų lentelė 4 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų porų kombinacijų ROC kriterijai atskiriant KV atvejus nuo gerybinių pakitimų

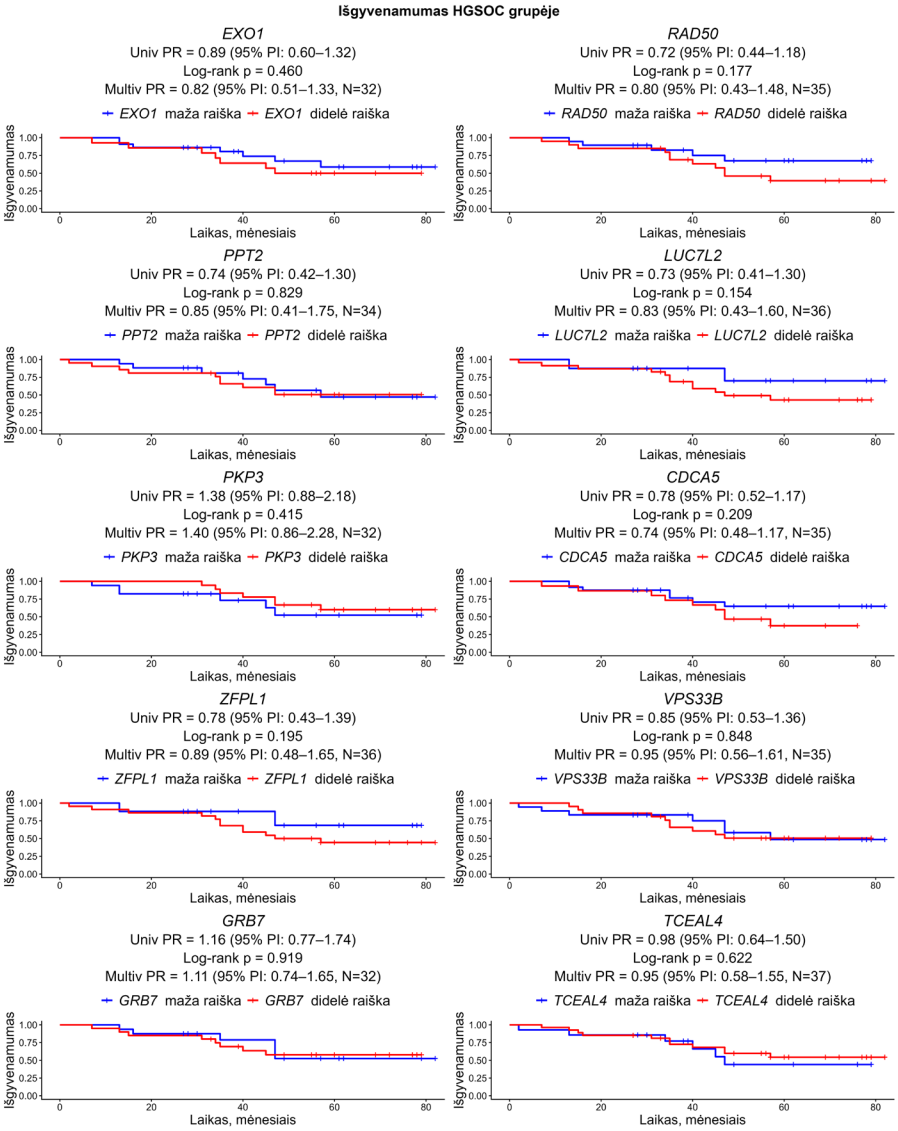
Nr.	Genas 1	Genas 2	AUC	Tikslumas	Jautrumas	Specifiškumas	Gerybinių pakitimų atvejų skaičius	KV atvejų skaičius
1	*RAD50*	*GRB7*	1	1	1	1	8	47
2	*PPT2*	*GRB7*	1	1	1	1	7	45
3	*LUC7L2*	*GRB7*	1	1	1	1	8	45
4	*PKP3*	*TCEAL4*	1	1	1	1	5	48
5	*ZFPL1*	*GRB7*	1	1	1	1	8	47
6	*VPS33B*	*GRB7*	1	1	1	1	8	47
7	*GRB7*	*TCEAL4*	1	1	1	1	8	49
8	*PKP3*	*ZFPL1*	0,978723	0,903846	0,893617	1	5	47

Priedų lentelė 4 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų porų kombinacijų ROC kriterijai atskiriant KV atvejus nuo gerybinių pakitimų (tęsinys)

Nr.	Genas 1	Genas 2	AUC	Tikslumas	Jautrumas	Specifiškumas	Gerybinių pakitimų atvejų skaičius	KV atvejų skaičius
9	*EXO1*	*VPS33B*	0,97619	0,938776	0,928571	1	7	42
10	*CDCA5*	*GRB7*	0,975155	0,867925	0,847826	1	7	46
11	*PKP3*	*GRB7*	0,973913	0,921569	0,913043	1	5	46
12	*RAD50*	*PKP3*	0,969565	0,862745	0,847826	1	5	46
13	*RAD50*	*TCEAL4*	0,969499	0,9	0,882353	1	9	51
14	*VPS33B*	*TCEAL4*	0,967949	0,901639	0,884615	1	9	52
15	*ZFPL1*	*TCEAL4*	0,966457	0,919355	0,90566	1	9	53
16	*CDCA5*	*TCEAL4*	0,965	0,896552	0,88	1	8	50
17	*PPT2*	*TCEAL4*	0,964286	0,912281	0,897959	1	8	49
18	*PPT2*	*PKP3*	0,963636	0,918367	0,909091	1	5	44
19	*CDCA5*	*VPS33B*	0,963542	0,928571	0,916667	1	8	48
20	*EXO1*	*GRB7*	0,963415	0,957447	0,97561	0,833333	6	41
21	*PKP3*	*VPS33B*	0,96087	0,862745	0,847826	1	5	46
22	*LUC7L2*	*TCEAL4*	0,960784	0,883333	0,862745	1	9	51
23	*EXO1*	*TCEAL4*	0,957792	0,901961	0,886364	1	7	44
24	*LUC7L2*	*PKP3*	0,955556	0,86	0,844444	1	5	45
25	*PKP3*	*CDCA5*	0,943478	0,803922	0,782609	1	5	46
26	*PPT2*	*CDCA5*	0,942935	0,888889	0,869565	1	8	46
27	*CDCA5*	*ZFPL1*	0,931122	0,77193	0,734694	1	8	49

Priedų lentelė 4 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų porų kombinacijų ROC metrikos atskiriant KV atvejus nuo gerybinių pakitimų (tęsinys)

Nr.	Genas 1	Genas 2	AUC	Tikslumas	Jautrumas	Specifiškumas	Gerybinių pakitimų atvejų skaičius	KV atvejų skaičius
28	*RAD50*	*CDCA5*	0,927083	0,767857	0,729167	1	8	48
29	*EXO1*	*PKP3*	0,920732	0,777778	0,756098	1	4	41
30	*EXO1*	*PPT2*	0,913621	0,82	0,790698	1	7	43
31	*LUC7L2*	*CDCA5*	0,909574	0,890909	0,914894	0,75	8	47
32	*PPT2*	*ZFPL1*	0,888298	0,854545	0,829787	1	8	47
33	*PPT2*	*VPS33B*	0,885638	0,8	0,765957	1	8	47
34	*EXO1*	*LUC7L2*	0,877551	0,734694	0,690476	1	7	42
35	*RAD50*	*VPS33B*	0,875556	0,813559	0,78	1	9	50
36	*RAD50*	*PPT2*	0,869565	0,759259	0,717391	1	8	46
37	*ZFPL1*	*VPS33B*	0,869281	0,75	0,705882	1	9	51
38	*EXO1*	*ZFPL1*	0,867347	0,714286	0,666667	1	7	42
39	*EXO1*	*RAD50*	0,863787	0,92	0,953488	0,714286	7	43
40	*RAD50*	*ZFPL1*	0,861678	0,758621	0,714286	1	9	49
41	*PPT2*	*LUC7L2*	0,859043	0,781818	0,744681	1	8	47
42	*RAD50*	*LUC7L2*	0,846336	0,732143	0,680851	1	9	47
43	*LUC7L2*	*ZFPL1*	0,84127	0,793103	0,77551	0,888889	9	49
44	*EXO1*	*CDCA5*	0,837209	0,72	0,674419	1	7	43
45	*LUC7L2*	*VPS33B*	0,834515	0,75	0,723404	0,888889	9	47



Priedų pav. 12 10–ties statistiniais metodais atrinktų genų raiškos biožymenų išgyvenamumo analizė HGSOC grupėje. Kaplan–Meier kreivėse didelė raiška = daugiau už medianą, maža raiška = mažiau už geno raiškos medianą. Sutrumpinimai: *Uni PR* = vienmatės kokso analizės PR; *Multi PR* = daugiafaktorinės kokso analizės PR, koreguojant pagal amžių ir CA125 koncentraciją diagnozės metu

SUMMARY

INTRODUCTION

Ovarian Cancer (OC) is the eighth leading oncogynecologic malignancy in Lithuania and worldwide, both in terms of incidence and mortality (Allemani *et al*., 2018). OC is a heterogenic disease classified according to molecular, histological and clinical features into epithelial cancer (90% of OC cases), and germ cell and sex-cord – stromal tumors. Epithelial OC is further divided into type I and type II tumors. Type I tumors include various tumor histologies, such as endometrioid, clear cell, mucinous and other, and are associated with favorable survival rates (47–90%). In contrast, type II tumors are predominantly high-grade serous ovarian carcinomas (HGSOC), which have low survival rates (5-year survival only 32–48%) (Cabasag *et al*., 2023).

Currently, the only OC biomarkers used in clinical practice are serum proteins CA125 and HE4, however their sensitivity and specificity are limited (Colombo *et al*., 2019). Moreover, OC patients do not present any specific symptoms, thus usually OC is detected at an advanced (III–IV) stages, particularly in cases of HGSOC, that are known for high chemoresistance and short survival (Bell *et al*., 2011). Due to these challenges, the identification of new biomarkers is crucial for OC clinical practice to improve early diagnosis, prognosis and treatment selection.

The present study investigates gene expression, mutation and promoter methylation biomarkers for their potential use in diagnosis and prognosis of OC. Based on literature analysis and previous research (hypothesis driven approach) selected biomarkers were *ARID1A*, *CTNNB1* and *FBXW7* mutation status, Notch and Wnt signaling pathway gene (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *DLL1*, *JAG2*, *HES1*, *CTNNB1* and *FBXW7*) expression, as well as expression and promoter methylation status of *ARID1A*, the second most commonly mutated gene in OC. In addition, HOX gene (*ALX4*, *CDX2* and *HOPX*) promoter methylation was examined. In the second part of the study, transcriptomic datasets form the Cancer Genome Altas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression portal (GTEx) were analyzed using regression algorithms to identify top genes related to OC (data driven biomarker selection). Statistical analysis identified ten genes involved in various cancer-related functions (*EXO1*, *RAD50*, *PPT2*, *LUC7L2*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B*, *GRB7* and *TCEAL4*) which were selected for further analysis in OC tissues. In total, 27 potential OC biomarkers and their combinations were investigated to assess their diagnostic value and their association with clinical and demographic features.

The aim of the study was to identify potential diagnostic and prognostic biomarkers for oncogynecologic diseases.

Tasks:

1. Analyze open–access database and relevant scientific literature data to identify promising genetic biomarkers for oncogynecologic tumors;
2. Asses the selected biomarkers in a cohort of ovarian tumor samples;
3. Evaluate combinations of the selected biomarkers for their diagnostic and prognostic potential;
4. Examine the associations between the selected biomarkers and clinical as well as demographic characteristics.

SCIENTIFIC NOVELTY AND PRACTICAL VALUE

This study, for the first time, analyzed selected gene expression, gene mutation and promoter methylation biomarkers in a patient cohort collected in Lithuania. The results expanded upon the scientific understanding of the signaling pathways, gene expression and epigenetic regulation in ovarian cancer.

SWI/SNF chromatin remodeling complex gene *ARID1A* mutation, expression and promoter methylation was investigated for the first time in Lithuanian ovarian cancer patient cohort.

After evaluating the gene expression of Notch and Wnt signaling pathways in a cohort of ovarian tumor tissues, the study performed, for the first time, an analysis of their combination with promoter methylation biomarkers. Such combined biomarker test models are rare, as they require extensive experimental data.

Although the use of TCGA and GTEx project data is a common approach for identifying potential biomarkers and developing prognostic models, experimental validation of selected diagnostic biomarkers remains limited. In this study, statistical (data-driven) biomarker selection method was compared to biomarker selection using hypothesis (literature-based) approach, enabling not only validation of known diagnostic biomarkers but also the identification of novel transcriptomic biomarkers with diagnostic and prognostic potential in ovarian cancer.

This study investigated, for the first time, the promoter methylation and diagnostic value of the non-canonical HOX family genes *ALX4*, *CDX2* and *HOPX*. Although *ALX4* promoter methylation was previously reported in TCGA-based OC study (Duan *et al*., 2024), the promoter methylation of

selected HOX family genes in ovarian tumors were not previously examined using methylation-specific PCR (MSP) method.

Further studies involving larger patient cohorts and liquid biopsy samples are required to further validate and implement these biomarkers and their combinations in ovarian cancer diagnostics and prognostics. The results of this study are promising and may contribute to advances in OC diagnostics by facilitating the development of novel molecular tests. Such genetic tests could enable early-stage detection of ovarian tumors, accurate tumor type classification and prognosis, as well as selection of the most appropriate treatment.

DEFENDING STATEMENTS

1. Notch receptor coding genes, *DLL1*, *HES1*, *CTNNB1*, and *FBXW7* expression biomarkers have greater diagnostic potential than *ARID1A* and HOX family gene promoter methylation status.

2. *ARID1A* gene expression in ovarian cancer tissues could be influenced by both mutations and promoter hypermethylation.

3. *CTNNB1*, *GRB7* and *TCEAL4* gene expression are potential ovarian cancer diagnostic biomarkers, while *NOTCH3* and *HES1* expression – potential prognostic biomarkers.

4. Biomarker combinations improve diagnostic and prognostic accuracy of ovarian cancer test models.

1. MATERIALS AND METHODS

The present study analyzed 20 gene expression, 3 gene mutation and 4 gene promoter methylation biomarkers in 65 ovarian tumor tissue samples.

The study was separated into two parts. First, using scientific literature and previous research, *CTNNB1*, *FBXW7* and *ARID1A* gene mutation, *ARID1A* and HOX family gene *CDX2*, *ALX4* and *HOPX* promoter methylation, and *ARID1A* gene, Notch and Wnt signaling pathway genes *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *JAG2*, *DLL1*, *HES1*, *CTNNB1*, and *FBXW7* were chosen as potential OC biomarkers and were investigated in ovarian tumor tissues. Second, transcriptomic data from TCGA and GTEx databases were used for the selection of potential diagnostic and prognostic biomarkers using statistical analysis. *EXO1*, *RAD50*, *PPT2*, *LUC7L2*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B*, *GRB7* and *TCEAL4* gene expression were chosen for further validation as diagnostic or prognostic biomarkers in ovarian tumor tissues.

1.1. Study participants and samples

The Study protocol was approved by regional bioethics committee (Nr. 158200-18/5-988-539 Change No. 2). All patients gave written consent to participate in this study. Tumor tissue samples were collected during the period of 2019–2021 at National Cancer Institute Oncogynecology department and Laboratory of Genetic diagnostic. Small tumor tissue samples were allocated for the study during double salpingoovarectomy operations and frozen immediately until nucleic acid extraction.

In all 65 tumor tissues used in the study, of them 42 were type II OC cases (HGSOC), 14 other OC cases, and 9 tissues from benign gynecologic conditions (8 gynecologic cists or benign tumors as well as one case where the ovaries were removed due to inherited *BRCA2* mutation).

1.2. Nucleic acid extraction

Gynecologic tumor tissues were first homogenized using mortar and pestle in liquid nitrogen. ~20 mg of tissue sample was distributed equally for RNA and DNA extraction. RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (TFS), Carlsbad, USA) according to manufacturer‘s instructions. The DNA was extracted using standard phenol-chloroform extraction method following ethanol DNA precipitation. The purity of extracted nucleic acids was analyzed using Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) and kept at –80 °C until further use.

1.3. Mutation analysis

ARID1A, *CTNNB1*, and *FBXW7* gene alterations were analyzed in a cohort of 50 tumor tissues: 32 HGSOC, 9 other OC and 9 benign gynecologic tumor cases. The DNA concentrations were additionally evaluated using Qubit dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) kit and Qubit 3 fluorometer (Life Technologies, Singapore). 10 ng of DNA utilized for the sequencing libraries that were prepared using Ion AmpliSeq Library Kit Plus (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and a custom Ion AmpliSeq Custom DNA Panel (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) following the manufacturer’s instructions. Sequencing libraries quantified using Ion Library TaqMan Quantitation Kit (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania) before loading the Ion 530 sequencing chips using Ion Chef (Ion Torrent, Singapore) system and Ion 520 & Ion 530 Kit (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). The next generation sequencing performed on Ion

S5 (Ion Torrent, Singapore) sequencer, with the coverage of ≥500. Alterations reported on the Ion Reporter Software (version 5.16.0.2). Each change inspected on the Integrative Genomics Viewer (IGV, version 2.6.3). The gene sequence alterations classified as pathogenic when reported as such in the clinical variant ClinVar database.

1.4. Gene expression profiling

Gene expression was analyzed using two step RT–qPCR method. First, 0.5 µg of RNA was treated with DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) at 37 ºC for 30 minutes to remove any genomic DNA, then cDNA synthesized using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) on the ProFlex PCR System (Applied Biosystems, TFS, Singapore) following reagent manufacturer‘s instructions. The qPCR experiments conducted with Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), ROX Solution provided (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) kit and Metabion (Planegg, Germany) primers on the QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, TFS¸ Singapore) following the manufacturer‘s instructions. *GAPDH* used as the reference gene and the gene expression normalized by $\log_2 2^{-\Delta Ct}$ method.

1.5. Gene promoter methylation profiling

ARID1A and HOX family gene *CDX2*, *ALX4* and *HOPX* promoter methylation status were analyzed using MSP method. First, bisulfite modification was applied to DNA using an EZ DNA Methylation kit (Zymo Research, Irvine, California, USA). MSP reactions performed on the ProFlex PCR System using Phusion U Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific, Vilnius, Lietuva) and Metabion primers designed for either methylated or non-methylated promoter sequences. The PCR products visualized in 3 % agarose (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) gels and 1× TAE buffer (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), dyed with ethidium bromide (final concentration 0.6 µg/ml, Carl Roth, Karlsruhe, Germany). For each of the gels 6 µl of PCR product mixed with small amount of TriTrack DNA loading dye (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Electrophoresis performed in the Owl EasyCast B2 mini gel horizontal electrophoresis system (TFS, Waltham, Massachusetts, USA) using Owl EC-105 Electrophoresis Power Supply (TFS, Marietta, Ohio, USA). PCR products analyzed according to GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) when visualized using UVP ChemStudio (Analytic Jena, Jena, Germany) system. For each reaction a mix of five healthy person genomic DNA used as negative methylation

control and CpG Methylated Human Genomic DNA (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) used as positive control.

1.6. TCGA and GTEx data analysis

Transcriptomic data from ovarian tissue samples were obtained form the Cancer Genome Atlas (TCGA-OV) and genotype-tissue expression (GTEx) projects. The TCGA-OV RNA-seq STAR counts data was downloaded using TCGAbiolinks R package (version 2.29.6), while clinical data was downloaded via UCSCXenaTools (version 1.4.8). The GTEx Analysis V8 (dbGaP Accession phs000424.v8.p2) RNA-seq gene read counts downloaded from https://www.gtexportal.org/home/datasets accessed on 2023-08-21. In all, 416 samples from TCGA-OV were downloaded and 180 cases form GTEx data. After joining the datasets, gene expression was available for 56156 genes, from them only the protein coding genes were selected for the analysis (19197 genes) selected via biomaRt (version 2.56.1) package. The gene raw counts normalized via GDCRNATools (version 1.20.1) and voom normalization form limma package (version 3.56.2) leaving 13681 genes suitable for analysis. The full sample cohort was then split into train data (489 samples, of them 153 GTEx and 336 TCGA) and test data (106 samples, of them 27 GTEx and 79 TCGA).

Elastic-net algorithm form glmnet (version 4.1-8) package with $\alpha = 0.5$ used to find gene transcripts that separate GTEx samples from TCGA-OV cases. In all 214 genes were selected. Using only the train data TCGA cohort LASSO-Cox model was applied, using C-index vs log(λ) plot a λ of 0,088 was selected to give 10 best genes for ovarian cancer prognosis, that were further validated in ovarian tissue samples. Scripts describing the process of biomarker selection are available at https://github.com/ieva-vaic/TCGA-OV-RISK-PROJECT.

1.7. Statistical analysis

The statistical analysis performed on R (version 4.3.1, R foundation for statistical computing, Vienna, Austria). Main packages used for visualizing were ComplexHeatmap (version 2.16.0) and ggplot2 (version 3.5.1), pROC (version 1.18.5) for receiver operating curve (ROC) analysis, glmnet (version 4.1-8) for regression analysis. Scripts of the data analysis are available at https://github.com/ieva-vaic/KN-DISSERTATION.

The associations between two independent samples were tested with Mann–Whitney, Student's t or Welch's t tests, as appropriate. Associations between three or more groups were analyzed via ANOVA or Kruskal-Wallis

tests with the post-hoc analysis of either Tuckey HSD or Dunn tests as appropriate. For categorical data Fisher tests used due to small data cohort. Correlation analysis performed using either Spearman or Pearson correlation tests, as appropriate. ROC analysis was used to analyze diagnostic or prognostic ability of biomarkers or their combinations derived from logistic regression analysis in case of diagnostic models and polygenic risk scores created using formula: Risk score = $\sum_i^n gene_i * \beta_i$, where gene is normalized expression of a selected gene, and β denoting coefficients from Cox model. ROC curves compared using DeLong or bootstrap criteria and additional metrics of specificity and sensitivity. In all cases, the results were considered statistically significant when corrected using Benjamini and Hochberg method (Benjaminit & Hochberg, 1995) and p values were ≤ 0.05.

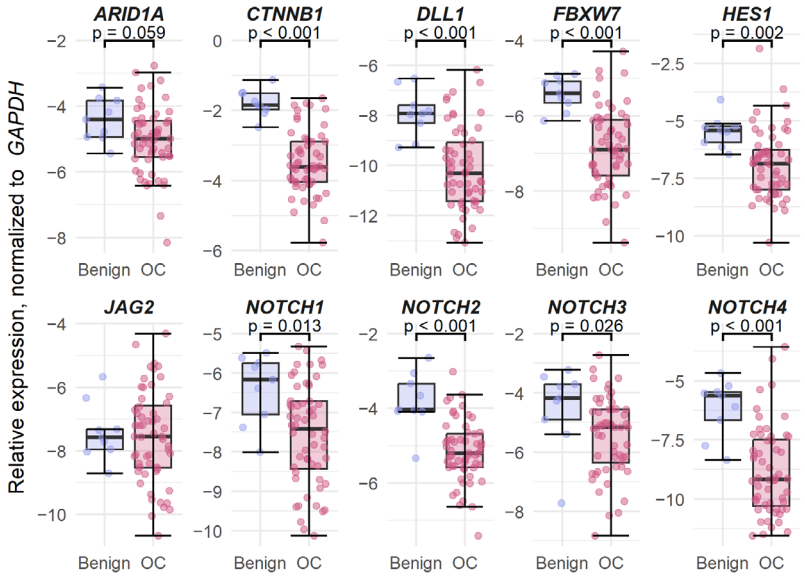
2. RESULTS

2.1. Notch, Wnt, and chromatin remodeling gene expression, mutation and *ARID1A* and HOX gene promoter methylation status analysis in ovarian cancer patient‘s tissues

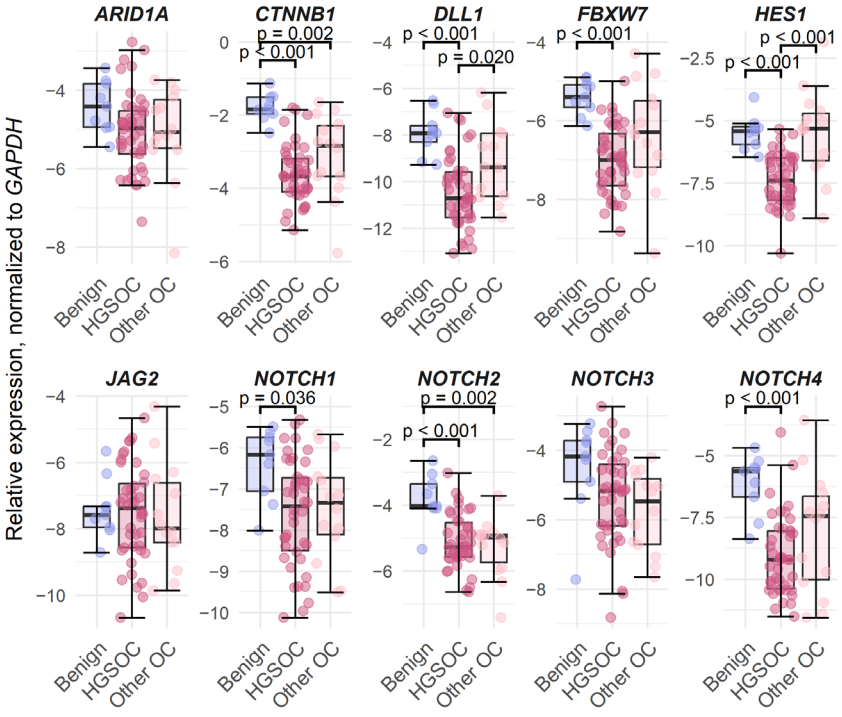
2.1.1 Notch, Wnt, and chromatin remodeling gene expression analysis in ovarian cancer patient‘s tissues

The gene expression of 10 genes, related to Notch and Wnt signaling pathways, as well as chromatin remodeling gene *ARID1A*, was investigated in ovarian tissues using RT-qPCR method. Comparing all OC cases with benign tumor tissues, 8 / 10 gene expression was significantly decreased in OC ($p \leq 0.03$, log normalized fold change (log_2FC) < −0.90) (**Summary fig. 2.1**).

Evaluating differences in gene expression between HGSOC and benign cases significant decrease detected in 7 / 10 genes with *CTNNB1* showing the greatest difference in gene expression when comparing the two groups ($p < 0.001$, $log_2FC = -1.90$). *DLL1* and *HES1* expression showed differences between type II OC (HGSOC) and other OC cases (log_2FC −1.31 and −2.12 respectively, $p \leq 0.02$). In the non-HGSOC OC cases, *NOTCH2* and *CTNNB1* also had decreased expression when compared to benign ovarian tumors (log_2FC −1.30 and −1.12 respectively, $p = 0.002$) (**Summary fig. 2.2**).

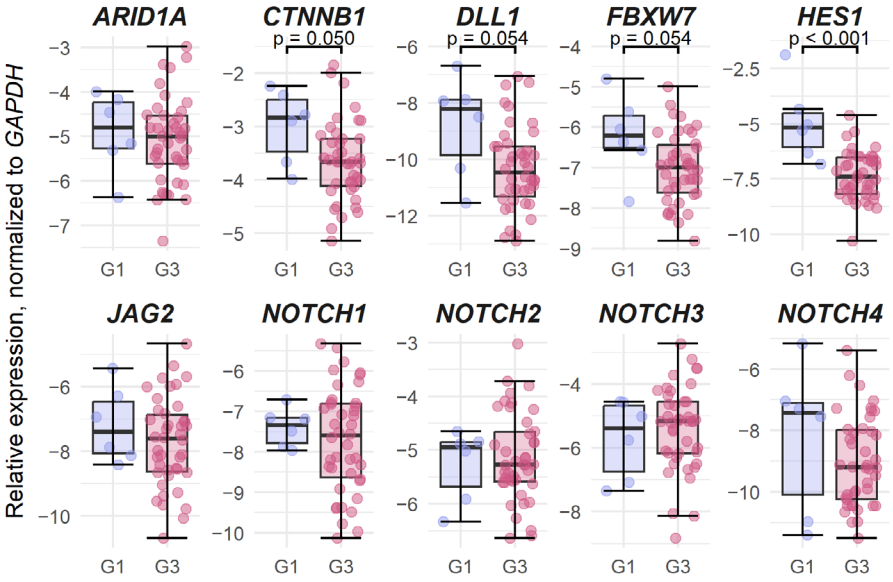


Summary fig. 2.1 Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression in ovarian tumor tissues according to tumor malignancy status

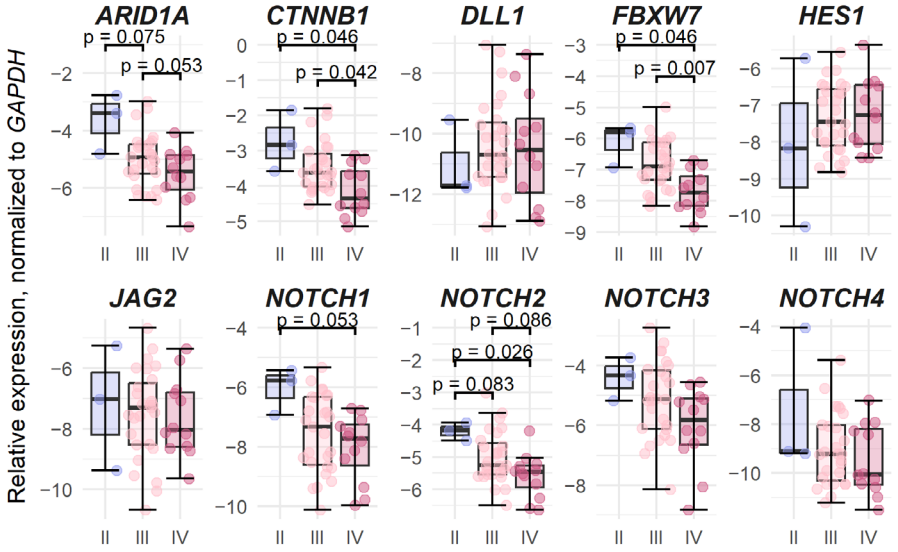


Summary fig. 2.2 Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression in ovarian tumor tissues according to tumor types

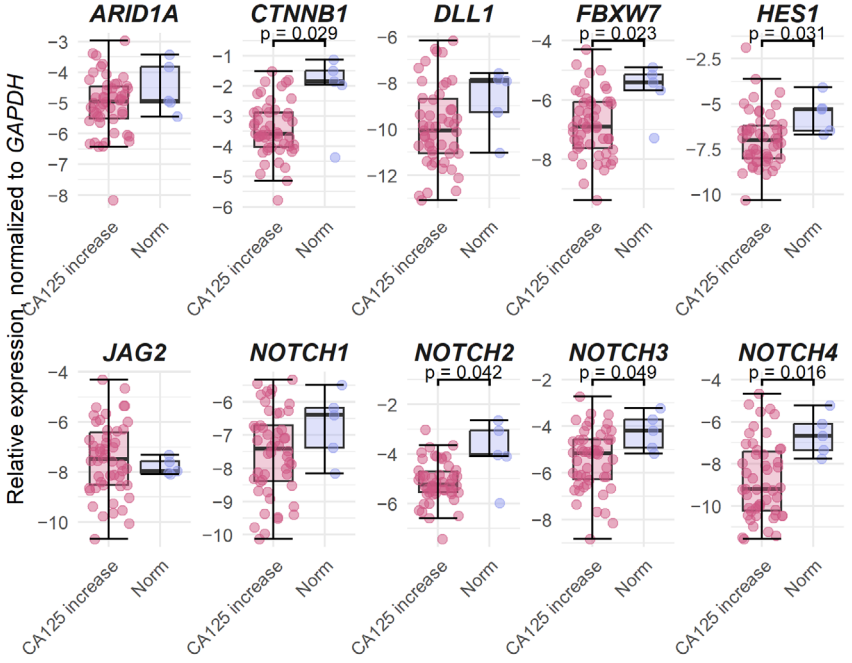
HES1 and *CTNNB1* gene expression was lower in OC cases with higher tumor grade (log_2FC −2.39 and −0.65 respectively, $p \leq 0.05$) (**Summary fig. 2.3**). In HGSOC cases, *CTNNB1* and *FBXW7* expressions were significantly decreased in stage IV cases compared to stage III OC (log_2FC −0.70 and −0.88 respectively, $p \leq 0.04$), while *CTNNB1*, *FBXW7* and *NOTCH2* expression also decreased in stage IV cases when compared to stage II ($log_2FC = -1.38, -1.56$ and −1.38 respectively, $p \leq 0.05$) (**Summary fig. 2.4**). *CTNNB1*, *FBXW7*, *HES1, NOTCH2*, *NOTCH3* and *NOTCH4* expression also significantly ($p < 0.05$) decreased in cases with increased serum CA125 biomarker (≥ 35 U/mL) (**Summary fig. 2.5**).



Summary fig. 2.3 Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression in ovarian cancer tissues according to tumor grade



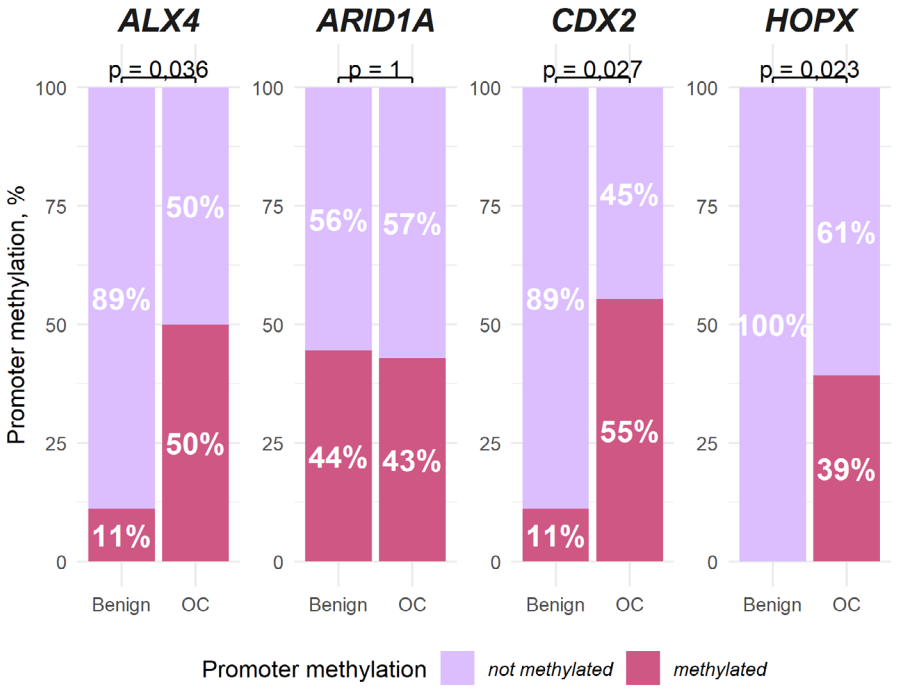
Summary fig. 2.4 Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression in high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) tissues according to stage



Summary fig. 2.5 Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression in ovarian cancer tissues according to CA125 status. CA125 increase = CA125 > 35 U/mL

2.1.2. *ARID1A* and HOX gene promoter methylation status analysis in ovarian cancer patient's tissues

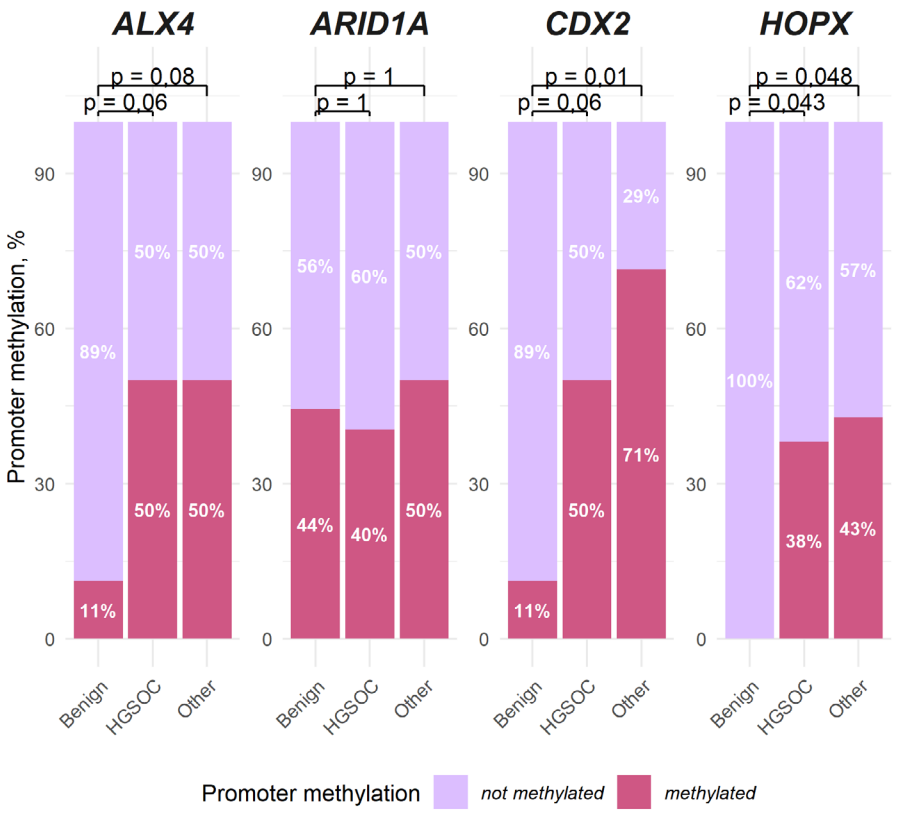
ARID1A and HOX gene *CDX2*, *ALX4* and *HOPX* promoter methylation was assessed in ovarian tumor tissues using MSP method. HOX gene promoter methylation showed significant differences ($p < 0.40$) between OC cases and benign gynecologic tumors (**Summary fig. 2.6**). In OC cases 100% increase in methylation was found for *HOPX* promoter, 39% for *ALX4* and 44% for *CDX2* when compared to benign cases. In the case of *HOPX* none of the nine benign cases showed methylation while 39% (22 / 56) OC cases had methylation. For both *ALX4* and *CDX2*, promoter methylation was found only in one case each, while in OC cases promoter methylation detected in 50% (28 / 56) and 55% (31 / 56) cases respectively. In the case of *ARID1A* promoter methylation, only 1.58% increase in methylation was found in benign cases compared OC, as 44% (4 / 9) benign gynecologic tumor and 43% (24 / 56) OC cases showed *ARID1A* promoter methylation.



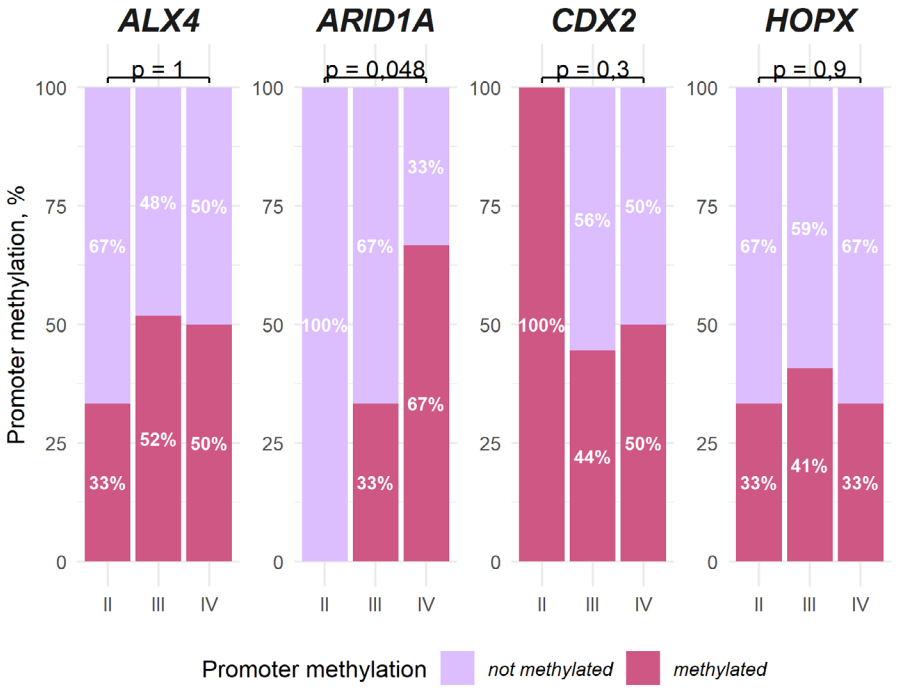
Summary fig. 2.6 HOX family and *ARID1A* gene promoter methylation status in ovarian tumor tissues according to tumor malignancy status

Significant increases in gene promoter methylation were found in *HOPX* promoter methylation when comparing HGSOC and benign tumor cases ($p = 0.04$) with 38.10% (16 / 42) HGSOC cases positive for promoter methylation. *HOPX* and *CDX2* gene promoter regions also showed significant methylation when comparing other OC cases with benign tumor cases ($p \leq 0.05$), *CDX2* showed 71.43% (10 / 14) and *HOPX* 42.86% (6 / 14) methylation in other OC cases (**Summary fig. 2.7**).

ARID1A promoter methylation in HGSOC cases were associated to tumor stage with no methylation detected in any of stage II cases, 33.33% (9 / 27) methylated in stage III cases, and 66.67% (8 / 12) methylated in stage IV cases ($p < 0.05$) (**Summary fig. 2.8**).



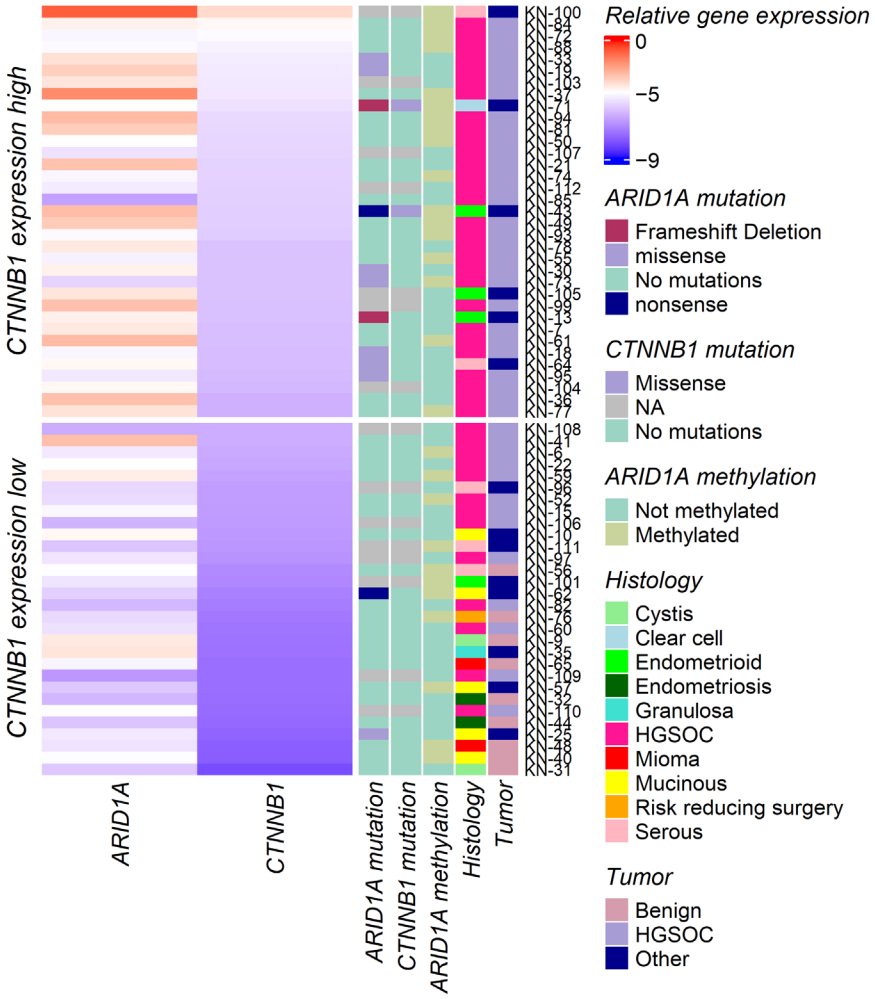
Summary fig. 2.7 HOX family and *ARID1A* gene promoter methylation status in ovarian cancer tissues according to tumor type



Summary fig. 2.8 HOX family and *ARID1A* gene promoter methylation status in HGSOC tissues according to stage

2.1.3. Gene mutation and *ARID1A* expression and gene promoter methylation status analysis in ovarian cancer patient's tissues

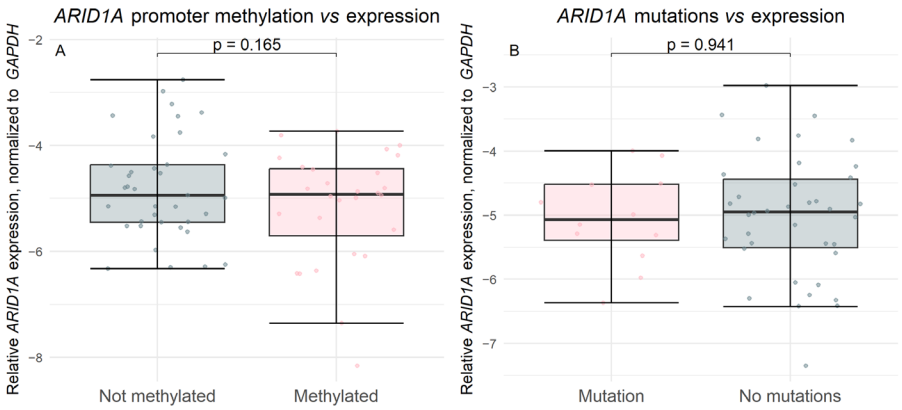
ARID1A, *FBXW7* and *CTNNB1* genes were also analyzed using next-generation sequencing in a cohort of 50 cases of gynecologic tumors. No alterations detected in *FBXW7* gene. One *CTNNB1* mutation found in a clear-cell OC case, a c.110C>G alteration, and another mutation in endometrioid OC case, a c.101G>A alteration. Both alterations located in *CTNNB1* third exon which codes of β–catenin N–terminal phosphorylation sites, thus mutations in these regions may disrupt degradation of β–catenin. In both cases with *CTNNB1* mutations, the *CTNNB1* gene expression was above the median expression (**Summary fig. 2.9**).



Summary fig. 2.9 Heatmap of *CTNNB1* and *ARID1A* gene expression and *ARID1A* gene mutation and promoter methylation status in ovarian cancer tissues

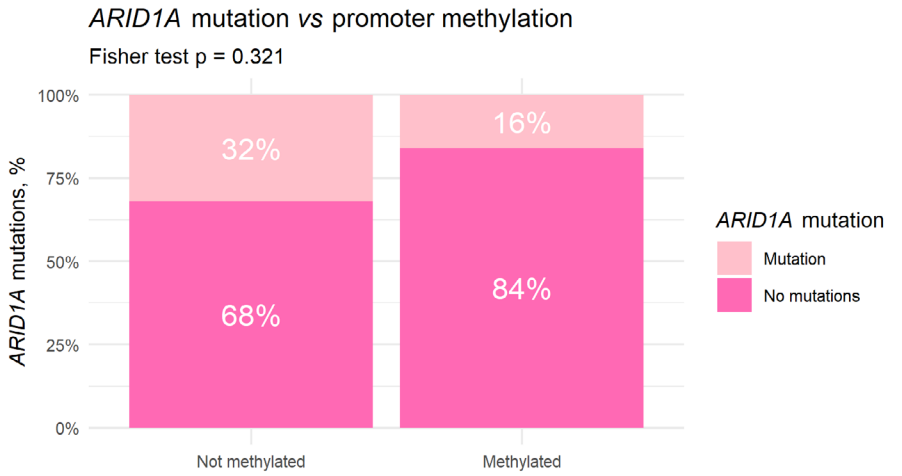
Although no *ARID1A* mutations listed in ClinVar mutation database as pathogenic were found in ovarian tissues, 10 alterations, regarded as variants of uncertain significance were found. 19% (6 / 32) of HGSOC cases and 67% (6 / 9) other OC cases had *ARID1A* alterations, with no alterations detected in benign gynecologic tumor tissues. Two of the detected *ARID1A* alterations were frameshift deletions, two nonsense alterations, while the rest were missense alterations. Although no significant association between either *ARID1A* alteration status or promoter methylation status and *ARID1A* gene expression was found, in both cases, *ARID1A* expression was slightly

decreased ($log_2FC = -0.36$ for gene sequence alterations, and $log_2FC = -0.02$ for promoter methylation) (**Summary fig. 2.10**).



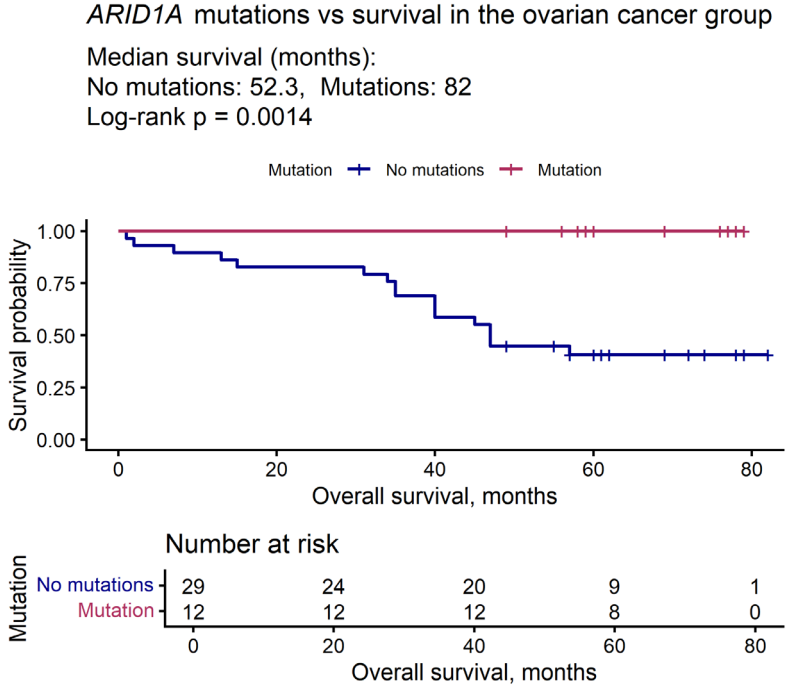
Summary fig. 2.10 **A** *ARID1A* gene expression according to promoter methylation status; **B** or mutation status

More *ARID1A* alterations were found in cases without positive promoter methylation (32%) when compared to cases with positive promoter methylation status (16%) although this difference was not statistically significant (**Summary fig. 2.11**).



Summary fig. 2.11 *ARID1A* promoter methylation status according to mutation status in ovarian tissues

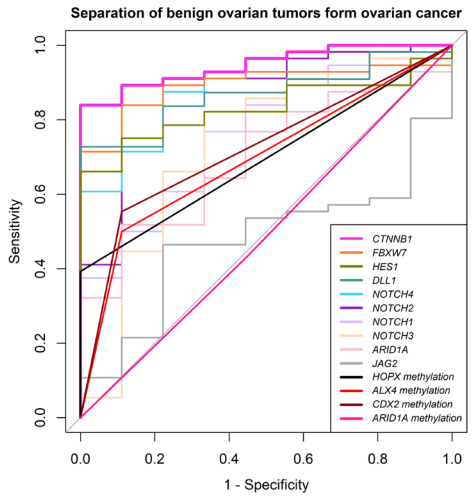
In the cases with *ARID1A* alterations median survival was 2.5 years (60 months) longer than in OC group with no *ARID1A* alterations (p = 0.001) (**Summary fig. 2.12**).



Summary fig. 2.12 Overall survival in ovarian cancer patients according to *ARID1A* mutation status

2.1.4 Analysis of Notch, Wnt, and chromatin remodeling gene expression and *ARID1A* and HOX gene promoter methylation status diagnostic potential

Analyzing diagnostic potential of the biomarkers selected via hypothesis-driven approach, the gene mutation biomarkers were not included in the analysis due to the small mutation count. *CTTNB1* expression showed the highest AUC compared to other gene expression or promoter methylation biomarkers in separating all OC cases form benign cases (AUC = 0.95, sensitivity = 0.84, specificity = 1) (**Summary fig. 2.13**),



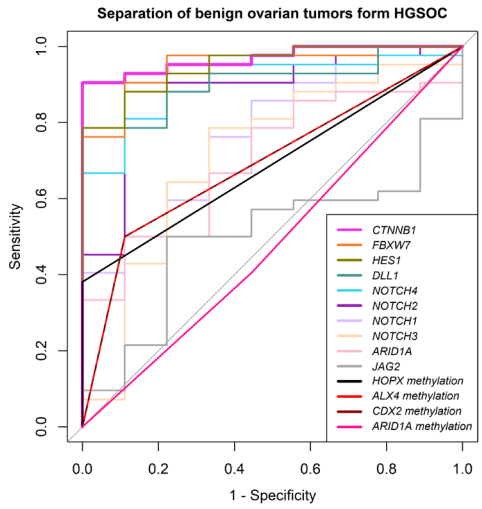
ROC metrics

Separation of benign ovarian tumors form ovarian cancer

Predictor	AUC	threshold	accuracy	sensitivity	specificity
NOTCH1	0.946	−2.560	0.862	0.839	1.000
NOTCH2	0.893	−5.943	0.846	0.839	0.889
NOTCH3	0.885	−4.110	0.892	0.893	0.889
NOTCH4	0.869	−6.846	0.862	0.875	0.778
ARID1A	0.869	−9.321	0.766	0.727	1.000
CTNNB1	0.831	−6.464	0.708	0.661	1.000
FBXW7	0.762	−6.550	0.754	0.768	0.667
JAG2	0.734	−4.295	0.800	0.821	0.667
DLL1	0.721	0.500	0.600	0.554	0.889
HES1	0.698	−4.975	0.569	0.518	0.889
HOPX methylation	0.696	0.500	0.477	0.393	1.000
ALX4 methylation	0.694	0.500	0.554	0.500	0.889
CDX2 methylation	0.492	0.500	0.446	0.429	0.556
ARID1A methylation	0.478	−7.308	0.508	0.464	0.778

Summary fig. 2.13 ROC curve analysis of Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression as well as HOX family gene and *ARID1A* promoter methylation status in separation of benign ovarian tumors form ovarian cancer.

Separating HGSOC from benign cases best result was achieved also by *CTNNB1* (AUC = 0.97, sensitivity = 0.91, specificity = 1) (**Summary fig. 2.14**). In all, 6 / 10 gene expression biomarkers showed significantly ($p < 0.03$) greater ability to separate HGSOC from benign tumors when compared to promoter methylation biomarkers (best AUC was reached by *ALX4* and *CDX2*, both AUC = 0.69, sensitivity = 0.50, specificity 0.89) (**Summary fig. 2.14**). When separating HGSOC from non-HGSOC OC cases, *HES1* expression showed the greatest prognostic ability with AUC = 0.83, sensitivity = 0.88, specificity = 0.71 (**Summary fig. 2.15**).

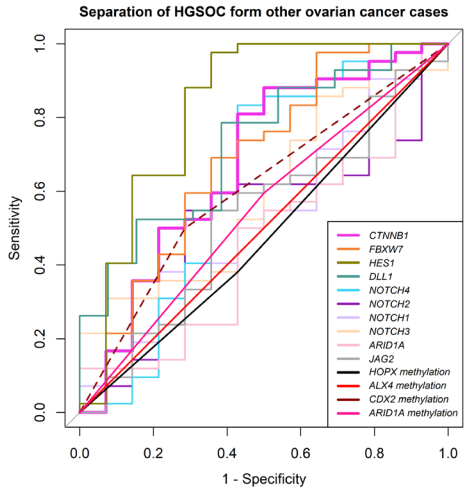


ROC metrics

Separation of benign ovarian tumors form HGSOC

Predictor	AUC	threshold	accuracy	sensitivity	specificity
CTNNB1	0.968	−2.560	0.922	0.905	1.000
FBXW7	0.950	−5.943	0.902	0.905	0.889
HES1	0.950	−6.464	0.824	0.786	1.000
DLL1	0.907	−9.403	0.824	0.786	1.000
NOTCH4	0.907	−6.846	0.902	0.929	0.778
NOTCH2	0.884	−4.110	0.882	0.881	0.889
NOTCH1	0.765	−6.552	0.745	0.762	0.667
NOTCH3	0.714	−4.295	0.765	0.786	0.667
ARID1A	0.701	−4.976	0.569	0.500	0.889
ALX4	0.694	0.500	0.569	0.500	0.889
CDX2	0.694	0.500	0.569	0.500	0.889
HOPX	0.690	0.500	0.490	0.381	1.000
JAG2	0.500	−7.308	0.549	0.500	0.778
ARID1A methylation	0.480	0.500	0.431	0.405	0.556

Summary fig. 2.14 ROC curve analysis of Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression as well as HOX family gene and *ARID1A* promoter methylation status in separation of benign ovarian tumors form HGSOC



ROC metrics

Separation of HGSOC form other ovarian cancer cases

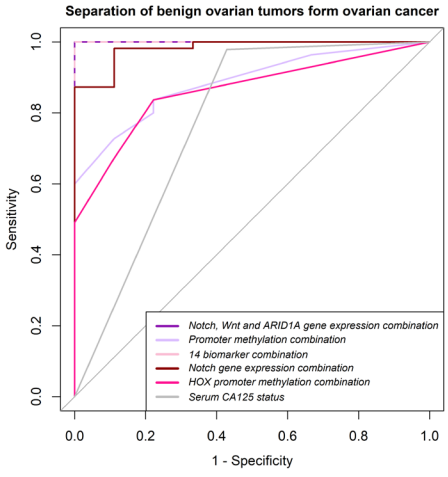
Predictor	AUC	threshold	accuracy	sensitivity	specificity
HES1	0.827	−6.330	0.839	0.881	0.714
DLL1	0.727	−9.476	0.745	0.786	0.615
NOTCH3	0.714	−4.558	0.464	0.310	0.929
FBXW7	0.684	−6.595	0.679	0.690	0.643
CTNNB1	0.675	−2.950	0.750	0.810	0.571
NOTCH4	0.622	−7.550	0.768	0.833	0.571
CDX2	0.607	0.500	0.554	0.500	0.714
ARID1A methylation	0.548	0.500	0.571	0.595	0.500
JAG2	0.529	−7.551	0.571	0.548	0.643
NOTCH1	0.526	−8.169	0.482	0.381	0.786
NOTCH2	0.500	−5.239	0.589	0.548	0.714
ALX4	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
HOPX	0.476	0.500	0.429	0.381	0.571
ARID1A	0.466	−4.963	0.518	0.500	0.571

Summary fig. 2.15 ROC curve analysis of Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression as well as HOX family gene and *ARID1A* promoter methylation status in separation of HSGOC form other ovarian cancer cases

2.1.4 Analysis of Notch, Wnt, and chromatin remodeling gene expression and *ARID1A* and HOX gene promoter methylation status combination diagnostic potential

In all, five combinations of biomarkers were tested: 1) all 14 biomarker combination (mixed biomarker combination); 2) 10 gene expression combination; 3) 4 gene promoter methylation combination; 4) 7 Notch gene expression combination; 5) 3 HOX related gene promoter methylation combination.

Both 10 gene expression combination and 14 mixed biomarker combination fully separated OC from benign cases (AUC = 1) (**Summary fig. 2.16**), while in separating HGSOC form benign cases 3 combinations: mixed biomarker model, 10 gene expression biomarker model and Notch pathway gene biomarker model all achieved the same performance (AUC = 1) (**Summary fig. 2.17**). None of these combinations reached perfect separation (AUC = 1) of HGSOC and other OC cases, however, 10 gene expression biomarker model reached AUC of 0.94, and the addition of promoter methylation biomarkers increased AUC by 0.02 area units to 0.96 (**Summary fig. 2.18**).

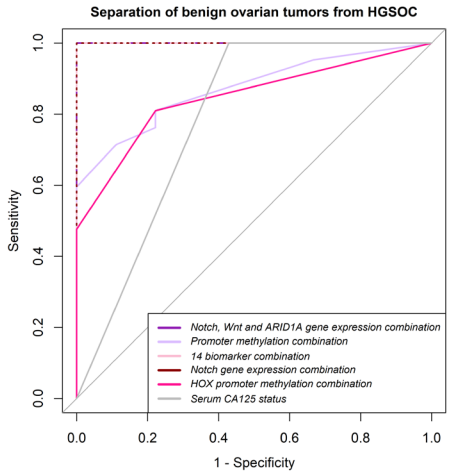


ROC metrics

Separation of benign ovarian tumors form ovarian cancer

Predictor	AUC	threshold	accuracy	sensitivity	specificity
Notch, Wnt and ARID1A gene expression combination	1.000	0.471	1.000	1.000	1.000
Promoter methylation combination	0.886	0.731	0.828	0.836	0.778
14 biomarker combination	1.000	0.453	1.000	1.000	1.000
Notch gene expression combination	0.982	0.497	0.969	0.982	0.889
HOX promoter methylation combination	0.863	0.732	0.828	0.836	0.778
Serum CA125 status	0.775	0.500	0.926	0.979	0.571

Summary fig. 2.16 ROC curve analysis biomarker combinations in separation of benign ovarian tumors form ovarian cancer tissues. Gene expression biomarker combination (all 10 genes), and mixed biomarker combination (all 14 biomarkers) curves overlap. *NOTCH* gene expression biomarker combination includes 7 genes (*NOTCH1-4*, *HES1*, *DLL1*, *JAG2*), *HOX* gene promoter methylation biomarker combination includes 3 genes (*HOPX*, *ALX4*, *CDX2*), serum CA125 status threshold considered 35 U/mL

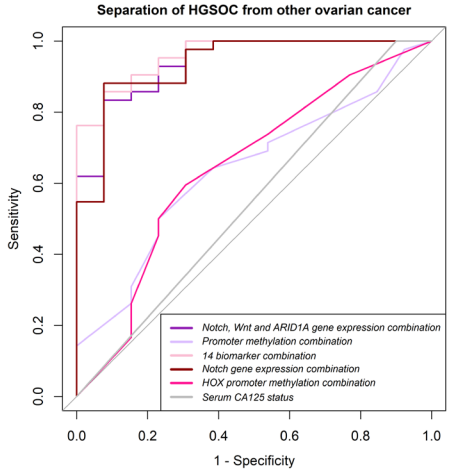


ROC metrics

Separation of benign ovarian tumors from HGSOC

Predictor	AUC	threshold	accuracy	sensitivity	specificity
Notch, Wnt and ARID1A gene expression combination	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000
Promoter methylation combination	0.872	0.872	0.745	0.714	0.889
14 biomarker combination	1.000	0.470	1.000	1.000	1.000
Notch gene expression combination	1.000	0.478	1.000	1.000	1.000
HOX promoter methylation combination	0.847	0.706	0.804	0.810	0.778
Serum CA125 status	0.786	0.500	0.932	1.000	0.571

Summary fig. 2.17 ROC curve analysis of Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression as well as HOX family gene and *ARID1A* promoter methylation status combinations in separation of benign ovarian tumors form HGSOC



ROC metrics

Separation of HGSOC from other ovarian cancer

Predictor	AUC	threshold	accuracy	sensitivity	specificity
Notch, Wnt and ARID1A gene expression combination	0.940	0.720	0.855	0.833	0.923
Promoter methylation combination	0.639	0.783	0.564	0.500	0.769
14 biomarker combination	0.960	0.697	0.873	0.857	0.923
Notch gene expression combination	0.936	0.763	0.891	0.881	0.923
HOX promoter methylation combination	0.646	0.686	0.618	0.595	0.692
Serum CA125 status	0.550	0.500	0.809	1.000	0.100

Summary fig. 2.18 ROC curve analysis of Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression as well as HOX family gene and *ARID1A* promoter methylation status combinations in separation HGSOC form other ovarian cancer tissues

All gene expression biomarker models showed greater AUC values than clinical CA125 biomarker ($p < 0.04$), while single biomarker ROC curves were not significantly higher than CA125. Although in separating OC cases from benign tumors, *CTNNB1* and *NOTCH2* ROC curves did not significantly differ from 10 gene expression combination ROC curve ($p = 0.051$ and

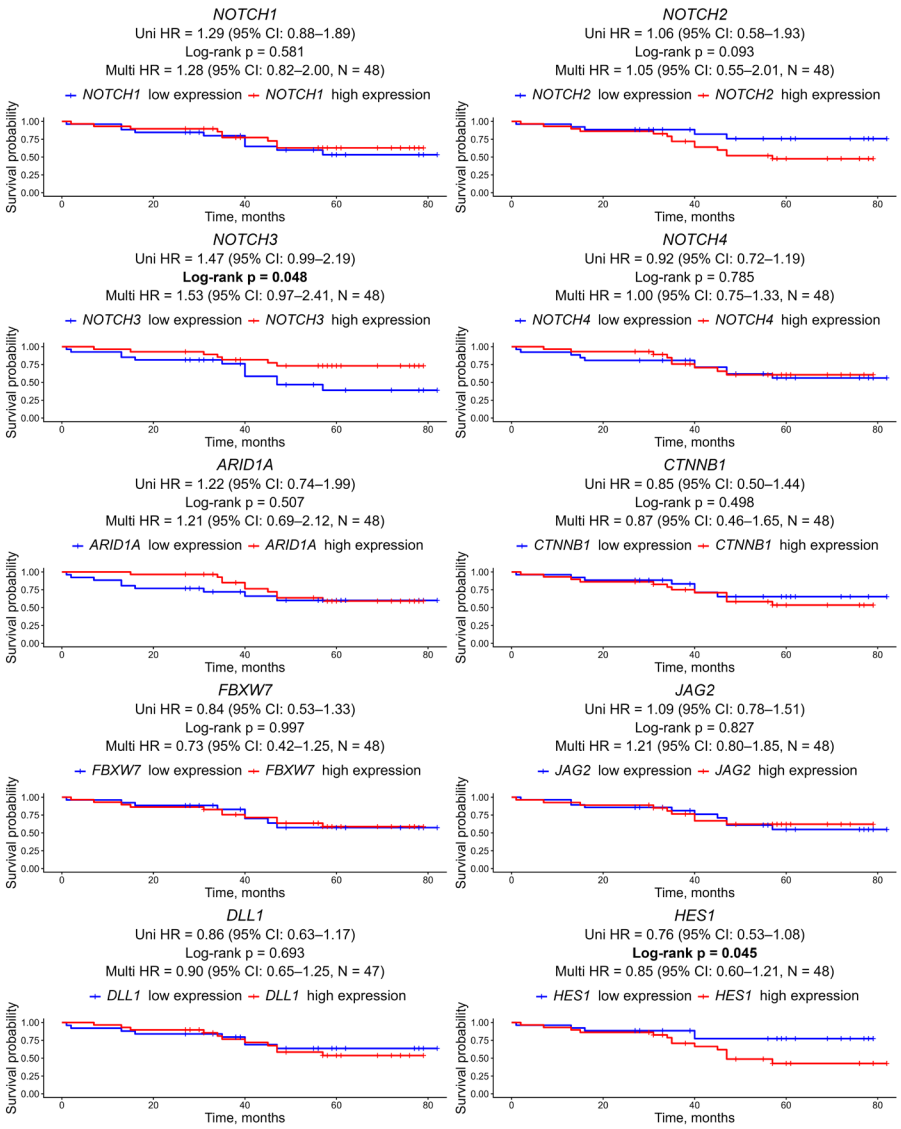
p = 0.07 respectively), other 12 biomarkers showed significantly smaller AUCs than 10 gene expression combination ($p < 0.01$). Similarly, in separating HGSOC from benign cases *CTNNB1*, *FBXW7* and *HES1* showed no significant difference in AUC when compared to 10 gene expression model ($p > 0.05$), while in separating HGSOC from other OC cases only *HES1* showed similar prognostic ability as 10 gene expression combination ($p > 0.05$).

2.1.5 Analysis of Notch, Wnt, and chromatin remodeling gene expression and *ARID1A* and HOX gene promoter methylation status combination prognostic potential

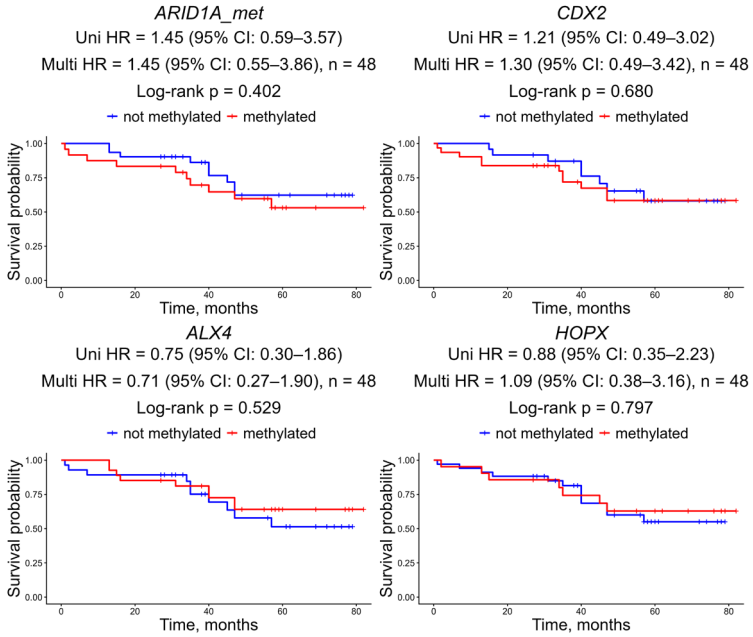
NOTCH3 and *HES1* expression, when separated into high and low expression groups according to median gene expression, showed significant association with overall survival in OC patients (p = 0.048 and 0.045 respectively). *NOTCH3* low expression showed association with increased risk of death (HR = 1.47, PI: 0.99–2.19) (**Summary fig. 2.19**), while *HES1* low expression showed association with lower risk (HR = 0.76, 95% CI: 0.53–1.08). Methylation biomarkers did not show association with survival (**Summary fig. 2.20**).

Three biomarker combinations were tested for their associations with survival: 10 gene expression biomarker combination; all 14 gene expression and promoter methylation biomarker combination; *HES1* and *NOTCH3* gene expression biomarker combination. All three combinations were significantly associated with overall survival ($p \leq 0.04$), the strongest association found in the 14 biomarker combination (HR = 0.22, 96 % CI: 0.06–0.77, p = 0.003) (**Summary fig. 2.21**).

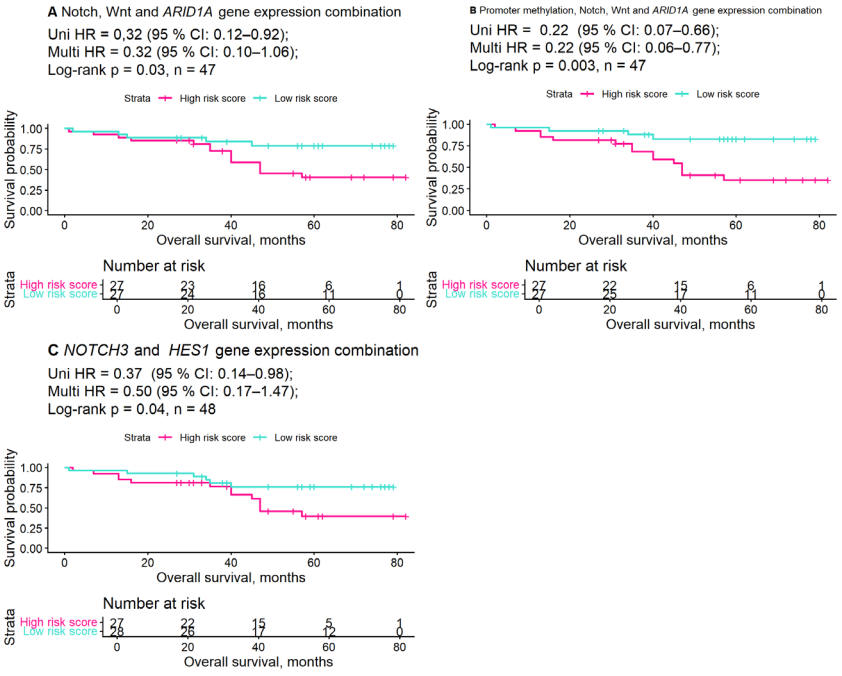
When assessing how biomarkers and their combinations predict 5-year survival, all three combinations outperformed single biomarkers. Best single biomarker predictor was *NOTCH3* (AUC = 0.65), while the best risk model was 14 biomarker combination (AUC = 0.77). However, the ROC curve of 14 biomarker combination did not significantly differ from *ARID1A* promoter methylation status and *NOTCH1* and *NOTCH3* gene expression biomarker ROC curves, as well as three biomarker combinations did not significantly differ in AUC ($p > 0.05$), thus these biomarkers and their combinations showed similar prognostic potential (**Summary fig. 2.22**).



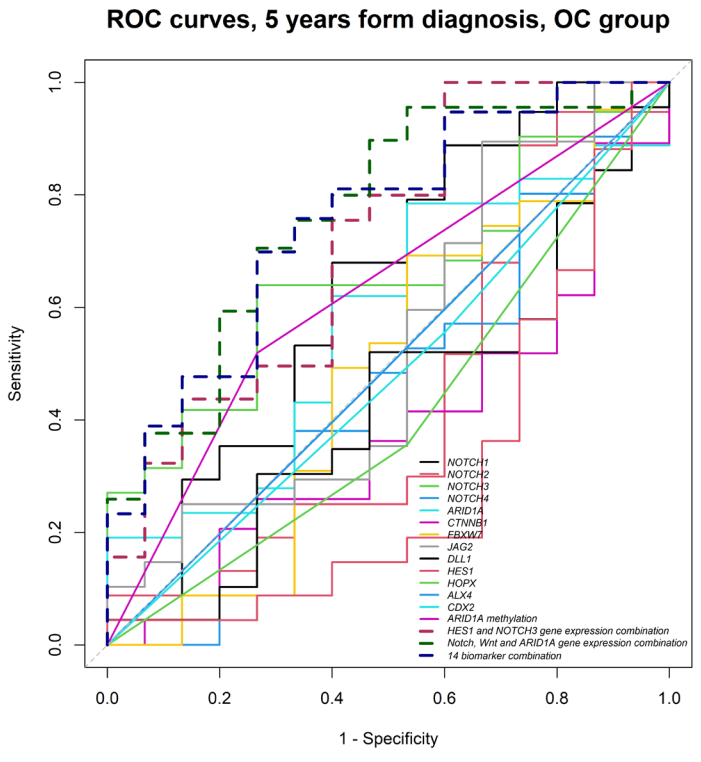
Summary fig. 2.19 Kaplan-Meier plots of overall survival of Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression in ovarian cancer tissues



Summary fig. 2.20 Overall survival of HOX family and *ARID1A* promoter methylation in ovarian cancer tissue



Summary fig. 2.21 Kaplan-Meier plots of overall survival according to Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression and HOX family and *ARID1A* promoter methylation combinations in ovarian cancer tissues



ROC metrics

Prognostic citeria, 5 years from diagnosis

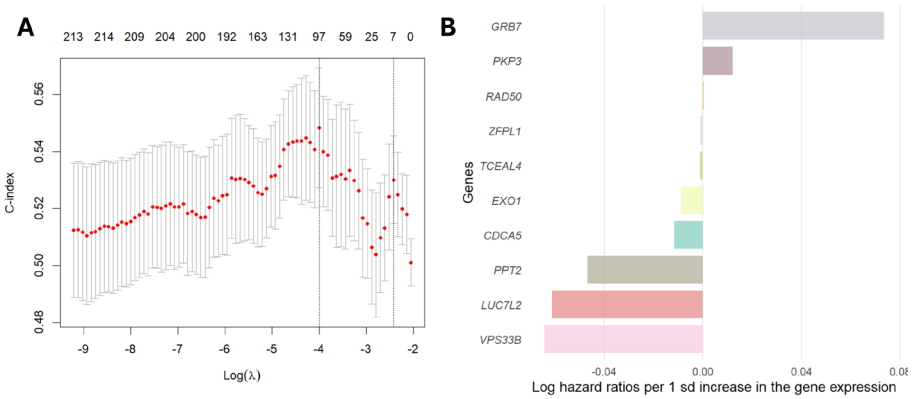
Predictor	Time_months	AUC	Sensitivity	Specificity
NOTCH1	60	0.630	0.888	0.400
NOTCH2	60	0.437	0.888	0.267
NOTCH3	60	0.653	0.639	0.733
NOTCH4	60	0.440	0.802	0.267
ARID1A	60	0.573	0.785	0.467
CTNNB1	60	0.380	0.892	0.133
FBXW7	60	0.484	0.692	0.467
JAG2	60	0.529	0.895	0.333
DLL1	60	0.429	0.521	0.533
HES1	60	0.301	1.000	0.067
HOPX	60	0.411	0.000	1.000
ALX4	60	0.498	0.000	1.000
CDX2	60	0.478	0.000	1.000
ARID1A methylation	60	0.626	0.519	0.733
Notch, Wnt and ARID1A gene expression combination	60	0.713	1.000	0.400
14 biomarker combination	60	0.766	0.705	0.733
HES1 and NOTCH3 gene expression combination	60	0.754	0.699	0.733

Summary fig. 2.22 Time dependent ROC curves of Notch and Wnt pathway component and *ARID1A* gene expression and HOX family and *ARID1A* promoter methylation combinations in ovarian cancer tissues in predicting 5-year overall survival

2.2. Investigation of 10 gene expression biomarkers using statistical and experimental approaches

2.2.1 Selection of gene expression biomarkers using statistical approach

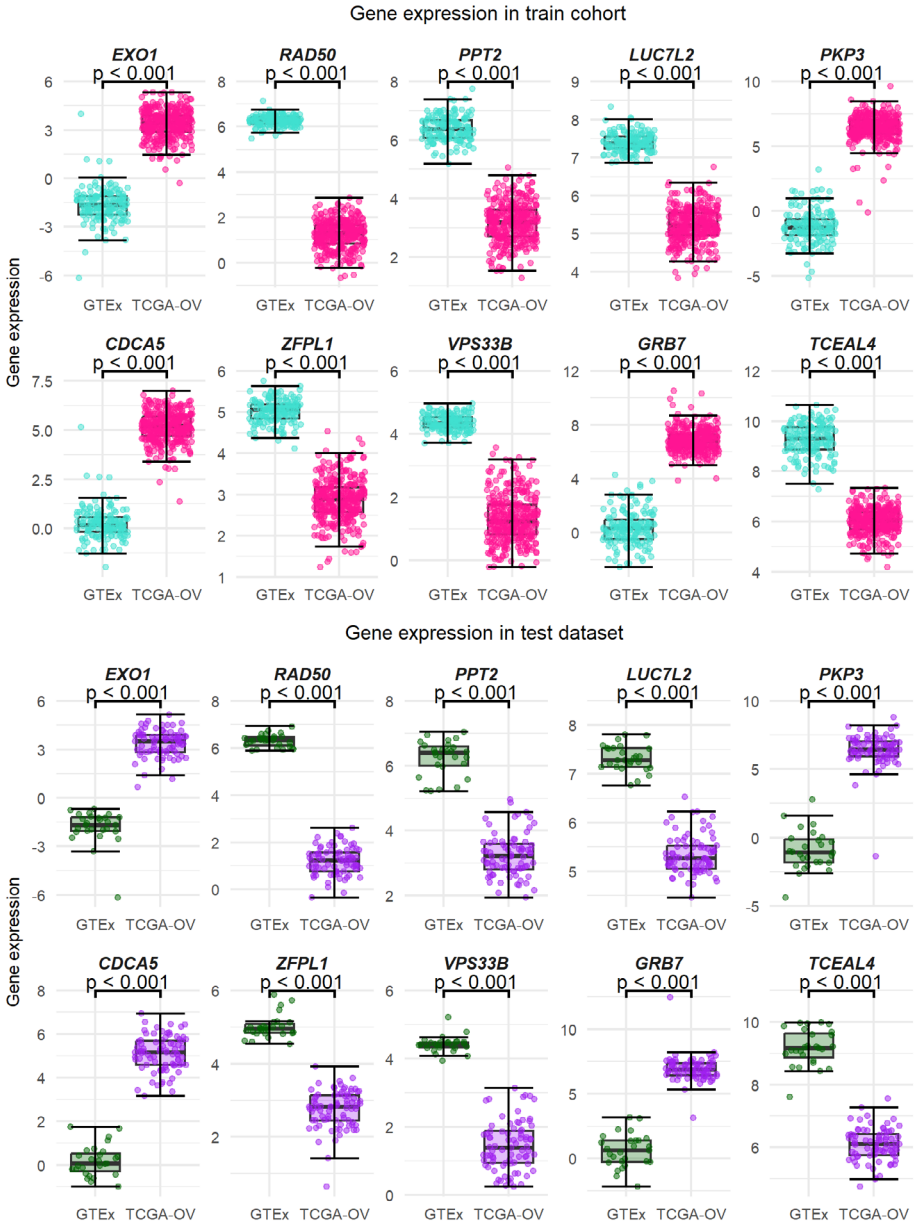
Ovarian tissue transcriptomic data from TCGA and GTEx databases were used for the selection of genes that could have diagnostic and prognostic potential. Using Elastic Net algorithm in the train cohort of 153 GTEx normal ovarian tissues and 336 TCGA-OV ovarian cancer tissues, 214 genes were selected for their diagnostic ability to separate OC cases from normal tissues. Then, LASSO-cox regression algorithm was applied to the TCGA-OV train cohort to select genes with prognostic potential. Using a cross–validation plot (**Summary fig. 2.23A**) strict lambda coefficient was selected to get a 10 gene panel comprised of *EXO1*, *RAD50*, *PPT2*, *LUC7L2*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B*, *GRB7* and *TCEAL4*.



Summary fig. 2.23 Cross-validation plot from the LASSO-Cox regression. Y-axis shows the accuracy of the classification as mean +/- SE, given different values of the penalty parameter (lambda). Two optimal values of lambda are marked with dashed lines (**A**); Coefficient estimates for the 10 selected genes in Cox model (i.e. log hazard ratios per 1 SD increase in the gene expression) (**B**)

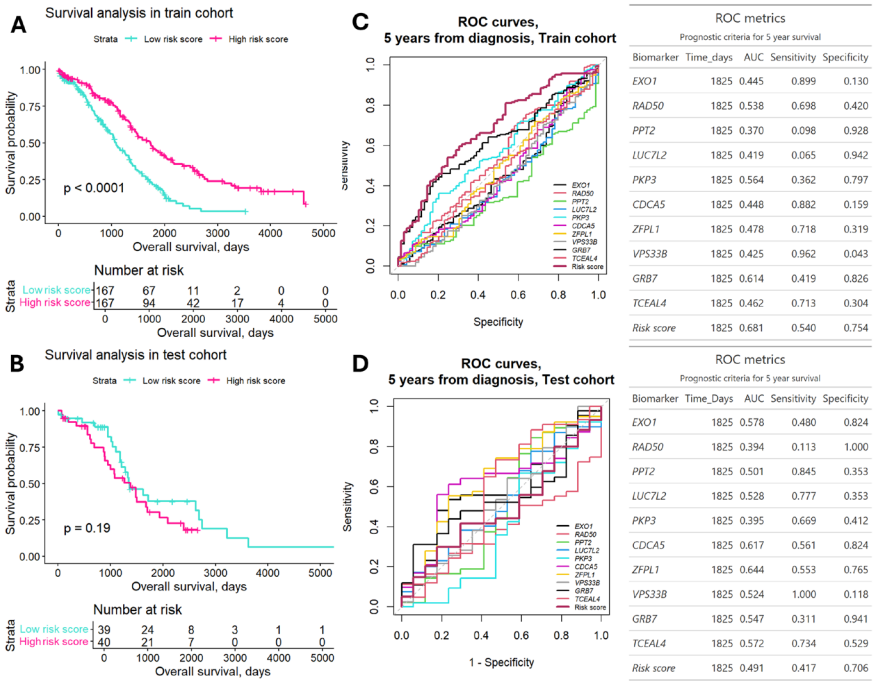
In both train and test (27 GTEx and 78 TCGA-OV samples) cohorts all 10 genes showed statistically significant differences in expression when comparing OC cases with normal ovarian tumors ($p < 0.001$). The greatest increase in expression in OC compared to normal ovarian tissues was found in *PKP3* expression (train cohort $\log_2FC = 7.63$, test cohort $\log_2FC = 7.33$),

while greatest downregulation found in *RAD50* (train cohort $log_2FC = -5.03$, test cohort $log_2FC = -5.11$) expression (**Summary fig. 2.24**).



Summary fig. 2.24 Expression of the 10 selected genes in GTEx and TCGA-OV train cohorts (**A**); Expression of the 10 selected genes in GTEx and TCGA-OV test cohorts (**B**)

Although combination of the 10 gene expression in the train cohort showed great association with overall survival ($p < 0.0001$), same result was not found in the smaller test cohort. The 5-year overall survival prognosis of the 10 gene combination did reach AUC of 0.68 which outperformed the best single prognostic biomarker *GRB7* AUC of 0.61. However, in the test cohort the 10 gene combination did not outperform the single biomarkers, and the best prediction of the 5-year survival was reached by *ZFPL1* gene expression (AUC = 0.64) (**Summary fig. 2.25**).



ROC metrics
Prognostic criteria for 5 year survival

Biomarker	Time_days	AUC	Sensitivity	Specificity
EXO1	1825	0.445	0.899	0.130
RAD50	1825	0.538	0.698	0.420
PPT2	1825	0.370	0.098	0.928
LUC7L2	1825	0.419	0.065	0.942
PKP3	1825	0.564	0.362	0.797
CDCA5	1825	0.448	0.882	0.159
ZFPL1	1825	0.478	0.718	0.319
VPS33B	1825	0.425	0.962	0.043
GRB7	1825	0.614	0.419	0.826
TCEAL4	1825	0.462	0.713	0.304
Risk score	1825	0.681	0.540	0.754

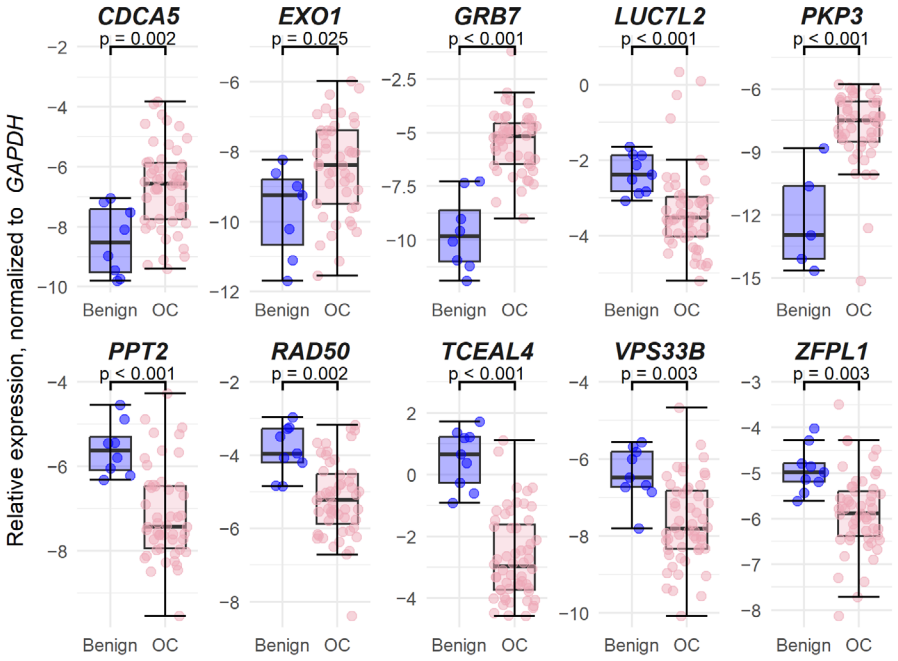
ROC metrics
Prognostic criteria for 5 year survival

Biomarker	Time_Days	AUC	Sensitivity	Specificity
EXO1	1825	0.578	0.480	0.824
RAD50	1825	0.394	0.113	1.000
PPT2	1825	0.501	0.845	0.353
LUC7L2	1825	0.528	0.777	0.353
PKP3	1825	0.395	0.669	0.412
CDCA5	1825	0.617	0.561	0.824
ZFPL1	1825	0.644	0.553	0.765
VPS33B	1825	0.524	1.000	0.118
GRB7	1825	0.547	0.311	0.941
TCEAL4	1825	0.572	0.734	0.529
Risk score	1825	0.491	0.417	0.706

Summary fig. 2.25 Kaplan-Meier plots of overall survival according to 10 selected gene risk score in GTEx and TCGA-OV train cohorts (**A**), Time dependent ROC curves of overall survival according to 10 selected gene risk score in GTEx and TCGA-OV train cohorts (**B**), Kaplan-Meier plots of overall survival according to 10 selected gene risk score in GTEx and TCGA-OV test cohorts (**C**), Time dependent ROC curves of overall survival according to 10 selected gene risk score in GTEx and TCGA-OV test cohorts (**D**)

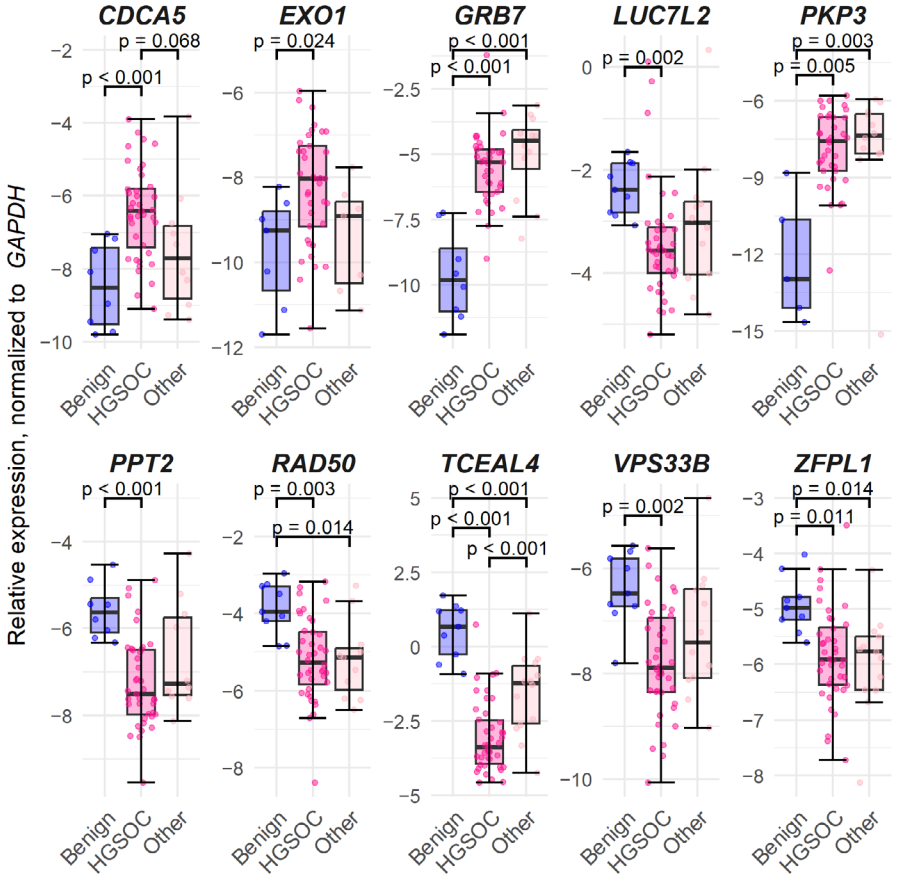
2.2.2 Expression analysis of statistically selected 10-gene biomarker panel in an ovarian cancer tissue cohort

10 gene expression biomarkers selected via statistical analysis were then investigated in the external ovarian tumor tissue cohort. All 10 gene expression biomarkers showed significant differences in expression when comparing OC with the benign gynecologic tumor samples ($p \leq 0{,}03$), with the greatest difference detected in *TCEAL4* gene expression ($p < 0{,}001$, $\log_2FC = -4.14$) (**Summary fig. 2.26)**.



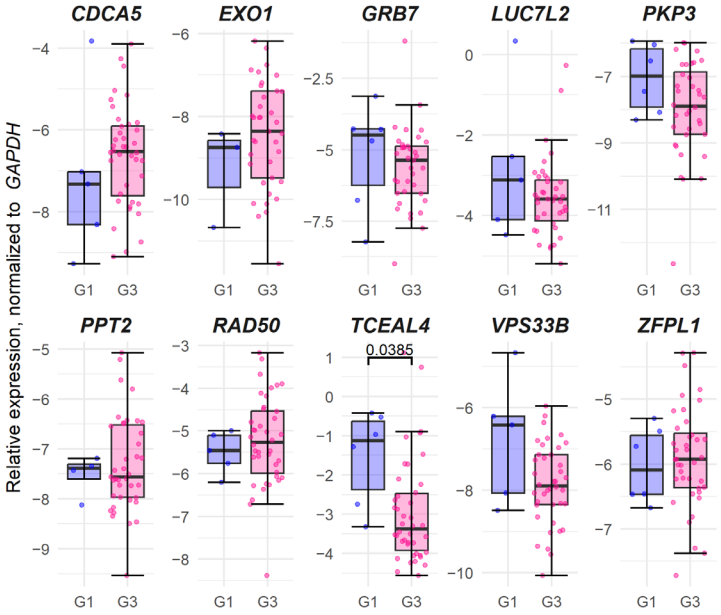
Summary fig. 2.26 Expression of the 10 genes selected using statistical analysis in ovarian tumor tissues to tumor malignancy status

The dysregulation of gene expression in OC tissues reflected changes found in test and train cohorts as well. All 10 gene expressions were significantly deregulated in HGSOC vs benign tissues. *TCEAL4* expression also showed the greatest difference between HGSOC and benign cases ($p < 0.001$, $\log_2FC = -4.24$). Comparing other OC to benign cases *GRB7*, *PKP3*, *RAD50*, and *ZFPL1*, and *TCEAL4* were significantly deregulated ($p < 0.02$). When comparing HGSOC gene expression with the gene expression in other OC cases, significant differences were found in *TCEAL4* gene expression ($p < 0.001$) (**Summary fig. 2.27**).

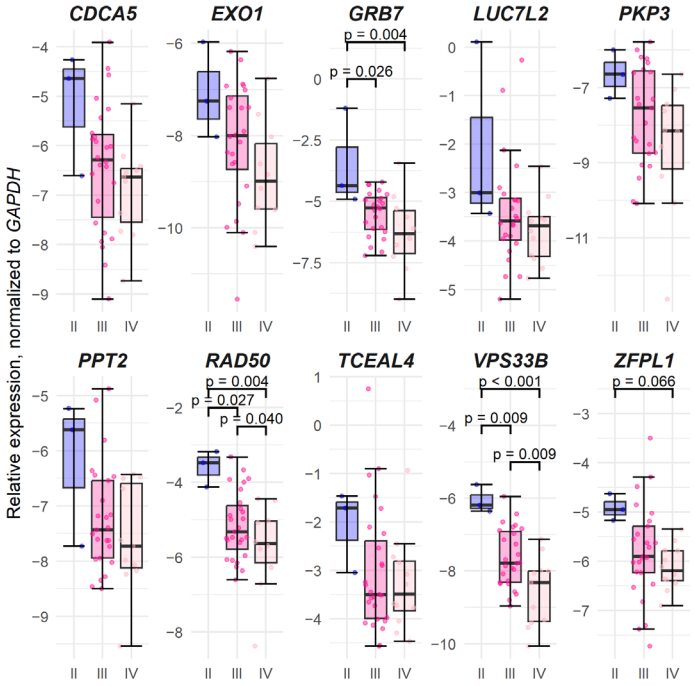


Summary fig. 2.27 Expression of the 10 genes selected using statistical analysis in ovarian tumor tissues according to tumor types

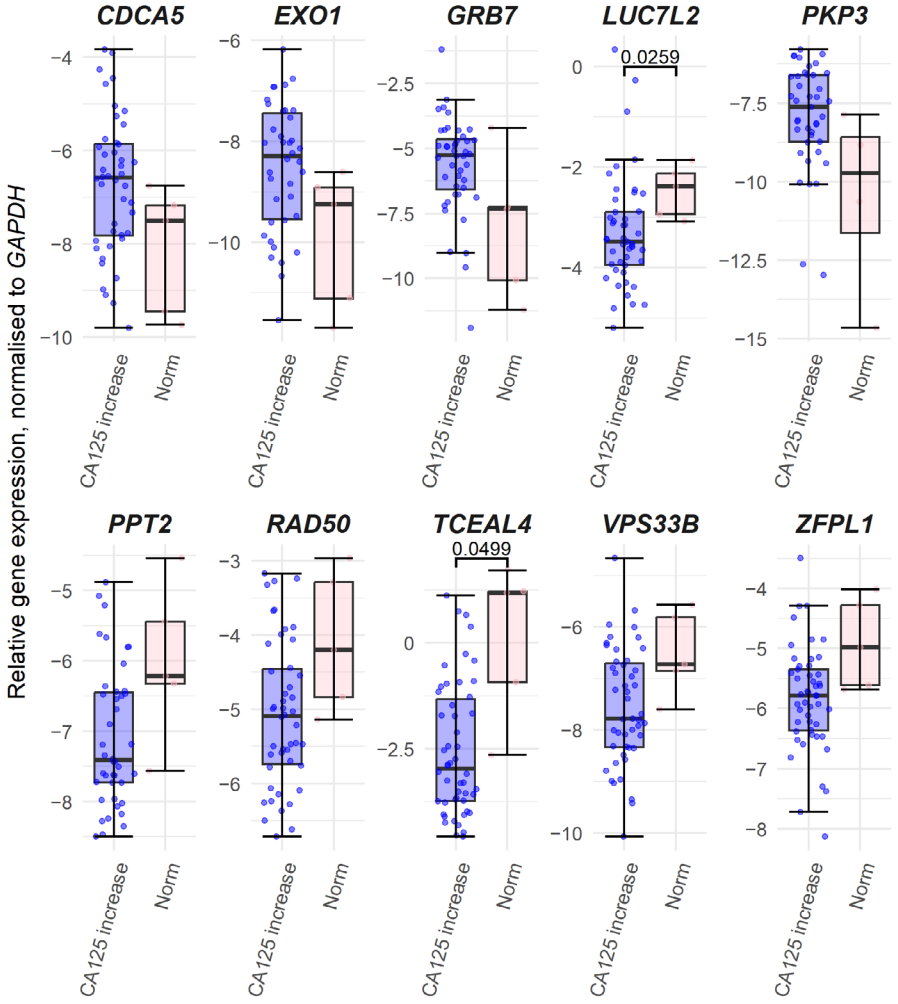
TCEAL4 expression was significantly altered between grade 3 and grade 1 tumors (p = 0.04, $log_2FC = -1.42$) (**Summary fig. 2.28**). In the sub–cohort of HGSOC samples *RAD50*, *VPS22B*, and *GRB7* showed gene expression association with tumor stage ($p \leq 0.04$) (**Summary fig. 2.29**). *LUC7L2* and *TCEAL4* expression were significantly decreased in cases of increased CA125 serum concentration compared to cases with normal CA125 levels (*LUC7L2* p = 0.03, $log_2FC = -1.08$, *TCEAL4* p = 0.05, $log_2FC = -3.36$) (**Summary fig. 2.30**). Negative correlation between *LUC7L2* and patient age at diagnosis was also noted (p = 0.05, R = −0,26) (**Summary fig. 2.31**).



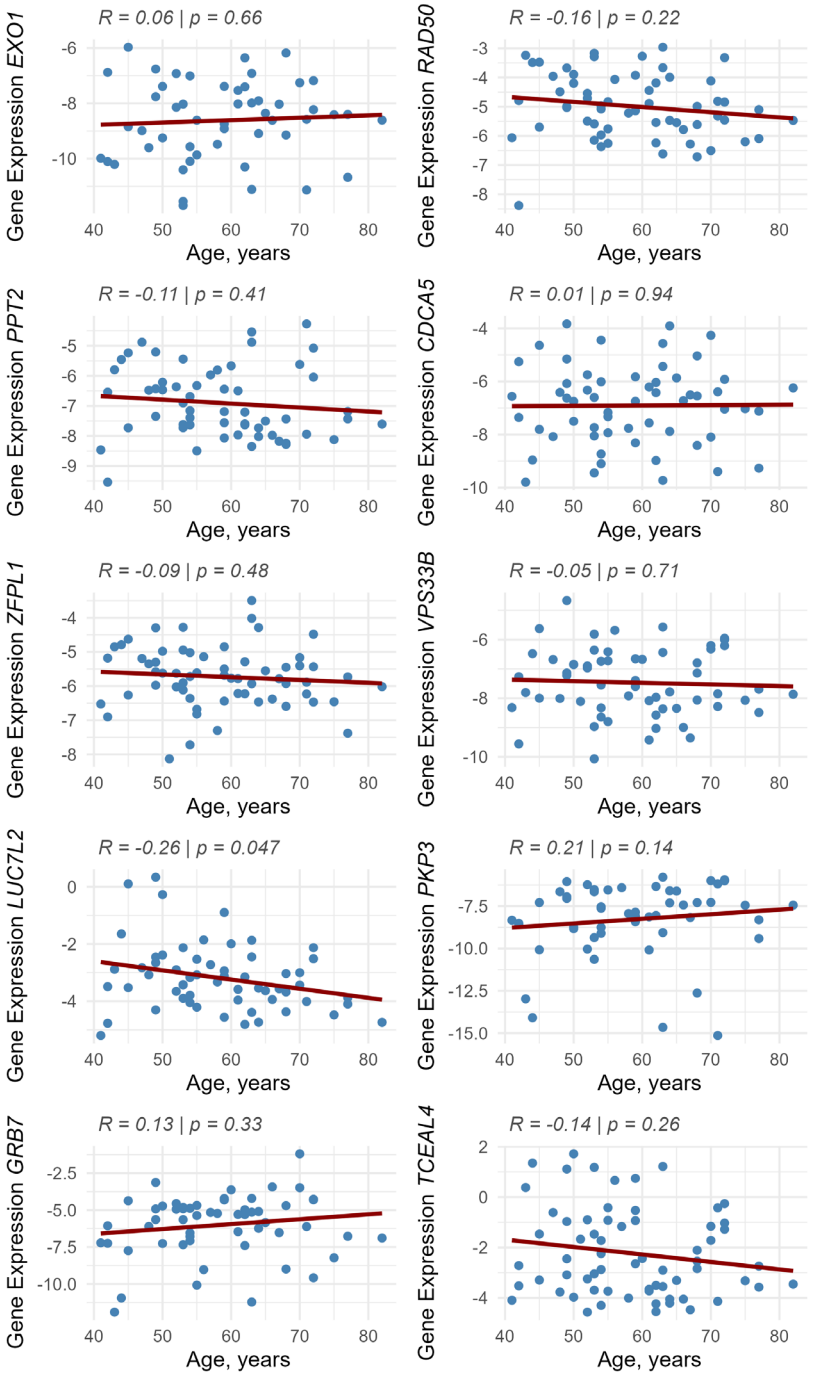
Summary fig. 2.28 Expression of the 10 genes selected using statistical analysis in ovarian tumor tissues according to tumor grade



Summary fig. 2.29 Expression of the 10 genes selected using statistical analysis in HGSOC tissues according to stage



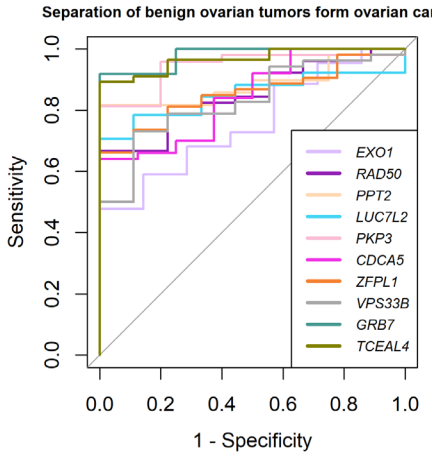
Summary fig. 2.30 Expression of the 10 genes selected using statistical analysis in ovarian tumor tissues according to CA125 status



Summary fig. 2.31 Expression of the 10 genes selected using statistical analysis in ovarian tumor tissues according to age at diagnosis

2.2.3 Analysis of the statistically selected 10-gene biomarker panel diagnostic potential

Analyzing the diagnostic potential of separate gene expression biomarkers, when separating OC from benign tumor cases, *GRB7* showed the greatest AUC of 0.98 with specificity of 0.92, and sensitivity of 1 (**Summary fig. 2.32**).



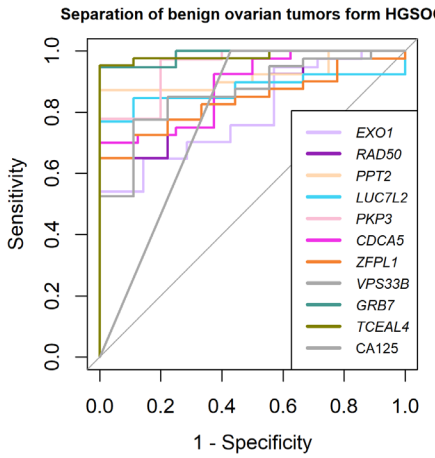
ROC metrics

Separation of benign ovarian tumors form ovarian cancer

Predictor	AUC	threshold	accuracy	sensitivity	specificity
GRB7	0.980	−7.253	0.930	0.918	1.000
TCEAL4	0.966	−0.927	0.908	0.893	1.000
PKP3	0.942	−8.791	0.830	0.812	1.000
PPT2	0.883	−6.344	0.842	0.816	1.000
ZFPL1	0.853	−5.617	0.710	0.660	1.000
RAD50	0.850	−4.866	0.717	0.667	1.000
LUC7L2	0.850	−3.078	0.750	0.706	1.000
CDCA5	0.845	−7.036	0.690	0.640	1.000
VPS33B	0.831	−6.875	0.754	0.731	0.889
EXO1	0.760	−8.186	0.549	0.477	1.000

Summary fig. 2.32 ROC curve analysis the 10 genes selected using statistical analysis in separation of benign ovarian tumors form ovarian cancer

In separating HGSOC group from benign tumor cases *GRB7* showed the best AUC of 0.99, sensitivity = 0.95 and specificity of 1, however *TCEAL4* also showed similar results with AUC of 0.98, sensitivity = 0.95 and specificity of 1 (**Summary fig. 2.33**). *TCEAL4* also was the best performer when separating HGSOC from other OC cases (AUC = 0.80, sensitivity = 0.69, specificity = 0.86) (**Summary fig. 2.34**).

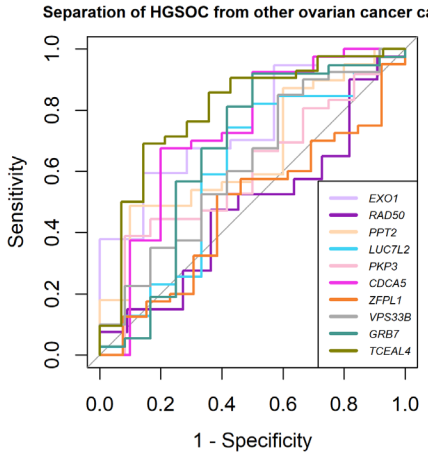


ROC metrics

Sepratation of benign ovarian tumors form HGSOC

Predictor	AUC	threshold	accuracy	sensitivity	specificity
GRB7	0.986	−7.253	0.956	0.946	1.000
TCEAL4	0.984	−0.927	0.961	0.952	1.000
PKP3	0.950	−8.791	0.805	0.778	1.000
PPT2	0.920	−6.344	0.894	0.872	1.000
CDCA5	0.884	−6.898	0.750	0.700	1.000
LUC7L2	0.875	−3.078	0.812	0.769	1.000
VPS33B	0.864	−6.875	0.796	0.775	0.889
RAD50	0.847	−4.866	0.714	0.650	1.000
ZFPL1	0.839	−5.617	0.714	0.650	1.000
EXO1	0.795	−8.186	0.614	0.541	1.000

Summary fig. 2.33 ROC curve analysis the 10 genes selected using statistical analysis in separation of benign ovarian tumors form HGSOC



ROC metrics

Separation of HGSOC from other ovarian cancer cases

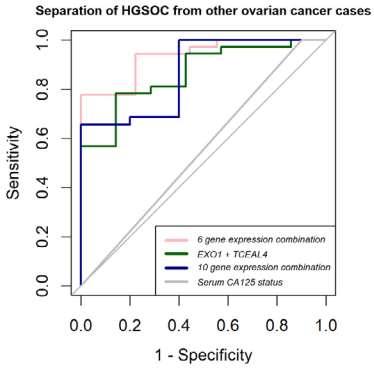
Predictor	AUC	threshold	accuracy	sensitivity	specificity
TCEAL4	0.799	−2.791	0.732	0.690	0.857
EXO1	0.749	−8.407	0.636	0.595	0.857
CDCA5	0.730	−6.737	0.700	0.675	0.800
GRB7	0.662	−4.297	0.816	0.919	0.500
PPT2	0.656	−7.602	0.571	0.487	0.900
VPS33B	0.621	−6.706	0.750	0.850	0.417
LUC7L2	0.605	−3.135	0.706	0.744	0.583
PKP3	0.597	−8.318	0.521	0.389	0.917
RAD50	0.480	−5.464	0.510	0.475	0.636
ZFPL1	0.479	−5.894	0.547	0.525	0.615

Summary fig. 2.34 ROC curve analysis the 10 genes selected using statistical analysis in separation of HGSOC from other ovarian cancer cases

2.2.4 Analysis of the 10 gene expression biomarker combination diagnostic potential

All possible biomarker combinations were tested to determine which combinations had the greatest diagnostic performance. A combination of the two best single biomarkers *TCEAL4* and *GRB7* reached AUC of 1 when separating HGSOC from benign tumor cases, same result was obtained with 8 out of 45 possible gene pair combinations, 6 of them included *GRB7*. Similar results were found when analyzing biomarker combination ability to separate

OC from benign cases with 7 combinations reaching AUC of 1. None of the single biomarkers or their combinations perfectly separated HGSOC form other OC cases, with the best combination of *RAD50*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B* and *TCEAL4* reaching AUC of 0.94, sensitivity = 0.78, specificity = 1, this combination outperformed all other combinations, including 10 gene expression combination (**Summary fig. 2.35**), thus adding more biomarkers does not necessarily increase prognostic ability.



ROC metrics

Separation of HGSOC from other ovarian cancer cases

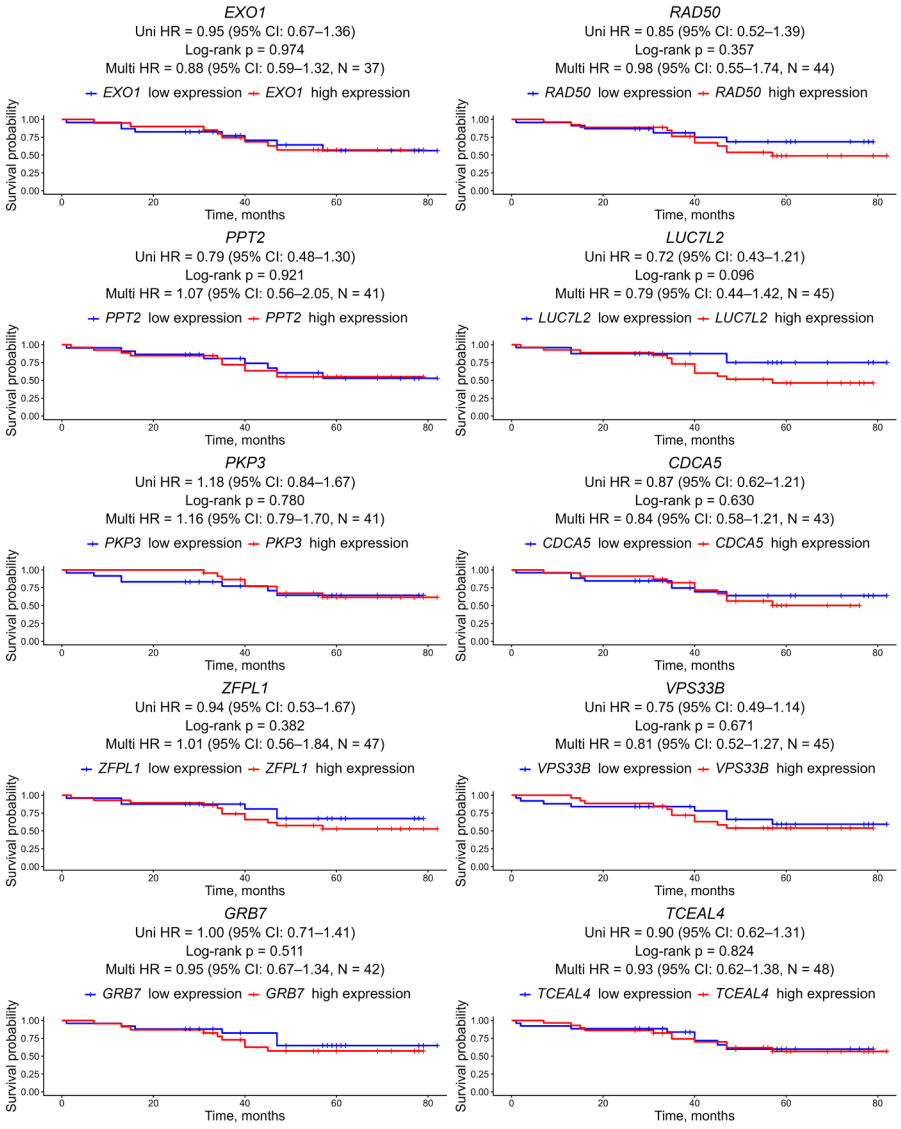
Predictor	AUC	threshold	accuracy	sensitivity	specificity
6 gene expression combination	0.935	0.808	0.822	0.778	1.000
EXO1 + TCEAL4	0.865	0.831	0.795	0.784	0.857
10 gene expression combination	0.869	0.820	0.703	0.656	1.000
Serum CA125 status	0.550	0.500	0.809	1.000	0.100

Summary fig. 2.35 ROC curve analysis the combinations of the 10 genes selected using statistical analysis in separation of HGSOC from other ovarian cancer cases. 6 gene expression combination: *RAD50*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B* and *TCEAL4*, 10 gene expression combination: *EXO1*, *RAD50*, *PPT2*, *LUC7L2*, *PKP3*, *CDCA5*, *ZFPL1*, *VPS33B*, *GRB7*, *TCEAL4*

When comparing all 24 biomarkers together, *GRB7* showed the highest diagnostic ability when separating all OC cases form benign tumors, however *CTNNB1* showed only 0.03 points smaller AUC value. Similarly, when separating HGSOC tumors form benign, *GRB7* showed best AUC of 0.99, outperforming *CTNNB1* only by 0.02 points. Overall, all biomarkers selected by statistical methods reached AUC of 0.80, when only 6 / 14 biomarkers reached the same AUC when comparing separation of HGSOC form benign tumor cases. When comparing the ability to separate HGSOC form other OC cases, *HES1* showed the highest AUC, 0.03 higher than *TCEAL4*. Thus, both biomarkers selected using hypothesis-driven and data-driven approaches have the potential to be suitable for OC diagnostics and prognostics.

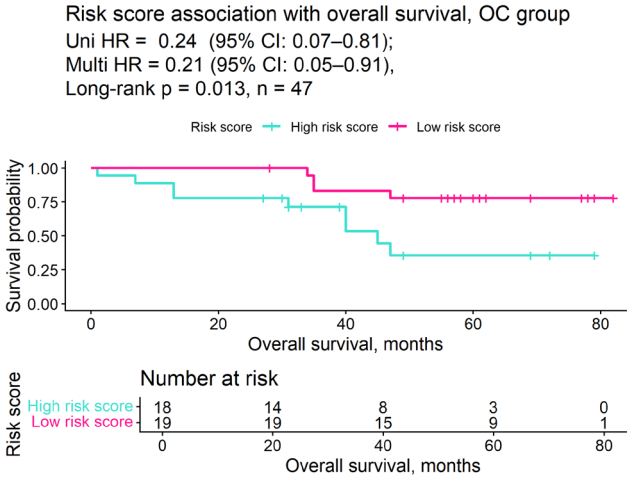
2.2.5 Analysis of the 10 gene expression biomarker combination prognostic potential

None of the 10 gene expressions showed statistically significant association with overall survival. Each gene low expression was associated with improved survival, except for *PKP3* (HR < 1, while *PKP3* PR = 1.18, 95 % PI: 0.79–1.70) (**Summary fig. 2.36**).

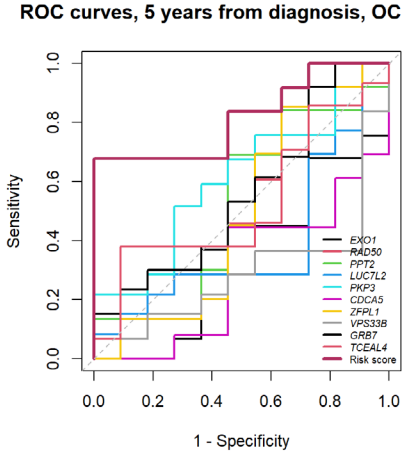


Summary fig. 2.36 Kaplan-Meier plots of overall of the 10 gene selected using statistical analysis expression in ovarian cancer tissues

The combination of all 10 gene expression biomarkers showed significant association with increased survival (PR = 0.24, 95 % CI: 0.07–0.81, p = 0.01 (**Summary fig. 2.37**). The combination of the 10 gene expression was also able to predict 5−year survival with AUC 0.82, while best single biomarker predictor was *GRB7* expression, reaching AUC of 0.56 (**Summary fig. 2.38**).



Summary fig. 2.37 Kaplan-Meier plots of overall survival according to 10 gene selected using statistical analysis expression combination in ovarian cancer tissues



ROC metrics

Prognostic criteria, 5 years from diagnosis

Biomarker	Time_months	AUC	Sensitivity	Specificity
EXO1	60	0.354	0.369	0.636
RAD50	60	0.497	0.218	0.909
PPT2	60	0.515	0.690	0.545
LUC7L2	60	0.395	1.000	0.091
PKP3	60	0.616	0.516	0.727
CDCA5	60	0.295	0.000	1.000
ZFPL1	60	0.495	0.853	0.364
VPS33B	60	0.295	0.068	1.000
GRB7	60	0.556	0.920	0.273
TCEAL4	60	0.527	0.381	0.909
Risk score	60	0.816	0.677	1.000

Summary fig. 2.38 Time dependent ROC curves of the 10 genes selected using statistical analysis expression in ovarian cancer tissues in predicting 5-year overall survival

Thus, although single biomarkers did not show association with survival, the combination of the 10 gene expression biomarkers showed association with survival in both external cohort as well as training cohort. Moreover, the 10 gene expression combination, selected via data-drive approach outperformed the 14 gene expression and promoter methylation biomarker combination selected via hypothesis-driven approach, with 2 % lower sensitivity, but 27 % greater specificity and 0.05 higher AUC, showing the utility of statistical analysis in biomarker selection.

3. DISSCUSION

The present study was one of the first attempts to investigate a wide range of biomarkers in a cohort of Lithuanian ovarian cancer patient tumor tissues. The study included the analysis of gene sequence mutations, gene promoter methylation and gene expression biomarkers, some of which were investigated in OC for the first time.

Although we did not find enough mutations in *CTNNB1*, *FBXW7* and *ARID1A* to warrant further analysis as diagnostic biomarkers, the mutation counts generally reflected worldwide trends of low (3–8%) Wnt pathway gene mutation cases in OC (Di Fiore *et al*., 2023), and 29.27% alteration rate for *ARID1A* in OC cases (generally found in 30−70 % of OC cases) (Yachida *et al*., 2020). Both alterations of the gene sequence and promoter methylation were associated with lower *ARID1A* expression, although not statistically significant, showing both genetic changes might have some influence on *ARID1A* expression, although further validation in a larger cohort is necessary. *ARID1A* mutations were a good prognosis indicator, as *ARID1A* mutations are mutually exclusive with *TP53* mutations, which are found in most HGSOC cases and are associated with poor prognosis (Guan *et al*., 2011). ARID1A is also involved in many cellular functions and is a target of various therapies, adding to better survival (Hein *et al*., 2024).

Homeobox (HOX) genes are some of the most important transcription factor–coding genes in both development and carcinogenesis, often regulated via epigenetic changes, however, the three chosen gene *ALX4*, *CDX2* and *HOPX* promoter methylation were not previously investigated in OC using MSP method. The present study found that around half (39–55%) of the OC cases presented with promoter methylation in these genes, while the benign tumor cases were mostly unmethylated. Previous studies found a slightly higher methylation percentages of these genes in other solid tumors: *ALX4* methylation of 68% in breast (Yang *et al*., 2017) and 70% in colorectal cancer (Salehi *et al*., 2015), *CDX2* 55% methylation in lung (Liu *et al*., 2012), and

72% colorectal tumors (Wang *et al*., 2018), while *HOPX* 62% methylation in colorectal (Katoh *et al*., 2012), and 84% stomach cancer cases (Ooki *et al*., 2010).

Based on literature analysis and previous works, 9 gene expression biomarkers were selected form Notch and Wnt pathways. From this set of biomarkers, 7 / 9 showed decreased expression in OC cases when compared to benign tumors. Previous studies largely based on TCGA and GTEx transcriptomic data analysis, found significant deregulation in all genes tested in our study, except *NOTCH2* (B. Chen *et al*., 2023) and *CTNNB1* (AmeliMojarad *et al*., 2023). ROC analysis of the Notch pathway genes in TCGA and GTEx cohort found higher AUC values in *NOCTH3* (0.739), *NOTCH4* (0.948) and *JAG2* (0.769) than our smaller study analyzing OC and benign tumor cases, while other biomarker AUC values were higher in our study (B. Chen *et al*., 2023).

In the present study all 10 gene, selected via TCGA and GTEx data analysis, expression was significantly deregulated in both train, test and the external Lithuanian OC tumor tissue cohorts, showing their potential as diagnostic OC biomarkers. *EXO1* (van de Kooij *et al*., 2024), *RAD50* (Zhang *et al*., 2016)*, PPT2* (Xu *et al*., 2024), and *GRB7* (Q. Xu *et al*., 2021) has previously been identified as potential targets for treatment, and *EXO1* (Yu & Wu, 2025), *PPT2* (Xu *et al*., 2024), *CDCA5* (X. Chen *et al*., 2023) and *GRB7* (Wen *et al*., 2024) were shown to feature some diagnostic potential, while *LUC7L2* (He *et al*., 2021), *PKP3* (Qian *et al*., 2019), *CDCA5* (X. Chen *et al*., 2023), and *GRB7* (Wen *et al.*, 2024) has shown to feature prognostic potential. Moreover, *LUC7L2* (He *et al*., 2021) *TCEAL4* (Chang *et al*., 2016), and *GRB7* (Chen *et al*., 2024) has been previously included in other prognostic OC panels.

In the present study logistic and cox regressions were applied to combine multiple gene expression biomarkers as well as gene promoter methylation status biomarkers. While single gene expression biomarkers did reach high diagnostic accuracy (AUC of 0.99 for *GRB7*), combining multiple biomarkers reached full separation of the OC cases from the benign tumors improving on the sensitivity of single biomarkers (*GRB7* sensitivity was 94.6%). Combination of gene promoter methylation and expression biomarkers did improve the prognostic ability to separate HGSOC from other OC cases outperforming gene expression biomarker combinations. However, including more biomarkers in the OC test model did not necessarily improve accuracy as analyzing biomarkers selected via statistical analysis, the 6 gene expression biomarker model (*RAD50*, *PKP3*, *CDCA5 ZFPL1*, *VPSS3B* and *TCEAL4*) separated HGSOC from other OC with a higher AUC than the 10 gene

expression biomarker model, while prognostic *NOTCH3* and *HES1* model also outperformed larger Notch, Wnt and *ARID1A* gene expression model when predicting 5-year survival. Including more biomarkers in the model poses a risk of overfitting to the train dataset — in this case the biomarkers selected via statistical analysis of TCGA and GTEx database transcriptomic data were chosen for their ability to diagnose OC and predict survival, rather than separate type II OC form other OC forms.

Although the gene expression biomarker model in the test dataset was not associated with survival, however, in the train cohort the 5-year survival prediction reached AUC value of 0.68, comparable to AUCs reached in other studies 0.62–0.80. The present study did have some limitations; thus, the results should be interpreted with caution. First, although the statistical data selection was performed on ovarian cancer tissue and heathy ovarian tissue transcriptomic data, in the external OC patient tissue cohort used for testing only cases form OC and other benign ovarian pathologies were used, and the cohorts used in the study were rather small, limiting the statistical power. Although biomarkers selected in the study showed high potential in tissue cohorts, ideally a diagnostic test, used for disease screening, would be non-invasive, thus further validation in liquid biopsy — e.g. blood, urine samples are necessary to apply these biomarkers in the clinical setting.

CONCLUSIONS

1. *CTTNB1* gene expression selected via literature analysis separates high–grade serous ovarian cancer (HGSOC) cases form benign tumors as well as *GRB7* gene expression biomarker chosen via statistical data analysis ($p > 0.05$).
2. *GRB7* expression has diagnostic potential (AUC = 0.99), while *NOTCH3* has prognostic potential ($p = 0.048$).
3. Biomarker combinations (*TCEAL4* and *GRB7*) can reach full separation of HGSOC and benign ovarian tumor cases (AUC = 1.00), while 10 gene combination selected based on statistical analysis have prognostic potential (AUC = 0.82).
4. *CTNNB1*, *FBXW7*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *RAD50*, *VPS33B* and *GRB7* gene expression and *ARID1A* gene promoter methylation are associated with stage in HGSOC cases, while *HES1*, *CTNNB1*, *TCEAL4* gene expression are associated with OC grade ($p < 0.05$).

AUTORĖS INDĖLIS

Disertacijos metu autorė vykdė žymenų parinkimą (literatūros analizę, TCGA ir GTEx duomenų bazių analizę). Kartu su kolegėmis (Agnė Šeštokaitė, Justina Gaiževska, Paulina Kazlauskaitė, Rugilė Gineikaitė) atliko mėginių rinkimą (mėginių ruošimą saugojimui). Pacientes į tyrimą įtraukė NVI Onkoginekologijos skyrius. Disertacijos autorė pati vykdė visus disertacijoje aprašytus eksperimentus: atliko nukleorūgščių gryninimą, sekoskaitos bibliotekų paruošimą, genų raiškos eksperimentus, genų promotorių metilinimo statuso (MSP) eksperimentus. Sekoskaitos duomenų pirminę analizę atliko disertacijos vadovė Rasa Sabaliauskaitė. Dalį genų MSP eksperimentų atliko studentė Rugilė Gineikaitė vadovaujant disertacijos autorei. Dalį *HES1*, *JAG2* ir *DLL1* genų raiškos eksperimentų atliko studentė Paulina Kazlauskaitė vadovaujant disertacijos autorei. Visų rezultatų analizę ir apipavidalinimą atliko disertacijos autorė.

PADĖKA

Nuoširdžiai noriu padėkoti žmonėms, prisidėjusiems prie disertacijos ir mano mokslinių darbų.

Visų pirma vadovei doc. dr. Rasai Sabaliauskaitei, kurios sprendimas pakviesti mane atlikti kursinio darbo po vasaros praktikos atvedė mane į dabartinę poziciją. Dirbdama su tavimi padariau daug daugiau nei kada nors būčiau galėjusi pagalvoti, kad yra įmanoma. Ačiū už pasitikėjimą ir pagalbą visus šiuos metus įgyvendinant svajones, kurių net nežinojau kad turiu.

Dėkoju Prof. Habl. dr. Juozui Rimantui Lazutkai, be Jūsų nebūčiau galėjusi studijuoti doktorantūroje. Ačiū už palaikymą ir pagalbą sunkiais momentais.

Esu nuoširdžiai dėkinga dr. Juliui Juodakiui be kurio pagalbos, įžvalgų ir paaiškinimų nebūtų įgyvendinta antroji disertacijos dalis. Esu dėkinga už laiką praleistą Geteborgo Universitete su Jumis ir Jūsų kolegomis, bei vėliau dirbant prie publikacijos.

Dėkoju Nacionalinio vėžio instituto kolegėms, visų pirma Genetinės diagnostikos laboratorijos kolegei Agnei Šeštokaitei už moralinį palaikymą kapstantis mokslo pelkėje. Kolegėms Julijai Šimienei ir Rimvilei Prokarenkaitei, ypač už pagalbą rašant pirmąją eksperimentais paremtą mokslinę publikaciją šiai disertacijai, taip pat kolegėms Justinai Gaiževskai, Ilonai Kulikienei ir Vitalijai Paukštei, kurios padėjo paleidžiant sekoskaitos eksperimentus. Didžiausia padėka studentėms Paulinai Kazlauskaitei ir Rugilei Gineikaitei, kurių atlikti eksperimentai prisidėjo prie disertacijos rezultatų. Taip pat esu dėkinga savo studentėm Mildai Urbonaitei, Aretai Petrauskaitei, Korneliai Gurskai ir studentui Ignui Silickui kurių keliami klausimai padėjo man tobulėti moksliniame kelyje. Taip pat dėkoju Nacionalinio vėžio instituto kolegėms dr. Giedrei Smailytei, prof. Sonatai Jarmalaitei ir dr. Daivai Dabkevičienei, kurios prisidėjo prie mano disertacijos publikacijų.

Esu dėkinga gyd. Rūtai Čiurlienei ir dr. Dianai Žilovič bei kitoms Nacionalinio vėžio centro Onkoginekologijos skyriaus gydytojoms, slaugytojoms ir pacientėms už tyrimo imtį.

Galiausiai noriu padėkoti mano partneriui Eimantui ir draugams už palaikymą šiame ilgame moksliniame kelyje. Šią disertaciją skiriu mano žiurkėms Pinkiui ir Remiui.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Tiesiogiai su disertacijos tema susiję straipsniai, paskelbti žurnaluose su cituojamumo rodikliu (angl. *impact factor (IF)*), įtrauktuose į *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazę:

1. **Vaicekauskaitė I**, Kazlauskaitė P, Gineikaitė R, Čiurlienė R, Lazutka JR, Sabaliauskaitė R. Integrative Analysis of Gene Expression and Promoter Methylation to Differentiate High-Grade Serous Ovarian Cancer from Benign Tumors. Biomedicines 2025; 13(2):441. https://doi.org/10.3390/biomedicines13020441
2. **Vaicekauskaitė I**, Dabkevičienė D, Šimienė J, Žilovič D, Čiurlienė R, Jarmalaitė S, Sabaliauskaitė R. ARID1A, NOTCH and WNT Signature in Gynaecological Tumours. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(6):5854. https://doi.org/10.3390/ijms24065854
3. **Vaicekauskaitė I**, Sabaliauskaitė R, Lazutka JR, Jarmalaitė S. The Emerging Role of Chromatin Remodeling Complexes in Ovarian Cancer. International Journal of Molecular Sciences, 2022; 23(22):13670. https://doi.org/10.3390/ijms232213670
4. **Vaicekauskaitė I,** Juodakis J, Kazlauskaitė P, Čiurlienė R, Smailytė G, Lazutka JR, Sabaliauskaitė R. Development and validation of gene expression-based signature for high-grade serous ovarian cancer. Journal of Ovarian Reseach 2026 (*priimtas spausdinimui*)

Kiti straipsniai, paskelbti žurnaluose su cituojamumo rodikliu (angl. *impact factor (IF)*), įtrauktuose į *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazę:

1. **Vaicekauskaitė I**, Žalimas A, Sabaliauskaitė R, Žukauskaitė K, Trakymas M, Ušinskienė J, Ulys A, Jarmalaitė S. Genomic analysis of small renal masses reveals mutations linked with renal cell carcinoma and fast-growing tumors. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2025; 151: 118. https://doi.org/10.1007/s00432-025-06162-5
2. Žvirblė M, **Vaicekauskaitė I**, Survila Ž, Bosas P, Dobrovolskienė N, Mlynska A, Sabaliauskaitė R, Pašukonienė V. Liquid-Based Diagnostic Panels for Prostate Cancer: The Synergistic Role of Soluble PD-L1, PD-1, and mRNA Biomarkers. International Journal

of Molecular Sciences. 2025; 26(2):704. https://doi.org/10.3390/ijms26020704

3. Kazlauskaitė P, **Vaicekauskaitė I**, Venius J, Sabaliauskaitė R, Steponavičienė R. Plasma microRNAs as Biomarkers for Predicting Radiotherapy Treatment-Induced Cardiotoxicity in Lung Cancer. Life 2024; 14(12): 1619. https://doi.org/10.3390/life14121619
4. Žukauskaite K, Horvath A, Gricius Ž, Kvietkauskas M, Baušys B, Dulskas A, Kuliavas J, Baušys R, Letautiene SR, **Vaicekauskaite I**, Sabaliauskaite R, Baušys A, Stadlbauer V, Jarmalaite S. Impact of Mechanical Bowel Preparation on the Gut Microbiome of Patients Undergoing Left-Sided Colorectal Cancer Surgery: Randomized Clinical Trial. British Journal of Surgery 2024; 111(9):znae213. https://doi.org/10.1093/bjs/znae213
5. Januskevicius T, **Vaicekauskaite I**, Sabaliauskaite R, Matulevicius A, Vezelis A, Ulys A, Jarmalaite S, Jankevicius F. Germline DNA Damage Response Gene Mutations in Localized Prostate Cancer. Medicina. 2024; 60(1):73. https://doi.org/10.3390/MEDICINA60010073
6. Žilovič D, Čiurlienė R, Šidlovska E, **Vaicekauskaitė I**, Sabaliauskaitė R, Jarmalaitė S. Synchronous endometrial and ovarian cancer: A case report. World Journal of Clinical Cases. 2023; 11(18):4341–4349. https://doi.org/10.12998/WJCC.V11.I18.4341
7. Januskevicius T, Sabaliauskaite R, Dabkeviciene D, **Vaicekauskaite I**, Kulikiene I, Sestokaite A, Vidrinskaite A, Bakavicius A, Jankevicius F, Ulys A, Jarmalaite S. Urinary DNA as a Tool for Germline and Somatic Mutation Detection in Castration-Resistant Prostate Cancer Patients. Biomedicines. 2023; 11(3):761. https://doi.org/10.3390/biomedicines11030761
8. Žilovič D, **Vaicekauskaitė I**, Čiurlienė R, Sabaliauskaitė R, Jarmalaitė S. Uterine Cavity Lavage Mutation Analysis in Lithuanian Ovarian Cancer Patients. Cancers. 2023; 15(3):868. https://doi.org/10.3390/cancers15030868
9. Lachej N, Dabkeviciene D, Simiene J, Sabaliauskaite R, Jonusiene V, Brasiunas V, Sasnauskiene V, **Vaicekauskaite I,** Brasiuniene B, Kanopiene D, Suziedelis K, Didziapetriene J. Components of NOTCH Signaling for Uterine Cancer Patients' Prognosis. Journal of Oncology, 2022;2022, Article ID 8199306. https://doi.org/10.1155/2022/8199306

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

Pranešimai tarptautinėse konferencijose, tiesiogiai susiję su disertacijos tema:

1. Molecular Analysis for Precision Oncology Congress 2024; Stendinis pranešimas, Londonas, United Jungtinė Karalystė, 2024.10.16 – 10.18. **Vaicekauskaitė I**, Kazlauskaitė P, Gineikaitė R, Čiurlienė R, Lazutka JR, Sabaliauskaitė R. #46P; Promising epi(genetic) biomarkers for ovarian tumor prognosis
2. Gene Forum 2024, Stendinis pranešimas, Tartu, Estija, 2024.09.24-09.25. **Vaicekauskaitė I**, Kazlauskaitė P, Gineikaitė R, Čiurlienė R, Lazutka JR, Sabaliauskaitė R. New insight into ovarian cancer epi(genetic) biomarkers
3. ESGH 2024; E–stendinis pranešimas, Berlynas, Vokietija, 2024.06.01 – 06.04. **Vaicekauskaitė I**, Kazlauskaitė P, Gineikaitė R, Čiurlienė R, Lazutka J.R., Sabaliauskaitė R. (Epi)genetic Biomarkers for High-Grade Serous Ovarian Carcinoma
4. 16-oji Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija “Bioateitis: Gamtos ir Gyvybės mokslų perspektyvos”; Žodinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2023.11.23. **Vaicekauskaitė I**, Kazlauskaitė P, Čiurlienė R, Lazutka J.R, Sabaliauskaitė R. Potencialių genetinių žymenų kiaušidžių vėžio diagnostikai ir predikcijai tyrimai. *III vietos apdovanojimas už geriausią pranešimą Biologijos sekcijoje.*
5. Open Readings 2023; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2023.04.18 – 04.21. **Vaicekauskaite I,** Dabkevičienė D, Šimienė J, Žilovič D, Čiurlienė R, Jarmalaitė S, Sabaliauskaitė R. Transcriptomic and Mutational Analysis of Gynecologic Cell Lines and Tumors.
6. ESGH 2023; E–stendinis pranešimas, Glazgas, Jungtinė Karalystė, 2023.06.10 – 06.13. **Vaicekauskaite I,** Zilovic D, Ciurliene R, Jarmalaite S. Sabaliauskaite R. NOTCH pathway and *ARID1A* downregulation in High-grade ovarian cancer tissues
7. FEBS3+ Conference of Estonian, Latvian and Lithuanian Biochemical Societies; Stendinis pranešimas, Talinas, Estija, 2022.06.15 – 03.17. **Vaicekauskaite I,** Sabaliauskaite R, Zilovic D, Ciurliene R, Lazutka J.R, Jarmalaite S. Prognostic insights from the analysis of uterine lavage samples in ovarian cancer patients

8. ESGH 2022; E–stendinis pranešimas, Viena, Austrija, 2022.06.11 – 06.14. **Vaicekauskaite I,** Sabaliauskaite R, Zilovic D, Ciurliene R, Lazutka J.R, Jarmalaite S. Uterine lavage fluid for molecular identification of high grade ovarian cance
9. Open Readings 2022 virtual conference; E–stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2022.03.16 – 03.19. **Vaicekauskaite I,** Zilovic D, Ciurliene R, Lazutka J.R, Sabaliauskaite R, Jarmalaite S. NOTCH and WNT gene expression signature in High grade serous ovarian cancer

Kiti pranešimai tarptautinėse konferencijose:

1. 44th Congress of the European Society of Surgical Oncology; Stendinis pranešimas, Geteborgas, Švedija, 2025.10.15 - 10.17. Bausys A, Žukauskaite K, Horvath A, Gricius Z, Kvietkauskas M, Baušys B, Dulskas A, Kuliavas J, Baušys R, Letautiene S R, **Vaicekauskaitė I**, Sabaliauskaitė R, Stadlbauer V, Jarmalait˙e S. Impact of Oral Agents Versus Rectal Enemas on Gut Microbiome Composition in Patients Undergoing Left-Sided Colorectal Cancer Surgery: Results from a Randomized Clinical Trial
2. Baltic-Polish school of immunology 2025; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2025.05.12 – 05.13. Žvirblė M, **Vaicekauskaitė I**, Survila Ž, Dobrovolskienė N, Mlynska A, Sabaliauskaitė R, Pašukonienė V. sPD-L1 and sPD-1 Interaction with Androgen Receptor: Immune Regulation and Its Role in Prostate Cancer Diagnosis
3. Open Readings 2025; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2025.03.17 – 03.20. Urbonaitė M, **Vaicekauskaitė I**, Žalimas A, Sabaliauskaitė R. Exploring genetic biomarkers in plasma samples of clear cell renal cell carcinoma patients
4. The Coins 2025; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2025.03.17 – 03.20. Urbonaitė M, **Vaicekauskaitė I**, Žalimas A, Sabaliauskaitė R. Diagnostic Potential of C-MYC and CTNNB1 Expression in Plasma Samples from Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients
5. The Coins 2025; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2025.03.17 – 03.20. Petrauskaitė A, **Vaicekauskaitė I**, Čiurlienė R, Sabaliauskaitė R. Evaluating KIF2C Expression as a Novel Biomarker for Early Detection and Prognosis of Ovarian Cancer

6. The Coins 2025; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2025.03.17 – 03.20. Gurska K, **Vaicekauskaitė I**, Čiurlienė R, Sabaliauskaitė R. Analysis Of The Components Of Hippo Signaling Pathway As a Potential Biomarker For Ovarian Cancer Diagnosis
7. The Coins 2025; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2025.03.17 - 03.20. Remeikaitė N, Šeštokaitė A, **Vaicekauskaitė I**, Mylinska A, Sabaliauskaitė R. Analysis Of Immunoepigenetic Markers And Their Association with Clinical Parameters in Bladder Cancer
8. ESGH 2024; E–stendinis pranešimas, Berlynas, Vokietija, 2024.06.01 – 06.04. **Vaicekauskaitė I**, Sabaliauskaitė R, Žalimas A, Žukauskaitė K, Kubiliūtė R, Ulys A, Jarmalaite S. Genomic Exploration of Small Renal Masses in Lithuanian cohort
9. Open Readings 2024; Žodinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2024.04.23 – 04.26. Kazlauskaitė P, **Vaicekauskaitė I**, Čiurlienė R, Sabaliauskaitė R. Notch signaling pathway components as potential biomarkers for the diagnosis of ovarian cancer. *Apdovanojimas už geriausią pranešimą.*
10. Open Readings 2024; Žodinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2024.04.23 – 04.26. Gineikaitė R, **Vaicekauskaitė I**, Čiurlienė R, Sabaliauskaitė R. Methylation profiling of homeotic and chromatin remodeling genes in cancerous ovarian tissue
11. Coins2024; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2024.04.15 – 04.18. Kazlauskaitė P, **Vaicekauskaitė I**, Čiurlienė R, Sabaliauskaitė R. Notch signaling pathway components as biomarkers for ovarian cancer diagnosis
12. Coins2024; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2024.04.15 – 04.18. Gineikaitė R, **Vaicekauskaitė I**, Urbonaitė M, Čiurlienė R, Sabaliauskaitė R. Methylation profiling of homeotic and chromatin remodeling genes in cancerous ovarian tissues
13. Coins2024; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2024.04.15 – 04.18. Urbonaitė M, **Vaicekauskaitė I**, Gineikaitė R, Čiurlienė R, Sabaliauskaitė R. Identification of genetic biomarkers in clear cell renal cell carcinoma
14. Coins2023; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2023.04.24 – 04.27. Kazlauskaite P, **Vaicekauskaite I,** Sabaliauskaite R, Jarmalaite S Venius J, Steponavičienė R. Plasma miRNAs as Potential Biomarkers for Predicting Radiotherapy Treatment-Associated Development of Rihd in Lung Cancer Patients

15. Open Readings 2023; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2023.04.18 – 04.21. Kazlauskaite P, **Vaicekauskaite I,** Sabaliauskaite R, Jarmalaite S Venius J, Steponavičienė R. Plasma miRNAs as Potential Biomarkers for Predicting Radiation-Induced Heart Diseases in Lung Cancer Patients.
16. 10th Jubilee International Conference on Radiation in Various Fields of Research (Jubilee RAD 2022 Conference – Summer Edition); E–stendinis pranešimas, Herceg Novi, Juodkalnija, 2022.07.25 – 07.29. Kazlauskaite P, **Vaicekauskaite I,** Sabaliauskaite R, Venius J, Jarmalaite S, Steponavičienė R. Plasma miRNAs as biomarkers for radiation-induced cardiac toxicity in Lithuanian lung cancer patients https://doi.org/10.21175/rad.sum.abstr.book.2022.7.3
17. EAU Baltic22; Stendinis pranešimas, Vilnius, Lietuva, 2022.05.27 – 05.28 Januskevicius T, **Vaicekauskaite I,** Dabkeviciene D, Sabaliauskaite, Kulikiene I, Sestokaite A, Vidrinskaite A. Ulys A, Jarmalaite S, Bakavicius A, Jankevicius F. Urine as a liquid biopsy for DNA damage repair genes mutation detection in advanced prostate cancer.

TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĘ

Bendra Informacija	
Vardas, Pavardė	Ieva Vaicekauskaitė
Pagrindinė darbovietė	Nacionalinis vėžio institutas, Genetinės diagnostikos laboratorija, Baublio g. 3b, LT-08406, Vilnius, Lietuva

Išsilavinimas	
2021–2025	Doktorantūros studijos (Biologija, N 010), Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Vilnius, Lietuva.
2019–2021	Gyvybės mokslų magistro studijos (Genetika), Vilniaus Universitetas
2015–2019	Genetikos bakalauro studijos, Vilniaus universitetas

Darbo patirtis	
Nuo 2021 liepos mėn.	Jaunesnioji mokslo darbuotoja; Nacionalinis vėžio institutas, Genetinės diagnostikos laboratorija
2020 balandžio mėn. – 2022 gegužės mėn.	Tyrėja; Nacionalinis vėžio institutas, Genetinės diagnostikos laboratorija
2019 liepos mėn. – 2021 liepos mėn.	Biologė; Nacionalinis vėžio institutas, Genetinės diagnostikos laboratorija
2019 kovo mėn. – liepos mėn.	Laborantė; Nacionalinis vėžio institutas, Genetinės diagnostikos laboratorija

Moksliniai projektai	
Nuo 2025 birželio mėn.	Jaunesnioji mokslo darbuotoja, projekto vadovė; „Genų iRNR kiekio tyrimas kiaušidžių vėžio pacienčių skystos biopsijos mėginiuose“ MSF-JM-14/2025
Nuo 2024 sausio mėn.	Jaunesnioji mokslo darbuotoja; EU4Health programos projektas “Federacinė Europinė genomikos duomenų infrastruktūra – GDI“ Nr. 101081813

Užbaigti moksliniai projektai	
2025 spalio mėn. – 2025 gruodžio mėn.	Jaunesnioji mokslo darbuotoja; „Radiobiologinių ir fizikocheminių procesų tyrimai naujos kartos spindulinės FLASH terapijos taikymui vežio gydyme“ Nr. S-MIP-24-134
2022 birželio mėn. – 2023 gegužės mėn.	Jaunesnioji mokslo darbuotoja; “Didelio našumo *in vivo* tyrimų technologijos, skirtos įvertinti onkologinių vaistų kandidatus, sukūrimas“ Nr. 01.2.1-LVPA-K-823-03-0013
2020 lapkričio mėn. – 2021 balandžio mėn.	Studentų mokslinė praktika; projektas „Notch genų raiškos pokyčių kiekybiniai tyrimai kiaušidžių vėžio ląstelėse po poveikio interferonu gama“ Nr. 09.3.3-LMT-K-712-22-0300
2020 spalio mėn. – 2021 vasario mėn.	Biologė; „Pažangūs naujos kartos sekoskaitos įrankiai“ Nr. 01.2.1-LVPA-K-856-01-0024

Apdovanojimai	
2025	Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro vardinė stipendija už mokslinius pasiekimus
2024	Lietuvos mokslų akademijos parama doktorantams už studijų pasiekimus
2023	Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro vardinė stipendija už mokslinius pasiekimus

Stažuotės, Kursai	
2024	*NextSeq 2000 Workflow* mokymai, Illumina, Inc
2024	PCM4EU pavasario mokykla, Portas, Portugalija
2023 08 01 – 10 01	Erasmus + praktika; *Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Clinical Sciences, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Gothenburg,* Švedija
2021	Laboratorinių (bandomųjų) gyvūnų mokslo kursas
2020	„Laborama“ mokymų kursas dėl naudojimosi ir priežiūros instrukcijų darbui su „*Ncounter analysis system*“

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.