

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**MOLEKULINIŲ ŽYMENŲ TYRIMAS IDENTIFIKUOJANT KLINIŠKAI
REIKŠMINGĄ PRIEŠINĖS LIAUKOS VĖŽĮ**

Magistrantė DOVILĖ ŠIUŠKAITĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas
dr. Diana Schveigert _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
doc. dr. D. Karčiauskaitė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2018 m., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPOS IR PAAIŠKINIMAI	3
ĮVADAS.....	4
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Priešinės liaukos vėžys	7
1.1.1. Priešinė liauka.....	7
1.1.2. Priešinės liaukos ligos.....	8
1.1.3. Priešinės liaukos vėžys, paplitimas, ligos stadijos ir diferenciacija.....	8
1.1.4. Priešinės liaukos vėžio simptomai ir rizikos veiksniai (etiologija).....	11
1.1.5. Priešinės liaukos vėžio diagnostika ir gydymas.....	12
1.2. Priešinės liaukos molekuliniai žymenys.....	14
1.2.1. <i>CRISP3</i> ir priešinės liaukos vėžys	14
1.2.2. <i>LMTK2</i> ir priešinės liaukos vėžys.....	17
1.2.3. <i>MSMB</i> ir priešinės liaukos vėžys	19
1.2.4. <i>MSMB</i> geno mutacija ir priešinės liaukos vėžio rizika	21
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI	24
2.1. Tyrimo objektas.....	24
2.2. Genų raiškos nustatymas	25
2.2.1. RNR gryninimas iš kraujo	25
2.2.2. Kopijinės DNR sintezė	26
2.2.3. Kiekybinė tikrojo laiko polimerazės grandininė reakcija	27
2.3. Vieno nukleotido polimorfizmo nustatymas	29
2.3.1. DNR gryninimas iš kraujo	29
2.3.2. Polimerazės grandininė reakcija	29
2.3.3. Pirosekoskaita	30
2.4. Statistinė duomenų analizė.....	32
3. DARBO REZULTATAI.....	33
3.1. <i>CRISP3</i> geno raiškos pokyčiai sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje	33
3.2. <i>LMTK2</i> geno raiškos pokyčiai sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje.....	35
3.3. <i>MSMB</i> geno raiškos pokyčiai sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje	36
3.4. <i>MSMB</i> geno (-57 C/T) polimorfizmas sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje.....	38
3.5. <i>CRISP3</i> , <i>LMTK2</i> , <i>MSMB</i> genų raiškos ir <i>MSMB</i> (-57 C/T) polimorfizmo variantų pokyčiai sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje.....	40
4. REZULTATŲ APTARIMAS	44
IŠVADOS	48
SANTRAUKA.....	49
SUMMARY	51
PADĖKA	52
LITERATŪROS SĄRAŠAS	53

SANTRUMPOS IR PAAIŠKINIMAI

- ADT** – androgenų deprivacijos terapija
- AR** – androgenų receptoriai
- CRISP3** – cisteinu turtingas sekrecijos baltymas 3
- DNR** – deoksiribonukleorūgštis
- dNTP** – deoksiribonukleotidtrifosfatai
- FSH** – folikulus stimuliuojantis hormonas
- GPH** – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija
- MSMB** – mikrosemino baltymas beta
- KAPV** – kastracijai atsparus priešinės liaukos vėžys
- kDa** – kilodaltonas
- kDNR** – kopijinė deoksiribonukleorūgštis
- LMTK2** – lemuro tirozino kinazė 2
- mRNR** – matricinė ribonukleorūgštis
- PGR** – polimerazės grandininė reakcija
- PIN** – priešinės liaukos intraepitelinė neoplazija
- PSA** – priešinės liaukos specifinis antigenas
- PV** – priešinės liaukos vėžys
- RNR** – ribonukleorūgštis
- TL-PGR** – tikrojo laiko polimerazės grandininė reakcija
- UV** – ultravioletiniai spinduliai
- VNP** – vieno nukleotido polimorfizmas

ĮVADAS

Priešinės liaukos vėžys (PV) yra antra pagal susirgimų dažnį onkologinė liga tarp vyrų visame pasaulyje [1]. PV išsivysčiusiose šalyse vis dar išlieka pagrindiniu piktybiniu susirgimu bei antrąją pagrindine mirties nuo vėžio priežastimi tarp vyrų [2]. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis Europoje kasmet diagnozuojama apie 420 000 naujų PV atvejų. PV sudaro apie 21% bendro vyrų populiacijos sergamumo onkologinėmis ligomis [3]. Tuo tarpu Lietuvoje kasmet diagnozuojama daugiau nei 2000 naujų vėžio atvejų ir šis skaičius nuolat didėja [4].

PV etiologija nėra tiksliai nustatyta, tačiau žinoma keletas rizikos veiksnių, tokių kaip amžius, šeimos istorija bei etninė kilmė, kurie, manoma, turi įtakos PV vystymuisi [5]. Tyrimų duomenys rodo, kad 30-40% visų ankstyvojo PV atvejų (<55 metų) lemia paveldimi veiksniai, kas rodo šios ligos genetinį polinkį, o paveldimas jautrumas neretai laikomas stipriausiu PV rizikos veiksniu [6].

1970 metais atrastas ir pasiūlytas priešinės liaukos specifinis antigenas (PSA) yra priešinės liaukos gaminamas baltymas. Tai iki šiol išlieka svarbiausias testas, siekiant diagnozuoti PV bei stebėti šios ligos eigą [7, 8]. Sergant PV PSA koncentracija kraujyje didėja. Ir nors PSA yra specifinis priešinės liaukos žymuo, tačiau jis nėra specifinis navikui. Gana dažnai PSA koncentracijos padidėjimo susieti su PV negalima, nes šis žymuo gali būti ir nepiktybinės priešinės liaukos ligos rodikliu [9]. Nepaisant 2006 m. Lietuvoje pradėtos taikyti „Priešinės liaukos vėžio ankstyvosios diagnostikos“ programos sergančiųjų PV pacientų išgyvenamumas išlieka vis dar mažas dėl dažno ligos atsinaujinimo, kuris nepastebimas arba pastebimas per vėlai. Taip pat gana dažnai pacientai, sergantys PV, gydomi tada, kai gydyti visai nereikia, o pakanka tik stebėti [2, 8, 10]. Pacientams klaidingos diagnozės nustatymas lemia pernelyg didelį skaičių naujai diagnozuojamų PV atvejų arba atvirkščiai, nepakankamą skaičių gydomų pacientų. Dėl šios priežasties kiekvienais metais Jungtinėse Amerikos Valstijose ir Europoje yra atliekama beveik du trečdaliai nereikalingų priešinės liaukos biopsijų [11]. Taip yra dėl to, kad nėra pakankamai žinoma apie molekulinis mechanizmus, kurie turi įtakos PV progresavimui. Vis dar nėra patvirtintų naujų klinikinių žymenų, kurie būtų naudingi bei reikšmingi diagnozuojant ir gydant PV, todėl tyrimai šiuo aspektu yra svarbūs ir aktualūs [12].

Genetinės analizės technologijų tobulėjimas šiandien leidžia atrasti naujus žymenis, kurie galėtų būti naudojami prognozuojant PV paplitimą, pasekmes ir atsaką į gydymą. Pažangios technologijos tokios kaip mikrogardelių analizė ir naujos kartos sekoskaita genetinių mutacijų nustatymui, ateityje padėtų sukurti naujus kelius klinikinių sprendimų valdymui ir suteiktų galimybę lengviau suprasti paciento vėžio progresavimo riziką [2]. Tokių žymenų kaip vieno

nukleotido polimorfizmas (VNP) nustatymas, leistų nuspėti kliniškai reikšmingus rezultatus vyrams, kurie serga PV [13]. Todėl, šiuo metu yra susitelkta į naujų, alternatyvių PV žymenų, paiešką, ypač tų, kurie nuspėtų ligos piktybiškumą ir padėtų parinkti tinkamiausią PV gydymą [8]. Tokiais žymenimis, kurie leistų atskirti kliniškai reikšmingą PV nuo kliniškai nereikšmingo galėtų būti *CRISP3*, *LMTK2*, *MSMB* genų raiškos pokyčių ir *MSMB* polimorfizmo nustatymas kraujyje. Pastebėta, kad pacientams, sergantiems PV, didelė *CRISP3* ir maža *MSMB*, *LMTK2* raiška kraujyje bei *MSMB* (rs10993994) polimorfizmo TT variantas yra siejami su padidėjusia PV vystymosi rizika [2, 5, 14, 15].

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – įvertinti molekulinį žymenų reikšmę, siekiant identifikuoti kliniškai reikšmingą priešinės liaukos vėžį.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti *CRISP3*, *LMTK2*, *MSMB* genų raišką pacientų kraujyje bei įvertinti sąsają su klinikinėmis – pataloginėmis charakteristikomis;
2. Nustatyti *MSMB* geno polimorfizmo dažnį pacientų kraujyje bei įvertinti sąsają su klinikinėmis – pataloginėmis charakteristikomis;
3. Palyginti molekulinį žymenų tarpusavio sąsają identifikuojant kliniškai reikšmingą priešinės liaukos vėžį.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Priešinės liaukos vėžys

1.1.1. Priešinė liauka

Priešinė liauka yra fibroraumeninis, retroperitoninis organas, apjuosiantis šlapimo pūslės kaklelį ir šlaplę, pas suaugusius vyrus sverianti apie 20 g [16]. Histologiškai priešinės liaukos audinys skirstomas į dvi pagrindines dalis: liaukinį, kuris sudarytas iš sekrecinių kanalų, acinusų ir stromos, kuris sudarytas daugiausia iš kolageno ir lygiųjų raumenų [17]. Anatomiškai ir biologiškai priešinės liaukos parenchima suskirstyta į keturias zonas: periferinę, centrinę, tranzitorinę ir priekinę fibroraumeninę stromą. Stebimi skirtingi proliferaciniai pažeidimai kiekvienoje zonoje; hiperplazija dažniausiai veikia tranzitorinę zoną, o karcinomos atsiranda periferiniame regione [16].

Priešinės liaukos ląstelės dažniausiai yra priklausomos nuo stimuliacijos hormonais [18]. Androgenai (vyriškieji lytiniai hormonai), kaip testosteronas ir 5alfa-dihidrotestosteronas (DHT), ypač svarbūs priešinės liaukos audinio vystymuisi ir diferenciacijai bei epitelinių ląstelių proliferacijai, funkcionavimui [16, 19]. Androgenų (testosteronas, DHT, dihidroepiandrosteronas, androsteronas) sintezė daugiausiai vyksta vyro sėklidėse Leidigo ląstelėse, tačiau nedidelė dalis androgenų (androstenedionas, dihidroepiandrosteronas ir dihidroepiandrosterono sulfatas) pagaminama ir antinksčių žievėje [18, 20]. Testosteronas yra pagrindinis cirkuliuojantis androgenas, kuris jungiasi su albuminu arba lytinius hormonus sujungiančiu globuliniu (angl. sex hormon binding globulin) ir tik nedidelė dalis yra laisvos formos, kuri patenka į priešinės liaukos epitelines ląsteles [18]. Testosteronas netiesiogiai veikia naviko vystymąsi [20]. Priešinės liaukos ląstelėse fermento 5alfa-reduktazės pagalba testosteronas verčiamas į dihidrotestosteroną, kuris, yra 5 kartus aktyvesnis už testosteroną, ir yra esminis PV ląstelių proliferacijos ir supiktybėjimo veiksnys [17, 19, 20]. Androgenų poveikis priešinės liaukos ląstelėms yra susijęs su specifiniais androgenų receptoriais (AR), kurie priklauso branduolio steroidinių receptorių šeimai [19]. AR veikia kaip nuo ligando priklausomi transkripcijos veiksniai, kurie ląstelėse reguliuoja nuo androgenų priklausomą genų raišką ir yra susiję tiek su gerybinių, tiek su piktybinių priešinės liaukos ląstelių pakitimų vystymusi [16]. Priešinės liaukos ląstelėse pasigaminus DHT, jis jungiasi su AR, vyksta šių receptorių fosforilinimas ir dimerizacija. Dimerizuotos AR formos jungiasi su androgenus reguliuojančių genų specifiniais DNR promotoriaus regionais ir aktyviną šių genų transkripciją [21]. Be hormonų poveikio naviko augimas sustoja ar ženkliai sulėtėja [18].

1.1.2. Priešinės liaukos ligos

Bendri priešinės liaukos pažeidimai, kurie sukelia priešinės liaukos padidėjimą ar augimą, yra gerybinė priešinės liaukos hiperplazija (GPH), prostatitas, priešinės liaukos intraepitelinė neoplazija (PIN) ir priešinės liaukos adenokarcinoma [16].

GPH arba mazginė hiperplazija – tai priešinės liaukos padidėjimas, pasireiškiantis stromos ir epitelio ląstelių išvešėjimu, kurį sukelia tokie procesai kaip uždegimas ar lytiniai hormonai. Priešinės liaukos padidėjimas nėra labai pavojingas, todėl ši būklė yra vadinama gerybinė priešinės liaukos hiperplazija [16, 17, 22]. Tai įprasta 60 metų amžiaus vyrų būklė, kuri nustatoma beveik visiems, virš 80 metų amžiaus, vyrams [23]. GPH sergantiems vyrams dažniausiai pasireiškia įvairūs apatinių šlapimo takų simptomai ir šlapinimosi sutrikimai [16]. Kita būklė prostatitas – tai priešinės liaukos uždegimas, kuris dažniausiai stebimas vyrams po 50 metų amžiaus. Vyrai sergantys prostatitu dažniausiai skundžiasi skausmu šlapimo ir lyties organų srityje, gali pasireikšti ir seksualiniu pajėgumu susiję simptomai. Remiantis klinikiniais ir laboratoriniais duomenimis, prostatitas dar skirstomas į: ūmų bakterinį prostatitą, lėtinį bakterinį prostatitą, lėtinį uždegiminį ir neuždegiminį prostatitą (lėtinis dubens skausmo sindromas) bei asimptominį uždegiminį prostatitą. Dažniausios prostatito priežastys – lytiniu keliu plintančios ligos ir infekcijos. Ūmų bakterinį prostatitą dažniausiai sukelia *Escherichia coli* bakterijos, kuris vėliau gali pereiti į lėtinį bakterinį prostatitą [24]. PIN – liaukinio epitelio proliferacija su didele citologine atipija priešinės liaukos kanaluose ir acinuose [25]. PIN – neinvazinės atipinės epitelio ląstelės su atsirandančiais gerybiniais acinusais, dažnai randamos kartu su priešinės liaukos adenokarcinoma. PIN, priklausomai nuo ląstelės branduolio pokyčių, dar yra skirstoma į geros (žemo laipsnio) ir blogos (aukšto laipsnio) diferenciacijos navikus [16]. Blogos diferenciacijos PIN žymi *in situ* adenokarcinomą ir dažniausiai yra adenokarcinomos pirmtakai [26]. PIN nustatoma apie 70% atvejų, vyrams sulaukusiems 70 metų amžiaus [16].

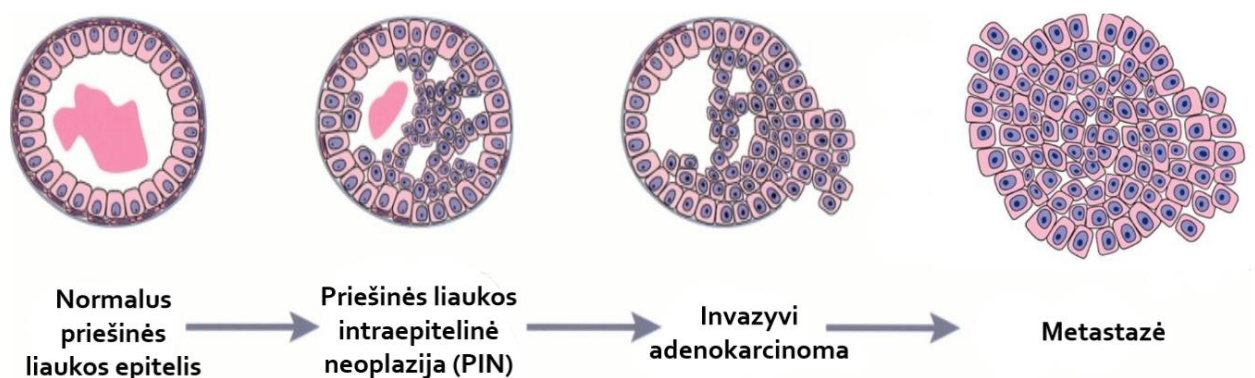
1.1.3. Priešinės liaukos vėžys, paplitimas, ligos stadijos ir diferenciacija

Priešinės liaukos vėžys (PV) yra antras pagal dažnį vėžinis susirgimas tarp vyrų visame pasaulyje [27]. Remiantis Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, 2012 metais sergamumas PV sudarė apie 14,8% visų vyrų onkologinių susirgimų, o mirtingumas apie 6,6%. 2012 metais Amerikos regione PV buvo diagnozuotas 412739 naujų vėžio atvejų (28,4% visų vyrų susirgimų), o 85425 (12,6% vyrų mirčių nuo vėžio) vyrų mirė nuo šios ligos; pietryčių Azijos regione diagnozuota – 38515 (4,7%) atvejų, mirė – 24932 (4,0%) vyrai [3]. Tuo tarpu,

2012 metų Lietuvos vėžio registro duomenimis, Lietuvoje buvo diagnozuoti 2606 nauji šios ligos atvejai. Pagal vyrų sergamumą piktybiniais navikais, PV yra dažniausia vyrų onkologinė liga Lietuvoje ir išlieka antroje vietoje pagal mirčių skaičių nuo vėžio. 2012 metais sergamumas PV sudarė 29%, o nuo šios ligos mirė apie 14% visų Lietuvos gyventojų. Vyresniems nei 50 metų amžiaus vyrams tikimybė susirgti PV su amžiumi didėja [4].

Priešinės liaukos adenokarcinoma, tai vienas iš dažniausiai diagnozuojamų vėžinių susirgimų tarp vyrų ir dažniausiai nustatoma priešinės liaukos patologinė būklė [28]. Didžioji dalis pirminių PV atvejų yra adenokarcinomos [16]. Priešinės liaukos adenokarcinoma dažniausiai atsiranda periferinėje zonoje, todėl apie 98% PV atvejų yra liaukinės kilmės; priešinės liaukos adenokarcinomos mikroskopinė diagnozė patvirtinama remiantis liaukinių struktūrų formavimusi [12, 28]. Priešinės liaukos adenokarcinomos dažniausiai yra daugiažidininės. Paprastai nustatomi bent du geografiškai skirtingi židiniai, kurie tarpusavyje skiriasi tiek histologiškai, tiek Glisono balu (angl. Gleason score) [12]. Daugiažidininės adenokarcinomos pasižymi tuo, kad jose randama invazinių epitelinių ląstelių [26]. Priešinės liaukos ligos susijusios ne su adenokarcinoma svyruoja nuo gerybinių ir piktybinių ligų ir apima ne vėžinius infekcinius ir uždegiminius procesus [28].

Išskiriamos PV vystymosi stadijos apima PIN, kuri toliau vystosi į lokalias invazines, nuo androgenų priklausomas, neoplazijas ir ilgainiui išsivysto į nuo androgenų nepriklausomą metastazinę ligą (kastracijai atsparus priešinės liaukos vėžys (KAPV)) (1 pav.) [29].



1 pav. Žmogaus priešinės liaukos vėžio progresavimo schematinis vaizdas, adaptuota pagal [30]

KAPV yra apibūdinamas kaip vėžys, kurio naviko ląstelės auga nepriklausomai nuo androgenų poveikio [19]. Ankstyvos PV formos progresavimas iki kastracijai atsparios ligos yra

susijęs su padidėjusiu hormonų signalo perdavimo aktyvumu. Didžiąjai daliai pacientų, kuriems išsivysto PV, dažniausiai yra skiriama AR antagonistų (GnRH, angl. Gonadotropin Releasing Hormone), kurie slopina androgenų poveikį priešinės liaukos epitelinių ląstelių proliferacijai [31]. Tačiau anksčiau ar vėliau tokių pacientų vėžines ląsteles stimuliuoja minimalus androgenų kiekis kraujyje (pvz., iš antinksčių) arba jos auga nepriklausomai nuo androgenų stimuliacijos. Tada liga ir patenka į kastracijai atsparią fazę [32]. KAPV atvejais AR ir nuo androgenų priklausomų genų raiška išlieka [31]. Pirmasis šios ligos požymis dažnai yra padidėjusi priešinės liaukos specifinio antigeno (PSA) koncentracija arba nutolusių metastazių nustatymas, prieš pacientui pasireiškiant bet kokiems simptomams [32].

PV, priklausomai nuo naviko išplitimo, skirstomas į lokalių, kai navikas nustatomas lokaliai priešinėje liaukoje ir yra neišplitęs už priešinės liaukos bei gali būti labai agresyvūs, metastazuojantys į kaulus ir kitus organus kaip kepenis, plaučius ar limfmazgius [16, 33]. Gerybiniai navikai paprastai auga lėtai, spausdami aplinkinius sveikus audinius, tačiau, jų neardo ir neišplinta į kitus organus (nemetastazuoja). Dėl to nepakinta paciento gyvenimo kokybė ir neprireikia aktyvaus gydymo. Tuo tarpu piktybiniai navikai skverbiasi į aplinkinius sveikus audinius, juos ardo ir naikina [34, 35]. Be to, piktybinio naviko ląstelės gali atsiskirti nuo pradinio klonu, pasklisti po visą organizmą ir nukeliaudamos į nutolusius organus [36]. Sergamumas PV yra didelis, todėl maždaug vienam iš šešių pacientų gali išsivystyti agresyvi šios ligos forma. Šiandien tai tampa viena iš svarbiausių vyrų sveikatos problemų visame pasaulyje [37]. Prognozė yra gera pacientams, kuriems nustatyta lokali liga, tačiau 5-erių metų išgyvenamumas mažėja iki mažiau nei 30% asmenims su pažengusia ligos stadija (metastaziniais navikais). Nors metastazinių ligų gydymui šiuo metu yra naudojama androgenų deprivacijos terapija (ADT), atsakas į gydymą paprastai yra laikinas, o didžiąjai daliai pacientų vėžys progresuoja ir galiausiai išsivysto KAPV, kuris dažnai atsiranda dėl mikrometastazių [38].

Klinikinė ligos stadija (TNM), diferenciacijos laipsnis pagal Glisoną ir PSA, vertinant vėžio išplitimą ir piktybiškumą, yra gerai žinomi PV prognostiniai veiksniai [39]. Jie ne tik leidžia prognozuoti PV ligos eigą, bet ir lemia tinkamą gydymo taktikos parinkimą. Dažniausiai PV ląstelių piktybiškumas nustatomas pagal ląstelių subrendimo (diferenciacijos) laipsnį; kuo ląstelės mažiau subrendusios, tuo jos piktybiškesnės. Glisono balas yra dažniausiai naudojamas priešinės liaukos adenokarcinomos piktybiškumui įvertinti. Jis žymimas skaičiais nuo 2 iki 10 (2 – mažiausiai agresyvus navikas, 10 – agresyviausias navikas). Tai dviejų skaičių suma, kuri gaunama susumavus biopsinės medžiagos navikinių ląstelių pakitimus (vertinama nuo 1 iki 5 laipsnių) [27]. Mažas Glisono balas reiškia, kad naviko ląstelės yra labai panašios į normalias priešinės liaukos ląsteles, ir atitinkamai, didelis Glisono balas reiškia, kad vėžinės ląstelės labai skiriasi nuo sveiko audinio ląstelių. Kuo suma mažesnė, tuo liga mažiau piktybiška, kuo didesnė,

tuos ligos eiga blogesnė, greitesnis metastazavimas. Naviko diferenciacijos laipsnio įvertinimas pagal Glisoną yra vienas iš efektyviausių ir dažniausiai naudojamų metodų visame pasaulyje, pagal Glisoną priklauso jo metastazavimo į kitus organus tikimybė. Mažiausia pagal Glisono sistemą PV diferenciacijos suma yra 6, tuomet ligos eiga švelnesnė, 7 – ligos eiga vidutinio agresyvumo, 8–10 – ligos eiga gali būti agresyvi, greitesnė metastazavimo galimybė. Sergančiųjų PV gyvenimo trukmė labai priklauso nuo naviko išplitimo [33, 40]. Kita dažniausiai naudojama klasifikavimo sistema yra TNM. TNM (navikas, limfmazgiai ir metastazės) sistema leidžia apibūdinti ligos išplitimą, t. y. nustatyti PV stadiją [27]. Ligos stadija nustatoma pagal TNM reikšmių kombinaciją: T - pirminio naviko dydis (T1 ir T2 dydžio priešinės liaukos navikai vertinami kaip lokalūs navikai, T3–T4 navikai vertinami kaip vietiškai arba lokaliai išplitęs PV), N - naviko metastazės sritiniuose limfmazgiuose (N0 – ligos metastazių sritiniuose, o N1 – yra ligos metastazių sritiniuose limfmazgiuose), M – tolimosios metastazės (M0 – tolimųjų ligos metastazių nėra, M1 – yra ligos metastazių kituose, tolimuose organuose). Remiantis šia sistema yra apibūdinamas prostatos naviko išplitimas diagnozės nustatymo metu - prieš pradėdant priešnavikinį gydymą [41].

1.1.4. Priešinės liaukos vėžio simptomai ir rizikos veiksniai (etiologija)

PV ankstyvose vystymosi stadijose yra besimptomis. Šlapimas laisvai pašalinamas iš organizmo, todėl žmogus jokių simptomų nejaučia. Ligos simptomai atsiranda tik esant lokaliai išplitusiam vėžiui ar susidarius metastazėms. PV diagnozuojamas jau vėlesnėse ligos stadijose, kai vėžys būna pakankamai didelis ir pradeda spausti šlaplę arba šlapimo pūslės kaklelį, kurio metu sutrinka šlapinimasis [12]. Dažniausiai stebimi tokie PV simptomai: stanginimasis šlapinantis, silpna bei nutrūkstama šlapimo srovė, nepilno pasišlapinimo jausmas, dažnas šlapinimasis, naktinis šlapinimasis, hematurija, apetito praradimas, svorio netekimas, jaučiamas skausmas [16, 42, 43]. Priešinė liauka dažnai padidėja dėl dažnai pasitaikančios GPH. Priešinės liaukos padidėjimas ne dėl vėžio, o dėl GPH sukelia nemažai problemų [44]. Tiek vienu, tiek kitu atvejais simptomatika yra labai panaši. Šie simptomai skirstomi į: obstrukcinius, (šlapimo nelaikymas, silpna šlapimo srovė, ilgesnis šlapimo sulaikymas ir įtempimas ir dirginančius (gali pasireikšti dažni ir skubūs dirginantys šlapinimosi simptomai, nikturija) bei kiti nepageidaujami reiškiniai [22, 12].

Navikui progresuojant pacientui gali pasireikšti, tokie simptomai kaip hematospermija ir/arba sumažėjęs ejakuliacinis tūris bei ejakuliacinio kanalo obstrukcija. Taip pat gali būti stebima ir erekcijos disfunkcija, jeigu lokaliai pažeidžiami nervų ir kraujagyslių sistemos ryšiai. Navikui metastazuojant į kaulus pasireiškia skeleto raumenų skausmas [12]. Kaulų metastazės

gali sukelti su skeletu susijusius reiškinius, kaip kaulų lūžius, nugaros smegenų suspaudimą ir mažakraujystę, kurie ne tik padidina skausmą, bet gali ir pakenkti pacientų fiziologiniam funkcionavimui ir su sveikata susijusiai gyvenimo kokybei [45]. Todėl aptikti ir diagnozuoti PV ankstyvose stadijose, prieš pasireiškiant simptomams, tampa didžiuliu iššūkiu [12].

Šiandien aiškių priežasčių kas sukelia PV atsiradimą dar nėra nustatyta, tačiau išskiriami keli rizikos veiksniai, kurie turi įtakos pasireikšti šiai ligai [6]. Šiuos rizikos veiksnius galima suskirstyti į dvi grupes: nepakeičiami veiksniai – įskaitant žinomas genetines mutacijas ar polimorfizmus arba dar nenustatytus specifinius genus ir išoriniai veiksniai – gyvenimo būdo veiksniai, kurie gali būti keičiami [46]. Vienas iš tokių rizikos veiksnių yra vyresnis amžius [47]. Manoma, kad būtent vyresnio amžiaus vyrai turi didesnę tikimybę, kad jiems bus diagnozuotas PV. Ši rizika ypatingai išauga po 50 metų amžiaus [48]. Kitas žinomas rizikos veiksnys – tai teigiama šeimos istorija. Genetika yra ypač svarbi PV vystymuisi [47]. Atlikus tyrimus su dvyniais buvo nustatyta, kad PV šeimos istorijoje, pirmoje vyrų giminaičių kartoje, yra rizikos veiksnys šios ligos vystymuisi; daugiau nei 40% PV atvejų yra paveldima [49, 2]. Todėl vyrai, kurių artimieji sirgo PV, turi didesnę riziką susirgti PV [49, 46]. Tokiems vyrams padidėja agresyvesnės ligos rizika jaunesniame amžiuje [50]. Pastebėta, kad skiriasi tam tikrų etninių grupių sergamumas šia liga. Naujausi tyrimai rodo, kad tautybė yra dar vienas PV rizikos veiksnys [48]. Pavyzdžiui, afroamerikiečiai vyrai, pasižymi didesne rizika susirgti PV lyginant su baltaodžiais vyrais [50, 48]. Tuo tarpu Azijoje vyrai PV serga labai retai ir tai lemia ne tik genetinis jautrumas. Gyvenimo būdo veiksniai, kaip mityba (gyvuliniai riebalai, mėsa, pienas ir pieno produktai), papildų vartojimas (vitaminas D, kalcis), saulės šviesos poveikis, su darbu susijęs cheminis poveikis, rūkymas, nutukimas, alkoholio vartojimas, fizinis aktyvumas, vazektomijos, gali būti susiję su padidėjusia rizika susirgti PV [48]. Taip pat socialiniai ir ekonominiai veiksniai, seksualinis aktyvumas ir lytiškai plintančios šlapimo takų infekcijos gali turėti įtakos išsivystyti PV [48, 46]. Tuo tarpu sojos, kurios sudėtyje yra baltymų ir fitoestrogenų, vartojimas mažina PV vystymąsi. Riziką sirgti PV mažina ir likopenas, kuris yra ryškiai raudonas fitocheminis karotenoidų šeimos atstovas turi stiprių antioksidacinių savybių. Todėl tęsiami tyrimai ir ieškomi kiti rizikos veiksniai, kurie gali būti siejami su tikrosiomis PV atsiradimo priežastimis [48].

1.1.5. Priešinės liaukos vėžio diagnostika ir gydymas

Nors diagnostinės ir terapinės galimybės vis labiau tobulėja, tačiau pacientų išgyvenamumas išlieka vis dar mažas dėl dažno ligos atsinaujinimo, kuris nepastebimas arba pastebimas per vėlavai. Dažnai pacientai, sergantys PV, gydomi tada, kai gydyti visai nereikia, o

pakanka tik stebėti [2, 8]. Šiuo atveju labai svarbu atskirti kliniškai reikšmingą PV nuo kliniškai nereikšmingo [2]. Kadangi kliniškai nereikšmingas PV gali būti apibrėžiamas kaip vėžys, kuris nesukelia pavojaus paciento gyvybei. Tokiems pacientams dažniausiai užtenka tik stebėjimo ir gydymas nėra taikomas [35].

Šiuo metu prieinami pirminiai PV diagnostiniai metodai yra digitalinis rektalinis tyrimas (DRT), biocheminis tyrimas - žymenų panaudojimas (PSA), transrektalinis priešinės liaukos tyrimas ultragarsu (TRUS) ir biopsija [11, 9].

DRT – tai dažniausiai naudojamas diagnostikos įrankis vėžio nustatymui priešinėje liaukoje. Tai įprasta fizinės apžiūros dalis leidžianti pateikti skirtingas priešinės liaukos patikros išvadas [51]. DRT taikomas siekiant ištirti priešinės liaukos būklę, kurios metu atliekama apčiuopa pirštu įvertinant priešinės liaukos tekstūrą bei jos dydį [11]. Ši diagnozavimo procedūra taikoma tiek gerybinėms, tiek piktybinėms ligoms nustatyti [51]. Dažniausiai DRT rezultatai yra vertinami kartu su kitais diagnostikos tyrimų rezultatais, tokiais kaip PSA tyrimas, kurie leidžia geriau įvertinti informaciją apie PV riziką [52].

Šiandien svarbiausias molekulinis kraujo testas, diagnozuojant PV, yra 1970 metais Richard J Ablin atrastas PSA [7]. PSA, dar žinomas kaip žmogaus kalikreinas 3 (hK3). Tai 33 kDa audinių kalikreinių šeimos serino proteazė, kuri pirmą kartą nustatyta priešinės liaukos ekstraktuose. PSA pirmiausia aptiktas žmogaus kraujo serume, o tik vėliau išskirtas iš priešinės liaukos audinio. Didžioji dalis PSA kraujo serume cirkuliuoja prisijungusi prie proteazių slopiklių, tokių kaip α 1-antichimotripsino ir α 2-makroglobulino, o likusi PSA dalis yra nesusijungusi arba laisva. Šį baltymą gamina sveiko, hiperplazavusio ir vėžinio priešinės liaukos audinio ląstelės; tačiau didžiausia jo koncentracija nustatoma pacientams sergantiems GPH [12].

Jau daugiau nei 20 metų, PSA, kaip kraujo žymuo, naudojamas nustatyti PV, o PSA tyrimas iš esmės pakeitė ligos eigą. Priešinės liaukos epitelio ląstelės išskiria PSA, o pacientams sergantiems PV jo sekrecija labai padidėja [8]. Todėl, dėl atliekamo PSA tyrimo ir vis didėjančio visuomenės švietimo, PV dažnai diagnozuojamas pradinėse ligos stadijose [2]. Nors PSA yra specifinis organui, tačiau jis nėra specifinis navikui; PSA koncentracija taip pat dažnai padidėja gerybinių ar uždegiminių procesų metu. Todėl plačiai naudojamas PSA nustatymas kraujyje smarkiai sumažino pacientų sergančių PV mirtingumą, tačiau šio tyrimo nauda, dėl nepakankamo jautrumo ir specifiškumo, išlieka gana prieštaringa [9]. Dėl nedidelio tyrimo specifiškumo, esant padidėjusiai PSA koncentracijai kraujyje, atliekama daug nereikalingų biopsijų ir taikomas nereikalingas gydymas, o tai gali sukelti rimtas komplikacijas [1].

Priešinės liaukos navikai yra nustatomi PSA ir DRT tyrimais, bet diagnozės patvirtinimui yra reikalingas audinio histologinis ištyrimas atliekant priešinės liaukos biopsiją ultragarso kontrolėje [53]. Po DRT ir PSA tyrimų pacientams atliekamas TRUS. TRUS taikomas priešinės

liaukos vizualizacijai. Nustačius įtartiną liaukos dalį, imami biopsijos mėginiai. Paprastai renkama 12 mėginių, vertinama pagal Glisono balų sistemą, ir galiausiai nustatoma patikimiausia bei tiksliausia vėžio diagnozė siekiant parinkti tinkamiausią gydymą [11].

PV gydymo parinkimas priklauso nuo pradinės PSA koncentracijos, klinikinės ligos stadijos, Glisono balo, kartu atsižvelgiama ir į paciento amžių [54].

Lokalus PV dažniausiai gydomas chirurgiškai arba taikoma radioterapija, tam tikrais atvejais paskiriamas aktyvus stebėjimas [55]. Aktyvus stebėjimas yra naujas metodas, kai pacientai, kuriems nustatyta minimali liga, yra atidžiai stebimi, o gydyti pradama tik tada, kai liga progresuoja [54]. Tai saugus ir labiausiai tinkamas gydymo metodas vyrams su neagresyvia PV forma [56]. Aktyvus stebėjimas paskiriamas tiems pacientams, kuriems nustatomi tokie rodikliai: mažesnė nei 10 ng/ml PSA koncentracija kraujo serume, biopsinėje medžiagoje nustatomi ne daugiau dviejų teigiamų ląstelės branduolių ir esant Glisono balui iki 6 [54]. Tik tuo atveju, kai lokaliai PV yra reikalingas gydymas, taikoma chirurgija ir apšvita [56]. Nemetastazavusio PV standartinis gydymas yra radikali prostatektomija ar radioterapija [32].

Pacientai, kuriems nustatoma metastazavusi liga taikomas androgenų deprivacijos terapijos (ADT) gydymas [57]. Metastazavusio PV klinikinė eiga daugumai pacientų prasideda kastracijai jautria faze, kuri vidutiniškai trunka tris metus. Šiuo etapu, ligos vystymasis gali būti slopinamas, eliminuojant augimą stimuliuojančio testosterono poveikį chirurgine arba medicinine kastracija. Priešingai nei prieš 10 – 15 metų, dabar pacientams, sergantiems kastracijai atspariu metastazavusiu PV, yra žinoma keletas naujų gydymo būdų kaip: naujos hormonų terapijos, chemoterapija, radioizotopai ir imunoterapija [32]. Esant metastazavusiai ligai, chemoterapija, kaip pradinis gydymas, prailgina pacientų išgyvenamumą, palyginti su vien tik taikoma ADT [56].

1.2. Priešinės liaukos molekuliniai žymenys

Vis dar sudėtinga nustatyti, kuris priešinės liaukos navikas vystysis agresyviau, o kuris progresuos lėčiau. Todėl tyrinėtojų dėmesys nukreiptas į molekulinis žymenis, kurie galėtų padėti diferencijuoti navikus, prognozuoti ligos eigą. Tarp tokių molekulinis žymenų yra *CRISP3*, *MSMB* ir *LMTK2*.

1.2.1. *CRISP3* ir priešinės liaukos vėžys

CRISP3 – cisteinu turtingo sekrecijos baltymo 3 (angl. cysteine-rich secretory protein) genas lokalizuotas 6 chromosomos trumpojo peties 12.3 srityje (6p12.3) [39]. *CRISP3* genas

koduoja 245 aminorūgščių CRISP3 baltymą, kurio molekulinė masė 28 kDa ir kuris dar žinomas kaip SGP28 – 28 kDa specifinis granuliu baltymas (angl. specific granule protein of 28 kDa) [58, 59, 60]. Šis baltymas priklauso didelei cisteinu turtingų sekretinių baltymų (CRISP) šeimai, turinčiai 16 konservatyvių cisteino liekanų, kurios tarpusavyje formuoja vidumolekulinius disulfidinius ryšius [9, 59]. Šių baltymų raiška nustatyta stuburiniuose, vabzdžiuose, augaluose, grybuose bei mielėse [14].

CRISP šeimos (CRISP1, CRISP2, CRISP3) didelė baltymų raiška nustatoma vyrų reprodukcinės sistemos organuose ir imuninės sistemos ląstelėse [9]. Pirmą kartą CRISP3 buvo stebėtas žmogaus neutrofiluose ir tik vėliau nustatyta, kad šis baltymas dideliais kiekiais ekspresuojamas kelių egzokrininių liaukų tokių kaip kasa, seilių liaukos, priešinė liauka ir skirtingų imuninės sistemos ląstelių (neutrofilų, eozinofilų, pre-B ląstelių). CRISP3 nedideliais kiekiais randama sėklidžių prielipe, užkrūčio liaukoje, kiaušidėse, sėklidėse, storosios žarnos ir ašarų liaukose [39, 14]. Neutrofilų ir eozinofilų ląstelių granulėse CRISP3 yra saugomas glikozilintoje arba neglikozilintoje formoje [39].

CRISP3 – užląstelinio matrikso baltymas, kurio raišką organizme reguliuoja androgenai. Šis baltymas dalyvauja onkogenezės procese ir yra svarbus priešinės liaukos vėžio progresavimui [9]. CRISP3 taip pat siejamas su įgimto imuniteto apsaugos bei uždegimo procesais [61]. Manoma, kad CRISP3 baltymo sekrecija organizme vyksta natūraliai dėl šeimininko apsaugos mechanizmų, kurio metu stebimas matrikso persitvarkymo procesas sąlygotas vykstančio proteolizės proceso [39]. Tačiau funkcinis šio baltymo vaidmuo PV vystyme ir progresavime lieka vis dar neaiškus. Manoma, kad CRISP3 vaidina svarbų vaidmenį vėžio vystymesi, per MSMB baltymą, kuris pasižymi proapoptotiniu aktyvumu ir naviko slopinančiu poveikiu PV ląstelių linijose [62]. Tyrimai su priešinės liaukos ląstelių linijomis (PC3, WPE1-NB26 ir LNCaP), kuriose ektopiškai buvo ekspresuojami MSMB ir CRISP3 baltymai atliekant augimo slopinimo tyrimus parodė, kad tiek MSMB, tiek CRISP3 gali specifiškai sukelti augimo slopinimą ląstelių linijose. Nors CRISP3 teigiamų ląstelių linijose augimą slopino MSMB, tačiau nepriklausomai nuo to ar buvo nustatomas MSMB, tai neturėjo įtakos CRISP3 sukeliama augimo slopinimui. Tai rodo, kad CRISP3 gali dalyvauti priešinės liaukos tumorogenezės procese nepriklausomai nuo MSMB [58].

CRISP šeimos baltymai (CRISP2 ir CRISP3) sąveikauja su MSMB ir formuoja baltymų kompleksus [62, 61]. CRISP3 sąveikauja su dimeriniu MSMB baltymu sėklinėje plazmoje, kur MSMB baltymo koncentracija yra kelis kartus didesnė lyginant su CRISP3 baltymo koncentracija. Nustatyta, kad tik viena MSMB dimerinės molekulės grandinė jungiasi su CRISP3. Teigiama, kad tiek MSMB, tiek CRISP baltymai yra evoliuciškai konservatyvūs įvairiose gyvūnų rūšyse, o jų sąveika yra svarbi fiziologiniam palaikymui. Šių baltymų sąveika

pasižymi slopinančiuoju poveikiu jonų kanalų reguliacijai [61]. Kadangi MSMB raiška yra stipriai sumažėjusi sergant PV, tai PV progresavimą gali labai paveikti nesusijungęs CRISP3 baltymo kiekis [62]. Todėl padidėjusi CRISP3 baltymo raiška ir kartu sumažėjusi MSMB baltymo raiška gali būti susiję su sustiprėjusiu įgimtu imunitetu PV ląstelėse [61].

Al Bashir ir bendraautoriai atlikę imunohistocheminius tyrimus nustatė, kad CRISP3 baltymo kiekis ženkliai didesnis vėžinėse priešinės liaukos epitelinėse ląstelėse, lyginant su gerybinėmis priešinės liaukos ląstelėmis [14]. Taip pat duomenys rodo, kad CRISP3 baltymo raiška šlapime yra daug didesnė tiems pacientams, kurie serga PV lyginant su pacientais, kuriems nustatyta aukšto laipsnio PIN ir GPH. [9]. Kosari ir bendraautoriai atlikę *in situ* hibridizaciją nustatė, kad ne tik baltymo, bet ir *CRISP3* mRNR raiška navike padidėja sergant PV lyginant su gerybiniais priešinės liaukos audiniais. Ernst ir bendraautoriai parodė, kad didžioji dalis *CRISP3* mRNR randama priešinės liaukos epitelyje, o ne aplinkiniuose stromos audiniuose [14]. Todėl *CRISP3* mRNR raiška gana specifinė priešinės liaukos epitelinėms ląstelėms ir yra stipriai reguliuojama priešinės liaukos audinyje [9].

Didelė CRISP3 raiška yra susijusi su padidėjusia naviko atsinaujinimo rizika, agresyvesniu priešinės liaukos naviko fenotipu, atsparumu PV chirurginei kastracijai ir tolimųjų metastazių atsiradimu [9]. Didelė *CRISP3* raiška kraujyje yra statistiškai reikšmingai susijusi su mažesniu išgyvenamumu pacientams su metastazavusiu KAPV [63]. Remiantis literatūroje pateikiamais duomenimis CRISP3 raiška yra susijusi su klinicine ligos eiga ir naviko agresyvumu pacientams sergantiems PV. Didelė CRISP3 raiška dažniau nustatoma pacientams su aukštesniu Glisono balu [62]. *CRISP3* mRNR raiška gali padidėti 50-300 kartų priešinės liaukos epitelinėse ląstelėse lyginant su sveikomis ląstelėmis esant Glisono balui 6 [61]. Nors *CRISP3/CRISP3* raiška yra susijusi su aukštesniu Glisono PV laipsniu, tačiau yra tyrimų, kuriuose sąsajos tarp CRISP3 raiškos ir aukštesnio Glisono balo naviko audiniuose nenustatyta. Pavyzdžiui, Al Bashir ir bendraautoriai nenustatė sąsajos tarp CRISP3 baltymo raiškos navike ir Glisono balo. Tyrime buvo parodyta, kad 36% pacientų didelė CRISP3 raiška nustatyta, esant $GB < 7$ ir 35,8 %, esant $GB \geq 7$ [14]. Literatūroje CRISP3 raiška priešinės liaukos navike yra siejama su pažengusia ligos stadija. CRISP3 baltymo raiška dažniau nustatoma sergantiejiems trečios stadijos liga negu sergantiejiems antros stadijos liga. Noh ir bendraautorių tyrime didelė CRISP3 baltymo raiška dažniau nustatyta pacientams (76,7%) sergantiems trečia ligos stadija negu sergantiejiems antra ligos stadija (50,0%) [39].

Literatūroje pateikiami duomenys, kad padidėjusi CRISP3 baltymo raiška yra susijusi su įvykusi *ERG* (angl. transcriptional regulator ERG) geno persitvarkymu ir *PTEN* (angl. phosphatase and tensin homolog) geno delecija pacientams sergantiems PV lyginant su gerybiniais priešinės liaukos audiniais [14]. CRISP3 ir PTEN yra tiesiogiai kontroliuojami

transkripcijos veiksnio *ERG*, o didelė *CRISP3* raiška ir *PTEN* geno įvykusi delecija yra laikomi nepageidaujamais PV rodikliais [39]. Al Bashir ir bendraautorių tyrime didelė *CRISP3* baltymo raiška navike stebėta 69% pacientų, kuriems buvo nustatytas įvykęs *ERG* geno persitvarkymas lyginant su pacientais, kuriems *ERG* geno persitvarkymo nebuvo nustatyta. Taip pat nustatyta sąsaja tarp *CRISP3* baltymo raiškos ir įvykusios *PTEN* geno delecijos, kuri identifikuota 71% PV sergančiųjų pacientų [14].

1.2.2. *LMTK2* ir priešinės liaukos vėžys

LMTK2 – lemuro tirozino kinazės 2 (angl. lemur tyrosine kinase 2) genas lokalizuotas 7 chromosomos ilgojo peties 21.3 srityje (7q21.3) [49]. *LMTK2* genas koduoja 1503 aminorūgščių tirozino kinazės baltymą, kurio molekulinė masė 250 kDa [64, 65]. Šis baltymas priklauso su membrana susijusių lemurų kinazių šeimai (*LMTK1A*, *LMTK1B* ir *LMTK3*) [64, 49]. Buvo manyta, kad *LMTK2* yra dviguba tirozino-serino/treonino kinazė, remiantis jos kinazės domeno sekos panašumu su kitomis tirozino kinazėmis. Tačiau lemuro tirozino kinazės pavadinimas neatspindi kinazės kaip baltymo savybių [64]. Nors klasifikuojama kaip tirozino kinazė, tačiau nustatyta, kad *LMTK2* fosforilina tik serino ar treonino liekanas baltymų substratuose [19].

LMTK2 yra struktūriškai aktyvi kinazė, kuri tandemiškai įsitvirtinusi membranoje savo amino galo transmembraniniu domenu taip, kad jos amino ir karboksi galai nukreipti į ląstelės citoplazmą. *LMTK2* baltyme išskiriamas transmembraninis domenas, baltymo amino gale esantis kinazės domenas ir ilga baltymo karboksi gale esanti „uodega“ [64, 65]. Stebima didelė šio baltymo raiška smegenyse; *LMTK2* daugiausiai nustatoma hipokampe ir smegenų žievėje. Neuronuose *LMTK2* yra randama ląstelės kūne, išilgai aksonų ir aksonų galų spurguose. Ląstelėse dalis *LMTK2* nustatoma Goldžio aparate ir ankstyvose endosomose [64]. Daugiausiai *LMTK2* aptinkama endosomų membranose, tačiau šie baltymai gali būti randami ir branduolyje [65]. *LMTK2* gausiai ekspresuojama per pirmas dvi – tris postnatalines savaites ir tai rodo *LMTK2* svarbą postnataliniame neuronų vystymėsi [64].

LMTK2 atrasta visai neseniai ir atkreipiamas vis didesnis dėmesys į šio baltymo vaidmenį fiziologiniuose procesuose [19]. *LMTK2* funkcijos nėra gerai žinomos, manoma, kad *LMTK2* dalyvauja neuronų augimo ir vystymosi procesuose, neuronų aksonų transporte, ląstelių vezikulių susipakavime ir apoptozės procesuose bei pasižymi kinaziniu aktyvumu [64, 65]. *LMTK2* raiškos pokyčiai gali lemti neronų sinapsėje vykstančius sutrikusius reguliacinius procesus. Nustatyti trys nuo *LMTK2* priklausomi mechanizmai, kurie sukelia neurodegeneracijos proceso išsivystymą – tai sutrikęs transportas neuronų aksonuose,

hiperfosforilizacija ir sustiprėjusia apoptozė [64]. LMTK2 neigiamai sąveikauja su cdk5/p35 (angl. cyclin-dependent kinase 5) kompleksu, kuris svarbus ląstelių ciklo progresavimui bei dalyvauja įvairiose kitose ląstelės reguliacijos funkcijose [5]. LMTK2 taip pat yra susijęs su NGF (angl. nerve growth factor) signaliniu keliu, kur jis neigiamai reguliuoja neuronų diferenciaciją [65]. Naujausi tyrimai parodė, kad LMTK2 gali sąveikauti su mioziniu IV, kuris reguliuoja PSA ir VEGF (angl. vascular endothelial growth factor) baltymų raišką, kurie yra susiję su tumorogenezės procesu [49]. Yra žinoma keletas žmogaus ligų susijusių su LMTK2 aktyvumu, kaip cistinė fibrozė ir PV [65]. Be to, pelių modelinėse sistemose (Tau P301L) buvo parodyta, kad *LMTK2* raiškos sumažėjimas yra stebimas Alzheimerio ligos metu smegenų žievėje ir hipokampe [64].

LMTK2 neigiamai sąveikauja su tam tikrais baltymais kaip PP1C (angl. protein phosphatase-1) ir Inh2 (angl. Inhibitor-2), kurie įeina į baltymų komplekso sudėtį, kuris reguliuoja centromerų atsiskyrimą mitozės metu ir yra svarbus ląstelių dalijimuisi [5]. Parodyta, kad LMTK2 reguliuodama PP1C fosfatazės aktyvumą slopina šio baltymo veiklą centrinėje nervų sistemoje ir taip neigiamai reguliuoja AR transkripcijos veiklą [19, 31]. LMTK2 fosforilina PP1C baltymą ir lemia PP1C fosfatazės aktyvumo sumažėjimą [64]. Dėl sumažėjusios PP1C fosfatazės aktyvumo, PP1C baltymas neatlieka AR defosforilinimo reakcijos, kuri yra svarbi branduolio AR aktyvumui. Keliama hipotezė, kad sumažėjus LMTK2 baltymo raiškai ir/arba jo aktyvumui padidinamas AR aktyvumas ir jautrumas androgenams. Priešingai, didelė *LMTK2* raiška sumažina AR aktyvumą [31].

Parodyta, kad *LMTK2* geno išjungimas PV ląstelių linijose lemia padidėjusią nuo androgenų priklausomų genų raišką [31].

LMTK2 baltymo raiškos sumažėjimas, pacientams sergantiems PV, ne tik padidina nuo androgenų priklausomą AR aktyvumą, bet ir padidina nuo androgenų nepriklausomą AR aktyvumą [31]. LMTK2 sąveikauja su AR ląstelių citoplazmoje, kuriuose yra randama androgenų. Tokia sąveika taip pat nustatyta ir ląstelių branduolyje, kuriame nėra androgenų, kas rodo, kad LMTK2 sąveikauja su AR, nepriklausomai nuo to ar yra androgenų poveikis [19]. Parodyta, kad priešinės liaukos epitelio ląstelėse LMTK2 gali tiesiogiai jungtis su AR ir neigiamai reguliuoti AR aktyvumą. LMTK2 tiesiogiai fosforilina AR ir lemia padidėjusį AR transkripcijos aktyvumą nepriklausomai nuo to ar yra nustatomas androgenų poveikis [31]. Atliktų tyrimų metu parodyta, kad padidinus LMTK2 aktyvumą pacientams sergantiems PV ir KAPV gali sumažinti AR proliferacinį aktyvumą [19]. *LMTK2* išjungimas PV ląstelėse padidina tumorogeniškumą esant ir nesant androgenams. Todėl manoma, kad *LMTK2* yra naujas, priešinės liaukos epitelio, AR reguliatorius [31].

LMTK2 dalyvauja priešinės liaukos navikų patogenezės ir progresavimo procesuose. Sumažėjusi *LMTK2* mRNR raiška siejama su padidėjusia rizika susirgti PV [31, 49]. Maža *LMTK2* mRNR ir baltymo raiška nustatyta priešinės liaukos navike palyginus su sveiku ar GPH audiniu [19, 49]. Harries ir bendraautoriai tyrime PV pacientams yra stebėta net 68% mažesnė *LMTK2* mRNR raiška navikinėse ląstelėse lyginant su GPH ląstelėmis [5]. Viso genomo asociacijos tyrimai nustatė, kad *LMTK2* geno 9 introno rs6465657 polimorfizmas yra susijęs maža *LMTK2* raiška ir PV rizika. Manoma, kad rs6465657 C alelis gali būti susijęs su *LMTK2* funkcijos praradimu [49]. Sumažėjusi *LMTK2* raiška lemia padidėjusią priešinės liaukos ląstelių proliferaciją [31]. Parodyta, kad *LMTK2* išjungimas yra susijęs su padidėjusia ląstelių proliferacija ir naviko formavimusi priešinės liaukos adenokarcinomos ląstelių linijoje (LNCaP ląstelės) [49]. Nors yra tyrimų, kuriuose teigiama, kad sąsajos tarp sumažėjusios *LMTK2* baltymų raiškos ir PV nenustatyta [31].

1.2.3. *MSMB* ir priešinės liaukos vėžys

MSMB – mikrosemino baltymo beta (angl. microseminoprotein- β) genas lokalizuotas 10 chromosomos ilgojo peties 11.2 srityje (10q11.2) [1]. *MSMB* genas koduoja 94 aminorūgščių ilgio *MSMB* baltymą, kurio molekulinė masė 16 kDa ir kuris dar žinomas kaip PSP94 -priešinės liaukos sekrecijos baltymas 94 (angl. prostate secretory protein of 94 amino acids) [6, 23]. *MSMB* baltymas priklauso imunoglobulinus sujungiančių veiksnių šeimai [15]. Tai dimerinės struktūros molekulė turinti penkias disulfidines jungtis [61].

1980 metais dvi nepriklausomos tyrėjų grupės nustatė *MSMB* baltymą vyrų sėkloje. Vieni tyrėjai pastebėjo, kad *MSMB* baltymas slopina folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) sekreciją, todėl nusprendė, kad *MSMB* yra inhibinas, ir pavadino jį β -inhibinu. Tačiau buvo parodyta, kad FSH slopinimas nėra atkuriamas, ir šį baltymą pervadino priešinės liaukos sekrecijos baltymu 94. Tuo tarpu, antroji tyrėjų grupė nustatė, kad *MSMB* baltymai padengia spermatozoidų paviršių, kas yra labai svarbu vyrų reprodukcinės funkcijos palaikymui, todėl šį baltymą pavadino β -mikroseminobaltymu (β -MSP, MSP arba *MSMB*) [15].

MSMB yra vienas iš trijų pagrindinių baltymų, kurį kartu su PSA ir priešinės liaukos rūgšties fosfataze (PAP) sekretuoja priešinės liaukos epitelio ląstelės į vyrų sėklą [1, 6]. *MSMB* nėra specifinis priešinei liaukai, tačiau šio baltymo raiška vyksta joje. Paprastai *MSMB* ir PSA baltymai randami priešinės liaukos latakuose iš kur jie patenka tiesiai į kraujotaką. Nepastovus šių baltymų kiekis kraujyje rodo, kad *MSMB* ir PSA baltymų sekrecija gali kisti [61].

MSMB dalyvauja imuninės sistemos reguliacijos procesuose ir kontroliuoja PV vystymąsi, t.y. yra susijęs su vėžio slopinimo procesais. MSMB yra neutrofilų aktyvatorius ir NK ląstelių (natūralių žudikių) mediatorius. Slopina matrikso metaloproteinazių sekreciją. MSMB sąveikauja su Nustatytos stabilios disulfidinės jungtys, per kurias MSMB kraujyje jungiasi su imunoglobulinu G (IgG) ir CRISP šeimos (CRISP1, CRISP2, CRISP3) baltymais; MSMB baltymas sąveikauja su IgG ir taip kontroliuoja IgG aktyvuotą imuninitetą; MSMB baltymas sąveikauja su CRISP3 ir reguliacija jonų kanalų veikimą bei pasižymi slopinančiu poveikiu įgimtam imunitetui [61]. Manoma, kad MSMB baltymas pasižymi stipriomis naviko augimo slopinimo ir apoptozės savybėmis vėžinėms ląstelėms priešinės liaukos epitelyje [15]. Parodyta, kad didelė MSMB baltymo raiška gali ne tik sukelti PV ląstelių apoptozę ir slopinti PV augimą, bet ir slopinti PV invazyvumą bei metastazių formavimąsi [6]. Tyrėjų atlikti *in vitro* tyrimai žmogaus PV ląstelių linijose (PC3, LNCaP, WPE1-NB26 ląstelės) ir *in vivo* graužikų modelinėse sistemose nustatė, kad žmogaus MSMB baltymas sumažino mikrokraujagyslių tankį, eksperimentines skeleto metastazes bei slopino nuo matrikso metaloproteinazės (MMP-9) priklausomą metastazių formavimąsi [15, 61].

MSMB baltymo raiška priešinės liaukos sveikame ir gerybinės hiperplazijos audinyje yra padidėjusi, tuo tarpu PV audinyje – labai nedidelė arba jos neidentifikuojama [1, 23]. MSMB baltymo koncentracija kraujo serume ir šlapime yra mažesnė pas PV pacientus, palyginus su sveikais asmenimis [1]. MSMB raiška sumažėja arba tiesiog raiška nebevyksta metastazavusiame PV lyginant su pirminėmis PV ligomis. Maža *MSMB* mRNR raiška nustatyta PV metastazėse, palyginti su pirminiais priešinės liaukos navikais, o maža MSMB baltymo raiška priešinėje liaukoje yra susijusi su didesne PV atsinaujinimo ir metastazių tikimybe [15, 61]. Didelė MSMB raiška stebima gerybiniame priešinės liaukos audinyje, leidžia manyti, kad MSMB pasižymi naviką slopinančiu poveikiu [1].

Maža *MSMB* mRNR ir baltymo raiška stebima sergant pažengusiomis PV ligos stadijomis bei esant didesniai Glisono balui. Literatūros duomenimis stebima koreliacija tarp MSMB baltymo raiškos priešinės liaukos navikiniame audinyje ir Glisono balo [1]. Parodyta, kad MSMB raiška priešinės liaukos piktybinio naviko ląstelėse susijusi su naviko diferenciacijos laipsniu, t.y. geresnės diferenciacijos navikuose esant mažesniai Glisono balui <7 dažniau nustatoma didelė MSMB raiška [61]. Literatūroje stebima sąsaja tarp MSMB baltymo raiškos kraujo serume ir ligos stadijos. Sjöblom ir bendraautorių tyrime PV sergantiems pacientams didelė MSMB baltymo raiška buvo dažniau nustatyta esant antrai ligos stadijai negu sergantiesiems trečia ligos stadija, o tai rodo, kas sumažėjusi MSMB baltymo raiška dažniau stebima esant pažengusiai ligos stadijai [1].

Literatūroje pateikiama, kad *MSMB* raiškos reguliacija yra priklausoma nuo androgenų. Dahlman ir bandraautorai parodė, kad stebima sumažėjusi *MSMB* mRNR ir baltymo raiška pacientams, kuriems buvo taikoma ADT. Tačiau duomenys kontraversiški, kadangi kiti tyrėjai teigia, kad *MSMB* raiškos pokyčiams androgenai įtakos neturi. Manoma, kad EZH2 (angl. enhancer of zeste homologue-2), genų raiškos epigenetinis slopiklis, slopina *MSMB* raišką pažengusiose PV ligos stadijose [1].

1.2.4. *MSMB* geno mutacija ir priešinės liaukos vėžio rizika

Kiekvienais metais pastebimas vis didėjantis naujų tyrimų, susijusių su *MSMB* geno mutacijomis, kurios manoma gali turėti įtakos navikinio proceso raidai, skaičius [15]. Neseniai sukurtos pažangios didelio našumo sekoskaitos technologijos, viso genomo asociacijos ir replikacijos tyrimai, leido identifikuoti mažiausiai 77 genetinius lokusus, susijusius su PV [49]. Tokie genetiniai tyrimai leidžia tiksliau sekti sergančiuosius PV, įvertinti vėžio riziką sveikiems vyrams, nustatyti naujus žymenis ir pažvelgti į PV etiologiją [15].

Atlikus viso genomo asociacijos tyrimus nustatytas *MSMB* geno promotorinėje sekoje esantis rizikos alelis rs10993994 (g.-57C>T), siejamas su PV rizika [66]. Rs10993994 polimorfizmas, proksimaliniame promotoriaus regione, yra nutolęs 57 bp prieš srovę nuo pirmo *MSMB* geno egzono [15]. *MSMB* geno promotorinėje sekoje, -57 pozicijoje, galima citozino pakaita į timidiną (-57C/T) [66].

Rs10993994 polimorfizmas yra galimoje transkripcijos veiksnio CREB (angl. cAMP response element-binding protein) jungimosi srityje. Rs10993994 pozicijoje įvykusi C alelio pakaita į T alelį yra svarbi CREB transkripcijos veiksnio susirišimui, todėl manoma, kad būtent C alelis (mažos rizikos alelis) turi pirmumo teisę jungtis su CREB transkripcijos veiksniu, ir tai lemia padidėjusią *MSMB* geno raišką naviko ląstelėse [67]. Rs10993994 pozicijoje esantis T alelis lemia *MSMB* promotoriaus aktyvumo sumažėjimą iki 13% palyginus su C aleliu. Kadangi rs10993994 VNP yra CREB transkripcijos veiksnio jungimosi srityje, daroma prielaida, kad *MSMB* promotoriaus aktyvumo sumažėjimas gali būti susijęs su nedideliu DNR afiniškumo sumažėjimu CREB aktyvacijos kaskadai, pavyzdžiui, baltymo kinazės A (PKA) fosforilinimui [66]. Tuo tarpu, CREB transkripcijos veiksnys su *MSMB* geno promotoriumi jungiasi daug sunkiau, kai rs10993994 pozicijoje nustatomas T alelis (didelės rizikos alelis) [67]. Parodyta, kad *MSMB* geno rs10993994 polimorfizmo T alelis lemia mažesnę *MSMB* baltymo raišką ir yra susijęs su padidėjusia PV vystymosi rizika (maždaug 25% vienam T aleliui), palyginti su C

alelių. Priklausomai nuo *MSMB* raiškos tarp skirtingų rs10993994 polimorfizmo genotipo variantų, jo vaidmuo yra apsauginis. Mažos rizikos rs10993994 C alelių nešiotojai turi didžiausią *MSMB* geno promotoriaus aktyvumą bei didžiausią MSMB baltymo koncentraciją kraujyje, šlapime ir sėklinėje plazmoje, o tai rodo, kad didelė MSMB raiška gali sumažinti PV atsiradimo riziką [15]. Tad tyrimai rodo, kad maža MSMB baltymo raiška yra susijusi su PV vystymusi, o *MSMB* geno rs10993994 polimorfizmas atlieka svarbų vaidmenį PV patogenezėje [6, 67].

MSMB geno rs10993994 polimorfizmas yra susijęs su padidėjusia rizika sirgti PV. Atlikti tyrimai rodo, kad rs10993994 polimorfizmo rizikos alelis turi įtakos sumažėjusiai *MSMB* mRNR bei baltymo raiškai priešinės liaukos audinyje ir MSMB baltymo raiškai kraujo serume [1, 6]. Mažesnė MSMB baltymo raiška kraujo serume stebima tiems pacientams, kuriems nustatyti CT ir TT genotipai palyginus su turinčiais CC genotipą pacientais [67]. T alelis siejamas su mažesne *MSMB* geno transkripcijos bei MSMB baltymo raiška tiek sveikame tiek navikiniame, priešinės liaukos audinyje [50]. Sjöblom ir bendraautoriai nustatė stiprų ryšį tarp TT genotipo ir mažos MSMB baltymo raiškos kraujo serume pacientams sergantiems PV bei sveikiems asmenims [1]. TT genotipas lemia mažesnę *MSMB* mRNR raišką pacientams sergantiems GPH. Nustatyta teigiama koreliacija tarp *MSMB* mRNR ir MSMB baltymo raiškos kraujo serume pacientams su GPH [66]. Keliamą hipotezę, kad CC homozigotai turi mažiausią riziką susirgti PV, CT heterozigotai – vidutinę, o TT homozigotai – didžiausią riziką susirgti PV [15].

Tačiau yra tyrimų, kuriuose teigiama, kad nėra sąsajos tarp *MSMB* rs10993994 polimorfizmo ir padidėjusios PV rizikos [6]. Remiantis kitų tyrimų duomenimis, sąsajos tarp rs10993994 genotipo ir vėžio rizikos nebuvo nustatyta, nors TT genotipo dažnis PV sergantiems pacientams buvo didesnis, palyginti su sveikais asmenimis [1].

TT genotipas yra susijęs ne tik su padidėjusia PV rizika, bet ir agresyvesne vėžio forma. Mhatre ir bendraautoriai savo tyrime parodė, kad iš vienuolikos sergančių PV pacientų, kuriems buvo nustatytas TT genotipas, aštuoniems šių pacientų Glisono balas buvo >7 , o tai rodo, kad TT genotipas lemia ne tik mažesnę MSMB baltymo raišką, bet yra svarbus vystantis agresyvesnei vėžio formai. Kitiems trims pacientams sergantiems PV, kuriems buvo nustatytas CC genotipas, Glisono balas buvo ≤ 7 , o tai rodo, kad CC genotipas lemia ne tik didelę MSMB baltymo raišką, bet ir atspindi ne tokį agresyvų vėžį. Panašūs rezultatai gauti ir su Kinijos Han populiacija, kurioje nustatyta, kad T alelis asmenims su Glisono balu >7 atspindi agresyvesnę PV [66]. Priešingai, Kader ir bendraautoriai nustatė, kad *MSMB* geno rs10993994 polimorfizmo T alelis yra susijęs su mažiau agresyviu PV ir mažesniu Glisono balu [68].

Nustatyta *MSMB* geno rs10993994 polimorfizmo sąsaja su ligos stadija bei reikšmingo skirtumo tarp PV agresyvumo ir pažengusios naviko stadijos [68].

Stebima sąsaja tarp rs10993994 polimorfizmo ir PSA koncentracijos kraujo serume. Xu ir bendraautoriai tyrė *MSMB* geno rs10993994 polimorfizmo ryšį su PSA koncentracija kraujo serume ir vyrų sėkloje. Tyrimo metu buvo nustatyta koreliacija tarp sveikų Švedijos vyrų *MSMB* geno rs10993994 VNP ir PSA koncentracijos kraujyje ir vyrų sėkloje. Parodytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp rs10993994 polimorfizmo ir laisvo bei bendro PSA koncentracijos. Rs10993994 polimorfizmo T rizikos alelis dažniau nustatytas esant didelei laisvo ir bendro PSA koncentracijai kraujyje [69].

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Prospektyvinis, stebimasis tyrimas atliktas pacientams, kuriems buvo įtariamas PV. Vilniaus regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas pritarė biomedicininis tyrimų vykdymui, leidimo atlikti biomedicininį tyrimą Nr. 158200-16-842-348 (2016-04-12). Pacientai tyrime dalyvavo penkias savaites, kurių metu numatyti penki vizitai. Visi tirti asmenys supažindinti su tyrimu ir savo parašu patvirtino dalyvavimą jame. Buvo tiriamas pacientų kraujas likęs po visų privalomų tyrimų. Sergančiųjų PV kraujyje buvo tirta *CRISP3*, *MSMB* ir *LMTK2* genų raiška bei įvertintas *MSMB* geno (-57 C/T) polimorfizmas. Kliniškai reikšmingo/nereikšmingo priešinės liaukos vėžio histologiniam verifikavimui pacientai stacionarizuoti Nacionalinio Vėžio Instituto Onkourologijos skyriuje transperinealinei priešinės liaukos biopsijai. Tyrimo metu įvertinti priešinės liaukos biopsijos duomenys ir nuspręsta dėl tolimesnio paciento stebėjimo (kliniškai nereikšmingas vėžys) ar gydymo (kliniškai reikšmingas vėžys) taktikos.

Į tyrimą įtraukti 193 vyrai, kuriems buvo diagnozuotas PV. Vidutinis pacientų amžius tyrimo metu buvo $62,57 \pm 5,956$ metų, iš kurių jauniausiam pacientui – 47 metai, o vyriausiam – 75 metai, pagal medianą pacientai suskirstyti į dvi amžiaus grupes (47-63 metai ir 64-75 metai).

Visi pacientai suskirstyti į dvi grupes priklausomai nuo PSA koncentracijos kraujo serume prieš ir po priešinės liaukos transperinealinės biopsijos; į dvi grupes priklausomai nuo PV ligą lydinčio uždegimo; į dvi grupes priklausomai nuo PV ligą lydinčios GPH; į dvi grupes priklausomai nuo PV histologinio verifikavimo. Pacientų amžius ir klinikinės – patologinės charakteristikos pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Pacientų, sergančių PV, pasiskirstymas pagal amžių ir klinikines – patologines charakteristikas

Parametras	Pacientai, n (%)
Amžiaus grupė: 47-63 metai 64-75 metai	107 (55,4%) 86 (44,6%)
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją (ng/ml): ≤10 >10	178 (92,2%) 15 (7,8%)
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos (ng/ml): ≤10 >10	136 (70,5%) 57 (29,5%)
Uždegimas: nustatytas nenustatytas	68 (35,2%) 125 (64,8%)
GPH: nustatyta nenustatyta	115 (59,6%) 78 (40,4%)
Priešinės liaukos vėžys kliniškai reikšmingas kliniškai nereikšmingas	53 (27,5%) 140 (72,5%)

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas; GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija

Kontrolinę grupę sudarė 20 sveikų vyrų kraujo ėminiai. Vidutinis vyrų amžius tyrimo metu buvo $65,10 \pm 6,711$ metų (jauniausias – 54 metų, vyriausias – 79 metų).

2.2. Genų raiškos nustatymas

CRISP3, *MSMB* ir *LMTK2* genų raiškos nustatymą sudarė trys etapai: RNR gryninimas iš kraujo, kopijinės deoksiribonukleorūgšties (kDNR) sintezė ir tikrojo laiko polimerazės grandininė reakcija (TL-PGR).

2.2.1. RNR gryninimas iš kraujo

Darbo eiga. RNR gryninimui iš kraujo naudotas „QIAamp RNA Blood Mini Kit“ rinkinys („QIAGEN“, Vokietija). RNR gryninimo procedūra atlikta laikantis gamintojo instrukcijos nurodymų. Mėgintuvėlyje 1 ml kraujo sumaišomas su 5 ml EL buferiniu tirpalu ir mišinys inkubuojamas 10-15 min. lede. Po inkubacijos centrifuguojama 400 x g jėga 10 min. 4°C temperatūroje, pašalinamas supernatantas, susidariusios nuosėdos tirpinamos 2 ml EL buferiniu tirpalu ir vėl centrifuguojama 400 x g jėga 10 min. 4°C temperatūroje. Nuosėdos tirpinamos 600 μl RLT buferiniu tirpalu ir centrifuguojama 2 min. maksimaliu greičiu.

QIAshredder kolonėlė pašalinama ir į homogenizuotą lizatą įpilama 70% etanolio tirpalo. Lizatas perpilamas ant QIAamp surinkimo kolonėlės ir centrifuguojama $\geq 8000 \times g$ jėga 15 s. Pripilama 350 μl RW1 buferinio tirpalo, Dnazės I tirpalo ir paliekama 15 min. inkubacijai kambario temperatūroje (20°C - 30°C). Po inkubacijos į kolonėlę pripilama 350 μl RW1 buferinio tirpalo ir centrifuguojama $\geq 8000 \times g$ jėga 15 s. QIAamp kolonėlė perkeliama į naują mikromėgintuvėlį ir pripilama 500 μl RPE buferinio tirpalo. Centrifuguojama 15 s. $\geq 8000 \times g$ jėga. Dar kartą į QIAamp surinkimo kolonėlę įpilamas 500 μl RPE buferinis tirpalas ir centrifuguojama maksimaliu greičiu 3 min. ($20,000 \times g$). Į QIAamp kolonėlę pilama 30 μl vandens be ribonukleazių ir centrifuguojama $\geq 8000 \times g$ jėga 1 min.

Išgrynintos RNR kokybė ir koncentracija nustatyta „NanoDrop 2000c“ spektrofotometru („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva). Visų mėginių absorbcija pamatuota 260 nm ir 280 nm bangų ilgiuose ir įvertintas jų santykis, parodantis išgrynintos RNR švarumą ir priemaišų nebuvimą. Atvirkštinės transkripcijos reakcijai naudoti tik geros kokybės ir švarūs RNR mėginiai.

2.2.2. Kopijinės DNR sintezė

Darbo eiga. kDNR sintezei naudotas komercinis „Tetro cDNA Synthesis Kit“ rinkinys („BIOLINE“, Jungtinė Karalystė). kDNR sintezė atlikta laikantis gamintojo instrukcijos nurodymų vykdant atvirkštinę transkripciją. kDNR reakcijos mišinio sudėtis pateikiama 2 lentelėje. Taip pat atlikta RNR mėginių neigiama kontrolė be atvirkštinės transkriptazės.

2 lentelė. kDNR reakcijos mišinio sudėtis

Reagentas	Kiekis (μl)
RNR	10
Oligo (dT)18 pradmuo (10 μM)	1
dNTP mišinys (10mM)	1
5X RT buferinis tirpalas	4
RiboSafe RNazės slopiklis	1
Tetro atvirkštinė transkriptazė (200 U/ μl)	1
Vanduo be ribonukleazių	2

kDNR reakcija atlikta naudojant prietaisą Thermocycler („SensoQuest labcyler“, Vokietija). Naudota pagausinimo programa, kurioje nustatyti tokie temperatūros parametrai: 30 min. 45°C ir 5 min. 85°C . Gauta kDNR laikoma -20°C temperatūroje iki bus naudojama pagausinimui TL-PGR metodu.

2.2.3. Kiekybinė tikrojo laiko polimerazės grandininė reakcija

Mėginių paruošimas. Genų raiškos tyrimams atlikti buvo naudotas „Kapa SYBR[®] FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal“ rinkinys („KAPA BIOSYSTEMS“, JAV). Kiekybinis *CRISP3*, *LMTK2* ir *MSMB* genų raiškos vertinimas atliktas naudojant fluorescencijos pagrindu paremtą TL-PGR nustatymo metodą. Mėginių išpilstymui naudotos 96 šulinėlių PGR plokštelės. Kiekvienam mėginiui atlikti 3 pakartojimai. *β-aktinas* naudotas kaip endogeninė kontrolė, o įvertinti taršos tikimybę kaip neigiama kontrolė naudotas vanduo.

Tyrimo metu paruošti keturi skirtingi mišiniai kiekvienai pradmenų porai (*CRISP3*, *LMTK2*, *MSMB*, *β-aktinas*). Įprastinė TL-PGR reakcijos mišinio sudėtis pateikiama 3 lentelėje.

3 lentelė. TL-PGR reakcijos mišinio sudėtis

Reagentas	Kiekis (μl)
Kopijinė DNR	2
Kapa mišinys	10
Tiesioginis pradmuo (10 μM)	3
Atvirkštinis pradmuo (10 μM)	3
Vanduo be ribonukleazių	7

Tyrimo naudoti pradmenys pateikiami 4 lentelėje. TL-PGR atlikta naudojant prietaisą Mastercycler[®] ep realplex („Eppendorf“, Vokietija). Naudota pagausinimo programa, kurioje nustatyti tokie temperatūros parametrai:

- 3 min. 95°C temperatūroje - pradinė DNR denatūracija;
- 40 vienodų ciklų:
 - ✓ 3 s. 95°C temperatūroje - DNR denatūracija;
 - ✓ 30 s. 57°C temperatūroje - pradmenų prisijungimas ir grandinės ilginimas.

Ciklų sulaikymo slenkstį programinė įranga nustato automatiškai.

4 lentelė. Tyrimo naudotos TL-PGR pradmenų sekos

Genas	Tiesioginis pradmuo (5'→3')	Atvirkštinis pradmuo (5'→3')
<i>CRISP3</i>	CACAATGAACTGAGGAGAGCAGTATC	TGTCTGTAATTGCACTGGTTTGC
<i>LMTK2</i>	AACTGTGTATCCTGCTGTAAGG	CTGCTGGTGGTGTGAAATCTA
<i>MSMB</i>	AAATTCATGTTGCACCCTTG	CCATTCCTGACAGAACAGGTC
<i>β-aktinas</i>	AACTGGTCTCAAGTCAGTGACAGG	TCCCCAACTTGAGATGTATGAAG

Duomenų analizė. Duomenų apdorojimui naudota Microsoft Excel programa. Gautiems duomenims apdoroti, naudotas rezultatus normalizuojantis, pastovios raiškos genas – β -aktinas. *CRISP3*, *LMTK2* ir *MSMB* genų raiška analizuojamuosiuose mėginiuose įvertinta apskaičiavus tiriamojo geno ciklo pokytį (Δ CT), kaip endogeninę kontrolę panaudojus β -aktino geną ir įvertinus santykinę geno raišką (R). Gauti duomenys apskaičiuoti $2^{-\Delta\Delta$ CT metodu, naudojant formulę: $R=2^{-\Delta\Delta$ CT

$$\Delta$$
CT = CT(tiriamas genas) – CT(β -aktinas)A mėginys*

$$\Delta$$
CT = CT(tiriamas genas) – CT(β -aktinas)B mėginys*

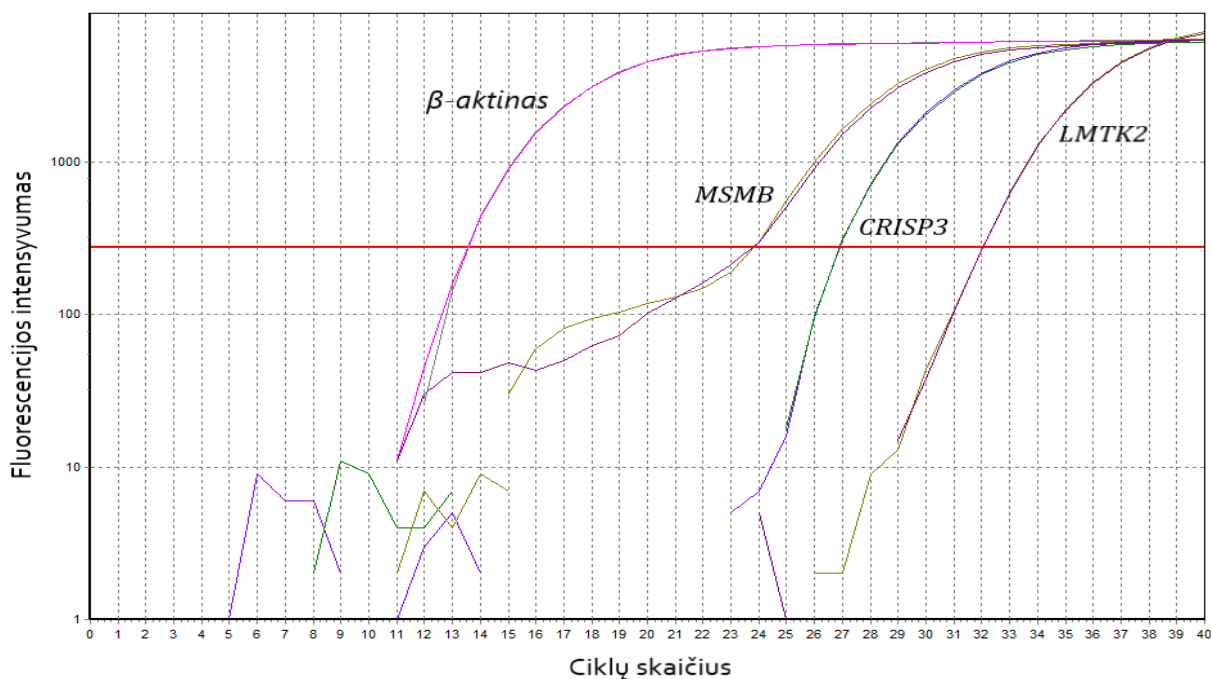
$$\Delta\Delta$$
CT = Δ CT(A mėginys*) – Δ CT(B mėginys*)

*A mėginys – PV sergančių pacientų kraujas;

*B mėginys – kontrolė.

Gautos $\Delta\Delta$ CT reikšmės padalintos į dvi grupes remiantis gautų duomenų mediana.

2 paveiksle pavaizduotas TL-PGR metodu gautas *CRISP3*, *LMTK2*, *MSMB* ir β -aktino raiškos grafikas.



2 pav. Pacientų sergančių PV *CRISP3*, *LMTK2*, *MSMB* ir β -aktino genų raiška kraujyje, gauta TL-PGR metodu

2.3. Vieno nukleotido polimorfizmo nustatymas

MSMB (-57 C/T) polimorfizmas nustatytas trimis etapais: DNR gryninimas iš kraujo, PGR ir pirosekoskaita.

2.3.1. DNR gryninimas iš kraujo

Darbo eiga. DNR gryninimui iš kraujo naudotas „QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)“ rinkinys („QIAGEN“, Vokietija). Darbas atliktas laikantis gamintojo instrukcijos nurodymų. Į 200 µl mikromėgintuvėlį su krauju įpilama 20 µl proteinazės K tirpalo ir 400 µl lizuojančio tirpalo. Mišinys gerai sumaišomas ir inkubuojamas 56°C temperatūroje 10 min. Į gautą mišinį įpilama 200 µl 96% etanolio tirpalo, sumaišoma ir mišinys perkeliamas į „QIAamp Mini column“ mikromėgintuvėlį su kolonėle. Centrifuguojama 6000 x g 1 min. Po centrifugavimo kolonėlė perkeliama į naują mikromėgintuvėlį, o mikromėgintuvėlis su pratekėjusiu filtratu pašalinamas. Pripilama 500 µl Wash Buffer I tirpalo ir centrifuguojama 6000 x g 1 min. Po centrifugavimo mikromėgintuvėlis su filtratu pašalinamas, kolonėlė vėl perkeliama į naują mikromėgintuvėlį, pripilama 500 µl Wash Buffer II tirpalo ir centrifuguojama maksimaliu greičiu 3 min. Pratekėjęs filtratas pašalinamas, kolonėlė perkeliama į naują mikromėgintuvėlį, pripilama 100 µl eliacijos buferinio tirpalo ir inkubuojama 1 min. kambario temperatūroje. Centrifuguojama 6000 x g 1 min.

Išgrynintos DNR kokybė ir koncentracija nustatyta „NanoDrop 2000c“ spektrofotometru („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva). Tikslus DNR kiekis ir grynumas įvertinamas pamatavus DNR tirpalų sugertis 260 nm ir 280 nm bangų ilgiuose. Nustatytas A260/A280 santykis parodė ar DNR yra gryna nuo baltymų ir kitų priemaišų.

2.3.2. Polimerazės grandininė reakcija

Mėginių paruošimas. Iš kraujo išgryninta DNR paruošiama PGR reakcijai. PGR atlikti buvo naudojamas „PyroMark PCR Kit“ rinkinys („QIAGEN“, Vokietija). PGR sintezė atlikta laikantis gamintojo instrukcijos nurodymų. Įprastinė PGR reakcijos mišinio sudėtis pateikta 5 lentelėje. Taip pat įvertinti taršos tikimybę kaip neigiama kontrolė buvo naudotas vanduo.

5 lentelė. PyroMark PGR reakcijos mišinio sudėtis

Reagentas	Kiekis (µl)
DNR	2
2X PyroMark PCR Master mišinys	12,5
10X CoralLoad koncentratas	2,5
Pradmenų tirpalas	2,75
Vanduo be ribonukleazių	5,25

Analizuojamos DNR sekos pagausinimui PGR metodu buvo naudojami pradmenys su prijungtu biotinu žymeniu. Tyrime naudota pradmenų pora nurodyta 6 lentelėje. PGR metodas atliktas naudojant prietaisą Labcycler („SensoQuest“, Vokietija). Naudota pagausinimo programa, kurioje nustatyti tokie temperatūros parametrai:

- 15 min. 95°C temperatūroje - pradinė PGR aktyvacija;
- 45 vienodų ciklų:
 - ✓ 30 s. 94°C temperatūroje - DNR denatūracija;
 - ✓ 30 s. 60°C temperatūroje - pradmenų prisijungimas;
 - ✓ 30 s. 72°C temperatūroje - grandinės ilginimas;
- 10 min. 72°C - galutinis grandinės ilginimas.

6 lentelė. MSMB polimorfizmas ir naudotos pradmenų sekos

Genas	Polimorfizmas	Tiesioginis pradmuo (5'→3')	Atvirkštinis pradmuo (5'→3')
<i>MSMB</i>	c.-57C>T	TCCTTTTGATAGTCAACCCTCTGT	AGGCAAAGCTGCATCAAAT

2.3.3. Pirosekoskaita

Principas. Sekoskaita – tai tiesioginis nukleotidų sekos tyrimo metodas, kurio metu nustatoma pirminė DNR fragmento seka. Prie PGR metodu pagausintos viengrandės DNR sekos hibridizuojami sekvenavimo pradmenys ir tokia matrica inkubuojama su fermentais ir substratais. Pirosekoskaitos metodas paremtas fermento polimerazės veikimu, kuri prijungia mažus kiekius vieno iš dNTP. Jei nukleotidas yra komplementarus bazei esančiai matricos grandinėje, DNR polimerazės jis įjungiamas į DNR grandinę. Tai metodas, kuris matuoja išsiskyrusio neorganinio pirofosfato kiekį, fermentinėmis reakcijomis paversdamas jį į proporcingo ryškumo regimą šviesą. Pagal susidariusią šviesos signalų seką ir intensyvumą sudaroma diagrama, kuri nustato DNR seką.

Mėginių paruošimas. PGR metodu pagausinta DNR naudojama pirosekoskaitos reakcijai. *MSMB* geno polimorfizmo vertinimui buvo naudojamas bioluminescencijos pagrindu paremtas

pirosekoskaitos nustatymo metodas pagal „PyroMark® Q24“ („QIAGEN“, Vokietija) gamintojo instrukciją. *MSMB* geno polimorfizmui nustatyti naudotas PyroMark® Q24 („QIAGEN“, Vokietija) prietaisas. Sekvenuojama *MSMB* geno seka: 5'-TGAC/TGTCGAA TGCGTGGTTGCCCTCTCCA-3'. Kontroliniai DNR mėginiai su žinomais genotipais buvo įtraukti į kiekvieną tyrimą. Taip pat DNR užterštumui įvertinti kaip kontrolė buvo naudojamas vanduo.

Naudota pirosekoskaitos programa:

- PGR produktų imobilizavimas. Pagausintas *MSMB* genas su prijungtu biotinu žymeniu imobilizuojamas ant Sepharose dalelių padengtų streptovidinu. Tam tikslui buvo paruoštas PGR produktų imobilizacijos mišinys, kurio sudėtis pateikiama 7 lentelėje.

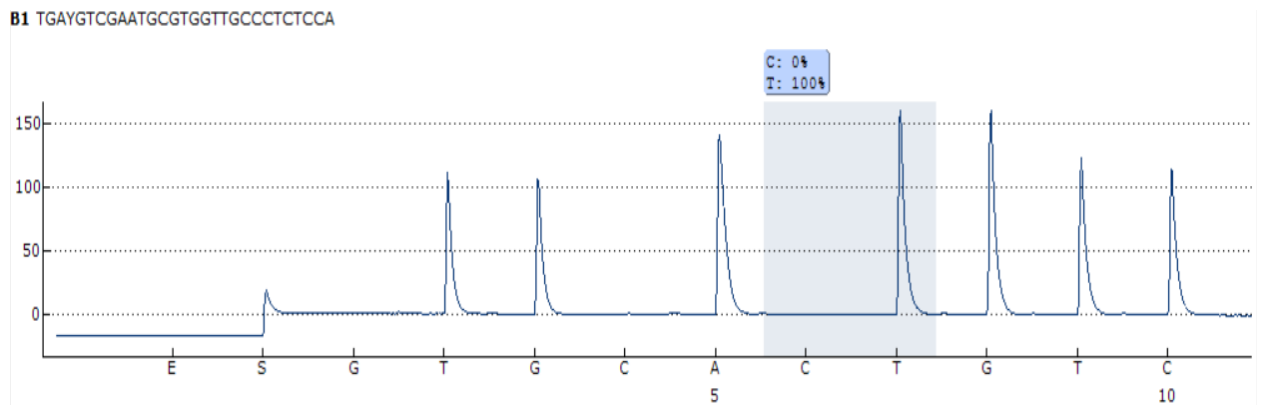
7 lentelė. PGR produktų imobilizacijos reakcijos mišinio sudėtis

Reagentas	Kiekis (µl)
Streptavidin-coated Sepharose [®] dalelės	1
Binding buferinis tirpalas	40
Didelio grynumo vanduo	24

Paruoštas mišinys išpilstytas į PGR plokštelės šulinėlius ir į juos įpilta 15 µl PGR produkto. Naudojant orbitalinę purtyklę PGR plokštelė buvo maišoma 5-10 min. kambario temperatūroje (1400 aps.).

- DNR grandinių atskyrimas ir dalelių su viengrandinėmis DNR patalpinimas į PyroMark Q24 plokštelę. 2,5 µl sekvenavimo pradmenys atskiedžiami 22,5 µl PyroMark Annealing buferiniu tirpalu ir 25 µl mišinys paskleidžiamas PyroMark Q24 plokštelės šulinėliuose. Vakuuminio įrenginio pagalba iš PGR plokštelės dalelės perkeliama į 70 % etanolio tirpalą iš jo į denatūracijos tirpalą ir praplovimo buferinį tirpalą ir galiausiai dalelės perkeltos į plokštelę su sekoskaitos pradmenimis.
- Sekoskaitos pradmenų prijungimas prie DNR grandinių. PyroMark Q24 plokštelė perkeliama į šildančią vonelę 2 min. 80°C temperatūroje. Vėliau plokštelė išimama iš šildančios vonelės ir leidžiama mėginiams atvėsti kambario temperatūroje (15-25°C) mažiausiai 5 min. Atšalusi plokštelė perkeliama į PyroMark Q24 prietaisą, kur atliekamas *MSMB* geno sekos nustatymas.

3 paveiksle pavaizduota pirosekoskaitos metodu gauta, *MSMB* (-57 C/T) geno polimorfizmo, pirograma.



3 pav. *MSMB* (-57 C/T) geno polimorfizmo pirograma kraujyje.

2.4. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta IBM SPSS Statistics 21.0 (*Armonk, NY:IBM Corp, JAV, 2012*) programa. Duomenų normalumui nustatyti buvo naudojamas Šapiro – Vilko testas. Tiriama duomenys pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, kai $p > 0,05$. Kiekybiniams kintamiesiems įvertinti apskaičiuoti aritmetiniai vidurkiai, standartiniai nuokrypiai, mediana, minimalios bei maksimalios reikšmės; kokybiniams kintamiesiems įvertinti apskaičiuoti dažniai ir procentai. Kokybinių kintamųjų tarpusavio priklausomumui vertinti skaičiuotas *chi* kvadrato kriterijus (χ^2) ir Fišerio tikslusis kriterijus (kai nors vienas tikėtinas stebėjimų skaičius mažiau 5). Skirtumai tarp grupių vertinami kaip statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$. Ryšio stiprumui tarp kintamųjų įvertinti buvo skaičiuojamas Spirmeno koreliacijos koeficientas (r_s). Spirmeno koreliacijos koeficientas įgyja reikšmes nuo -1 iki 1; neigiama koreliacija rodo atvirkštinę priklausomybę, teigiama - tiesioginę priklausomybę. Ryšys tarp kintamųjų vertinamas kaip labai silpnas esant koreliacijos koeficientui nuo 0 iki 0,19; kaip silpnas ryšys – nuo 0,20 iki 0,39; kaip vidutinis ryšys – nuo 0,40 iki 0,69; kaip stiprus ryšys – nuo 0,70 iki 0,89; kaip labai stiprus ryšys – nuo 0,90 iki 1. Kuo r reikšmė arčiau 1 ar -1, tuo koreliacija yra stipresnė. Koreliacijos reikšmingumui įvertinti buvo skaičiuojama p reikšmė.

3. DARBO REZULTATAI

Į tyrimą įtraukti 193 pacientai, kurių kraujyje tirta *CRISP3*, *LMTK2* ir *MSMB* genų raiška. Genų raiškos pokyčiai suskirstyti į dvi grupes pagal medianą – mažos ir didelės raiškos grupė (*CRISP3* raiškos mediana kraujyje – 0,484; *LMTK2* raiškos mediana kraujyje – 0,089; *MSMB* raiškos mediana kraujyje – 0,319). Didžiajai daliai pacientų nustatyta didelė *CRISP3* (50,3%), *LMTK2* (50,3%) ir *MSMB* (50,3%) raiška kraujyje.

Pagal amžiaus medianą pacientai buvo suskirstyti į dvi grupes; pagal PSA koncentraciją kraujo serume, prieš ir po transperinealinės priešinės liaukos biopsijos – į dvi grupes; pagal ligą lydintį uždegimą – į dvi grupes; pagal ligą lydinčią GPH - į dvi grupes; pagal priešinės liaukos vėžio histologinį verifikavimą – į dvi grupes.

3.1. *CRISP3* geno raiškos pokyčiai sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje

Maža *CRISP3* geno raiška sergančiųjų PV pacientų kraujyje nustatyta 96 atvejais (49,7%, 95% PI 42,5-56,5), o didelė raiška – 97 atvejais (50,3%, 95% PI 43,5-57,5).

CRISP3 geno raiškos pokyčiai įvertinti priklausomai nuo pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų (8 lent.).

8 lentelė. *CRISP3* geno raiškos analizė kraujyje priklausomai nuo sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų

Parametras	<i>CRISP3</i> raiška kraujyje		P
	maža, n (%)	didelė, n (%)	
Amžiaus grupė:			
47-63 metai	50 (52,1%)	57 (58,8%)	0,351
64-75 metai	46 (47,9%)	40 (41,2%)	
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją (ng/ml):			
≤10	87 (90,6%)	91 (93,8%)	0,408
>10	9 (9,4%)	6 (6,2%)	
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos (ng/ml):			
≤10	60 (62,5%)	76 (78,4%)	0,016
>10	36 (37,5%)	21 (21,6%)	
Uždegimas:			
nustatytas	37 (38,5%)	31 (32,0%)	0,338
nenustatytas	59 (61,5%)	66 (68,0%)	
GPH:			
nustatyta	60 (62,5%)	55 (56,7%)	0,412
nenustatyta	36 (37,5%)	42 (43,3%)	
Priešinės liaukos vėžio diagnozė			
kliniškai reikšmingas	26 (27,1%)	27 (27,8%)	0,907
kliniškai nereikšmingas	70 (72,9%)	70 (72,2%)	

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija

Įvertinus *CRISP3* raiškos pokyčius priklausomai nuo pacientų amžiaus, didelė *CRISP3* raiška kraujyje dažniau nustatyta jaunesnio amžiaus (47-63 metai) pacientams lyginant su vyresnio amžiaus (64-75 metai) pacientais. Palyginus *CRISP3* raiškos pasiskirstymą priklausomai nuo PSA koncentracijos kraujo serume prieš transperinealinės priešinės liaukos biopsiją matyti, kad didelė *CRISP3* raiška dažniau nustatoma pacientams esant 10 ng/ml ir mažesnei PSA koncentracijai kraujo serume. Gautas statistiškai reikšmingas pasiskirstymas tarp *CRISP3* raiškos kraujyje ir pacientų PSA koncentracijos kraujo serume po transperinealinės biopsijos ($p=0,016$) (8 lent.). Iš pateiktų 8 lentelėje duomenų matyti, kad didelė *CRISP3* raiška dažniau nustatyta pacientams esant 10 ng/ml ir mažesnei PSA koncentracijai kraujo serume. *CRISP3* raiška įvertinta priklausomai nuo tokių būklių kaip uždegimas ir GPH. Iš tyrimo duomenų matyti, kad pacientai, kuriems nebuvo nustatytas PV lydintis uždegimas dažniau stebėta didelė *CRISP3* raiška kraujyje, o esant mažai *CRISP3* raiškai kraujyje, PV pacientams, kartu stebėta ligą lydinti GPH. Palyginus *CRISP3* raiškos pokyčius priklausomai nuo priešinės liaukos histologinio verifikavimo matyti, kad maža *CRISP3* raiška rečiau nustatyta esant kliniškai reikšmingam PV.

Atlikus koreliacinę analizę, įvertintas tiriamųjų parametru ryšių stiprumas. 9 lentelėje pateikti *CRISP3* raiškos pokyčių ir pacientų amžiaus, klinikinių – patologinių charakteristikų koreliacinės analizės rezultatai.

9 lentelė. *CRISP3* raiškos kraujyje ir pacientų amžiaus, klinikinių – patologinių charakteristikų koreliacinė analizė

Parametras	<i>CRISP3</i> raiška	
	r_s	p
Amžius	-0,094	0,192
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją	-0,072	0,320
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos	-0,165	0,022
Uždegimas	-0,091	0,210
GPH	-0,044	0,542
Priešinės liaukos vėžio diagnozė	-0,010	0,889

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija, r_s – Spirmeno koreliacijos koeficientas

Iš pateiktų 9 lentelėje duomenų matyti, kad *CRISP3* raiška kraujyje statistiškai reikšmingai neigiamai susijusi su PSA koncentracija kraujo serume po transperinealinės biopsijos ($r_s=-0,165$ $p=0,022$). Kitų statistiškai reikšmingų skirtumų tarp *CRISP3* raiškos kraujyje ir pacientų amžiaus, klinikinių – patologinių charakteristikų nenustatyta.

3.2. *LMTK2* geno raiškos pokyčiai sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje

Maža *LMTK2* geno raiška sergančiųjų PV pacientų kraujyje nustatyta 96 atvejais (49,7%, 95% PI 42,5-56,5), o didelė raiška – 97 atvejais (50,3%, 95% PI 43,5-57,5).

LMTK2 geno raiškos pokyčiai įvertinti priklausomai nuo pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų (10 lent.).

10 lentelė. *LMTK2* geno raiškos kraujyje analizė priklausomai nuo sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų

Parametras	<i>LMTK2</i> raiška kraujyje		p
	maža, n (%)	didelė, n (%)	
Amžiaus grupė: 47-63 metai 64-75 metai	56 (58,3%) 40 (41,7%)	51 (52,6%) 46 (47,4%)	0,421
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją (ng/ml): ≤10 >10	94 (97,9%) 2 (2,1%)	84 (86,6%) 13 (13,4%)	0,003
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos (ng/ml): ≤10 >10	73 (76,0%) 23 (24,0%)	63 (64,9%) 34 (35,1%)	0,091
Uždegimas: nustatytas nenustatytas	35 (36,5%) 61 (63,5%)	33 (34,0%) 64 (66,0%)	0,723
GPH: nustatyta nenustatyta	59 (61,5%) 37 (38,5%)	56 (57,7%) 41 (42,3%)	0,598
Priešinės liaukos vėžio diagnozė kliniškai reikšmingas kliniškai nereikšmingas	25 (26,0%) 71 (74,0%)	28 (28,9%) 69 (71,1%)	0,660

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija

Tyrimo rezultatai rodo, kad maža *LMTK2* raiška kraujyje dažniau nustatyta, jei pacientai yra jaunesnio amžiaus (47-63 metai) palyginus su vyresnio amžiaus (64-75 metai) pacientais. Įvertinus *LMTK2* raišką kraujyje priklausomai nuo pacientų PSA koncentracijos kraujo serume prieš transperinealinę biopsiją, gautas statistiškai reikšmingas pasiskirstymas tarp *LMTK2* raiškos kraujyje ir PSA koncentracijos kraujo serume ($p=0,003$) (10 lent.). Maža *LMTK2* raiška kraujyje dažniau stebėta pacientams esant 10 ng/ml ir mažesnei PSA koncentracijai kraujo serume. Nustatyta statistinė tendencija tarp *LMTK2* raiškos kraujyje ir PSA koncentracijos kraujo serume po biopsijos ($p=0,091$) (10 lent.). Maža *LMTK2* raiška kraujyje dažniau nustatyta tiems pacientams, kuriems po biopsijos stebėta 10 ng/ml ir mažesnė PSA koncentracija kraujo serume. Įvertinus pacientų *LMTK2* raiškos pasiskirstymą kraujyje priklausomai nuo lydinčio

uždegimo, didelė *LMTK2* raiška dažniau nustatyta nesant uždegimui. Palyginus *LMTK2* raiškos pokyčių pasiskirstymą priklausomai nuo ligų lydinčios GPH matyti, kad maža *LMTK2* raiška dažniau nustatyta esant GPH. Įvertinus *LMTK2* raišką priklausomai nuo priešinės liaukos histologinio verifikavimo, iš 10 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad maža *LMTK2* raiška dažniau stebima esant kliniškai nereikšmingam PV.

Toliau 11 lentelėje pateikiami *LMTK2* raiškos ir pacientų amžiaus, klinikinių – pataloginių charakteristikų koreliacinės analizės rezultatai.

11 lentelė. *LMTK2* raiškos kraujyje ir pacientų amžiaus, klinikinių – pataloginių charakteristikų koreliacinė analizė

Parametras	<i>LMTK2</i> raiška	
	r_s	p
Amžius	0,046	0,527
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją	0,196	0,006
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos	0,126	0,080
Uždegimas	-0,011	0,878
GPH	-0,019	0,796
Priešinės liaukos vėžio diagnozė	-0,007	0,922

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija, r_s – Spirmeno koreliacijos koeficientas

Atlikus koreliacinę analizę ir įvertinus *LMTK2* raišką kraujyje priklausomai nuo pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų, statistiškai reikšmingas ryšys gautas tik tarp *LMTK2* raiškos ir PSA koncentracijos kraujo serume prieš priešinės liaukos transperinealinę biopsiją ($r_s=0,196$ $p=0,006$) bei stebima sąsajos tendencija tarp *LMTK2* raiškos ir PSA koncentracijos kraujo serume po biopsijos ($r_s=0,126$ $p=0,080$) (11 lent.).

3.3. *MSMB* geno raiškos pokyčiai sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje

Maža *MSMB* geno raiška sergančiųjų PV pacientų kraujyje nustatyta 96 atvejais (49,7%, 95% PI 42,5-56,5), o didelė raiška – 97 atvejais (50,3%, 95% PI 43,5-57,5).

MSMB geno raiškos pokyčiai įvertinti priklausomai nuo pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų (12 lent.). Iš 12 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad statistiškai reikšmingo pasiskirstymo tarp *MSMB* raiškos ir analizuotų parametru nekonstatuota.

12 lentelė. *MSMB* geno raiškos kraujyje analizė priklausomai nuo sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų

Parametras	<i>MSMB</i> raiška kraujyje		p
	maža, n (%)	didelė, n (%)	
Amžiaus grupė: 47-63 metai 64-75 metai	52 (54,2%) 44 (45,8%)	55 (56,7%) 42 (43,3%)	0,723
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją (ng/ml): ≤10 >10	89 (92,7%) 7 (7,3%)	89 (91,8%) 8 (8,2%)	0,804
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos (ng/ml): ≤10 >10	69 (71,9%) 27 (28,1%)	67 (69,1%) 30 (30,9%)	0,670
Uždegimas: nustatytas nenustatytas	32 (33,3%) 64 (66,7%)	36 (37,1%) 61 (62,9%)	0,583
GPH: nustatyta nenustatyta	59 (61,5%) 37 (38,5%)	56 (57,7%) 41 (42,3%)	0,598
Priešinės liaukos vėžio diagnozė kliniškai reikšmingas kliniškai nereikšmingas	28 (29,2%) 68 (70,8%)	25 (25,8%) 72 (74,2%)	0,597

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija

Iš pateiktų duomenų matyti, kad didelė *MSMB* raiška dažniau nustatyta jaunesnio amžiaus (47-63 metų) pacientams palyginus su vyresnio amžiaus (64-75 metų) pacientais. Įvertinus *MSMB* raiškos pasiskirstymą priklausomai nuo pacientų PSA koncentracijos kraujo serume prieš ir po transperinealinės priešinės liaukos biopsijos matyti, kad pacientai tiek su maža, tiek su didele *MSMB* raiška kraujyje pasiskirstė vienodai tarp grupių esant 10 ng/ml ir mažesnei PSA koncentracijai kraujo serume. Po priešinės liaukos biopsijos esant 10 ng/ml ir mažesnei PSA koncentracijai kraujo serume dažniau nustatyta maža *MSMB* raiška. Tiems pacientams, kuriems kraujyje buvo nustatyta maža *MSMB* geno raiška, ligą lydintis uždegimas priešinėje liaukoje nebuvo nustatytas. Maža *MSMB* geno raiška dažniau stebėta PV sergantiems pacientams, kuriems kartu su naviku nustatyta ir GPH priešinėje liaukoje. Įvertinus *MSMB* raišką priklausomai nuo PV histologinio verifikavimo, nustatyta, kad didelė *MSMB* raiška dažniau identifikuota esant kliniškai nereikšmingam PV.

Atlikus koreliacinę analizę ir įvertinus *MSMB* raišką kraujyje priklausomai nuo pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų, statistiškai reikšmingo ryšio nebuvo gauta (13 lent.).

13 lentelė. *MSMB* raiškos kraujyje ir pacientų amžiaus, klinikinių – pataloginių charakteristikų koreliacinė analizė

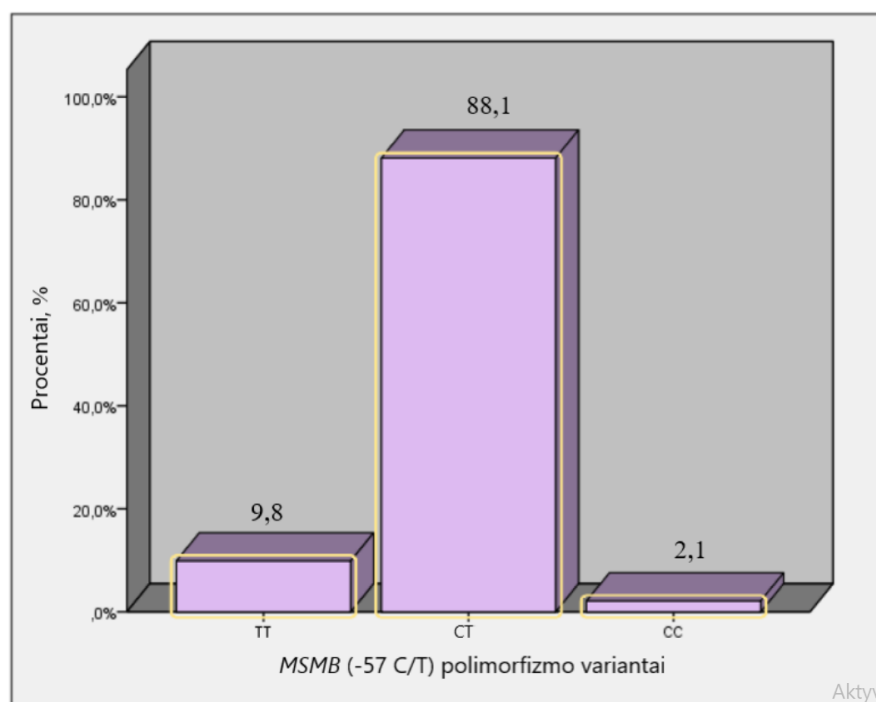
Parametras	<i>MSMB</i> raiška	
	r_s	p
Amžius	-0,044	0,539
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją	0,045	0,531
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos	0,056	0,435
Uždegimas	-0,006	0,931
GPH	-0,045	0,538
Priešinės liaukos vėžio diagnozė	-0,053	0,461

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija, r_s – Spirmeno koreliacijos koeficientas

3.4. *MSMB* geno (-57 C/T) polimorfizmas sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje

Tyrimams buvo pasirinktas *MSMB* (-57 C/T) (rs10993994) geno polimorfizmas kaip labiausiai tyrinėjamas sergant PV. Visiems tyrime dalyvavusiems pacientams buvo nustatytas *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmas kraujyje. *MSMB* geno polimorfizmo TT, CT ir CC variantai nustatyti atitinkamai 19 (9,8%, 95% PI 5,7-15,0) atvejų, 170 (88,1 %, 95% PI 82,9-92,2) atvejų ir 4 (2,1%, 95% PI 0,5-4,1) atvejais. *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo variantų pasiskirstymas pateiktas 4 paveiksle.

Kontrolinę grupę sudarė 20 sveikų vyrų, kurių kraujyje nustatytas tik *MSMB* (-57 C/T) (rs10993994) geno polimorfizmo CT variantas.



5 pav. *MSMB* geno (-57 C/T) polimorfizmo variantų pasiskirstymas

MSMB (-57 C/T) polimorfizmo variantų pasiskirstymas įvertintas priklausomai nuo pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų (14 lent.). Išanalizavus polimorfizmo variantų pasiskirstymą priklausomai nuo amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų, statistiškai reikšmingų sąsajų tarp *MSMB* (-57 C/T) variantų ir analizuotų parametrų nenustatyta (14 lent.).

14 lentelė. *MSMB* (-57 C/T) geno polimorfizmo analizė sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu kraujyje priklausomai nuo amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų

Parametras	<i>MSMB</i> (-57 C/T) geno polimorfizmas			p
	TT, n (%)	CT, n (%)	CC, n (%)	
Amžiaus grupė: 47-63 metai 64-75 metai	11 (57,9%) 8 (42,1%)	93 (54,7%) 77 (45,3%)	3 (75,0%) 1 (25,0%)	0,704
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją (ng/ml): ≤10 >10	19 (100,0%) 0	155 (91,2%) 15 (8,8%)	4 (100,0%) 0	0,333
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos (ng/ml): ≤10 >10	13 (68,4%) 6 (31,6%)	121 (71,2%) 49 (28,8%)	2 (50,0%) 2 (50,0%)	0,643
Uždegimas: nustatytas nenustatytas	5 (26,3%) 14 (73,7%)	62 (36,5%) 108 (63,5%)	1 (25,0%) 3 (75,0%)	0,619
GPH: nustatytas nenustatytas	14 (73,7%) 5 (26,3%)	99 (58,2%) 71 (41,8%)	2 (50,0%) 2 (50,0%)	0,397
Priešinės liaukos vėžio diagnozė kliniškai reikšmingas kliniškai nereikšmingas	4 (21,1%) 15 (78,9%)	48 (28,2%) 122 (71,8%)	1 (25,0%) 3 (75,0%)	0,797

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija

Tyrimo rezultatai parodė, kad *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo CT variantas dažniau identifiukuotas jaunesnio amžiaus (47-63 metai) pacientams palyginus su vyresniais (64-75 metai) pacientais. Įvertinus *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo variantus priklausomai nuo PSA koncentracijos kraujo serume prieš ir po priešinės liaukos transperinealinės biopsijos matyti, kad *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo CT variantas dažniau nustatytas esant 10 ng/ml ir mažesnei PSA koncentracijai kraujo serume. Palyginus *MSMB* geno (-57 C/T) polimorfizmo variantus priklausomai nuo kartu su priešinės liaukos naviku diagnozuojamomis pataloginėmis būklėmis – uždegimu ir GPH matyti, kad CT variantas dažnesnis nesant ligą lydinčiam uždegimui ir esant ligą lydinčiai GPH. Įvertinus *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmą priklausomai nuo PV histologinio verifikavimo, matyti, kad CT variantas dažniau nustatytas pacientams esant kliniškai nereikšmingam PV.

Tolesniame etape panaudojus koreliacinės analizės metodą, įvertintas tirtųjų parametru ryšių stiprumas. Statistiškai reikšmingo ryšio tarp *MSMB* geno (-57 C/T) polimorfizmo variantų ir pacientų amžiaus, klinikinių – pataloginių charakteristikų nenustatyta (15 lent.).

15 lentelė. *MSMB* geno (-57 C/T) polimorfizmo kraujyje ir pacientų amžiaus, klinikinių – pataloginių charakteristikų koreliacinė analizė

Parametras	<i>MSMB</i> (-57 C/T) polimorfizmas	
	r_s	p
Amžius	-0,008	0,912
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją	0,070	0,336
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos	0,013	0,863
Uždegimas	0,043	0,551
GPH	-0,097	0,181
Priešinės liaukos vėžio diagnozė	0,039	0,585

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija, r_s – Spirmeno koreliacijos koeficientas

3.5. *CRISP3*, *LMTK2*, *MSMB* genų raiškos ir *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo variantų pokyčiai sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų kraujyje

Atlikta *CRISP3*, *LMTK2* ir *MSMB* genų raiškos tarpusavio analizė; rezultatai pateikti 16 lentelėje.

16 lentelė. *CRISP3*, *LMTK2* ir *MSMB* genų raiškos tarpusavio analizė sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu kraujyje

Parametras	<i>CRISP3</i> raiška		p	<i>MSMB</i> raiška		p
	maža, n (%)	didelė, n (%)		maža, n (%)	didelė, n (%)	
<i>CRISP3</i> raiška maža didelė				61 (63,5%) 35 (36,5%)	35 (36,1%) 62 (63,9%)	<0,001
<i>LMTK2</i> raiška maža didelė	47 (49,0%) 49 (51,0%)	49 (50,5%) 48 (49,5%)	0,829	67 (69,8%) 29 (30,2%)	29 (29,9%) 68 (70,1%)	<0,001
<i>MSMB</i> raiška maža didelė	61 (63,5%) 35 (36,5%)	35 (36,1%) 62 (63,9%)	<0,001			

Nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp *CRISP3* ir *MSMB* raiškos kraujyje ($p < 0,001$); *LMTK2* ir *MSMB* raiškos kraujyje ($p < 0,001$) (16 lent.).

Toliau pacientai suskirstyti į dvi grupes pagal *CRISP3* ir *MSMB* genų raiškos pokyčius kraujyje. Maža *CRISP3* ir didelė *MSMB* raiška – geros prognozės grupė; didelė *CRISP3* ir maža *MSMB* raiška – blogos prognozės grupė ($n=70$). Pacientai pasiskirstė po lygiai į grupes, po 35 atvejus.

CRISP3 ir *MSMB* genų raiškos pokyčiai įvertinti priklausomai nuo pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų (17 lent.).

17 lentelė. *CRISP3* ir *MSMB* genų raiškos kraujyje analizė priklausomai nuo sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų

Parametras	<i>CRISP3</i> ir <i>MSMB</i> raiška		P
	gera prognozė, n (%)	bloga prognozė, n (%)	
Amžiaus grupė: 47-63 metai 64-75 metai	20 (57,1%) 15 (42,9%)	22 (62,9%) 13 (37,1%)	0,626
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją (ng/ml): ≤10 >10	32 (91,4%) 3 (8,6%)	34 (97,1%) 1 (2,9%)	0,614
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos (ng/ml): ≤10 >10	21 (60,0%) 14 (40,0%)	30 (85,7%) 5 (14,3%)	0,030
Uždegimas: nustatytas nenustatytas	17 (48,6%) 18 (51,4%)	12 (34,3%) 23 (65,7%)	0,225
GPH: nustatyta nenustatyta	21 (60,0%) 14 (40,0%)	20 (57,1%) 15 (42,9%)	0,808
Priešinės liaukos vėžio diagnozė kliniškai reikšmingas kliniškai nereikšmingas	8 (22,9%) 27 (77,1%)	10 (28,6%) 25 (71,4%)	0,584

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija

Įvertinus *CRISP3* ir *MSMB* raiškų pokyčius priklausomai nuo pacientų amžiaus, didelė *CRISP3* ir maža *MSMB* raiška kraujyje dažniau nustatyta jaunesnio amžiaus (47-63 metai) pacientams lyginant su vyresnio amžiaus (64-75 metai) pacientais. Palyginus *CRISP3* ir *MSMB* raiškos pasiskirstymą priklausomai nuo PSA koncentracijos kraujo serume prieš transperinealinės priešinės liaukos biopsiją matyti, kad didelė *CRISP3* ir maža *MSMB* raiška dažniau identifikuota pacientams sergantiems PV esant 10 ng/ml ir mažesnei PSA koncentracijai kraujo serume. Gautas statistiškai reikšmingas pasiskirstymas tarp *CRISP3* ir *MSMB* raiškos kraujyje ir pacientų PSA koncentracijos kraujo serume po transperinealinės biopsijos ($p=0,030$) (17 lent.). Iš pateiktų 17 lentelėje duomenų matyti, kad didelė *CRISP3* ir maža *MSMB* raiška dažniau konstatuota tiems pacientams, kuriems nustatyta 10 ng/ml ir mažesnė PSA koncentracija kraujo serume. *CRISP3* ir *MSMB* raiška įvertinta priklausomai nuo tokių būklių kaip uždegimas ir GPH. Iš tyrimo duomenų matyti, kad pacientai, kuriems nebuvo nustatytas PV lydintis uždegimas dažniau stebėta didelė *CRISP3* ir maža *MSMB* raiška kraujyje, o esant mažai *CRISP3* ir didelei *MSMB* raiškai kraujyje, kartu stebėta ir ligą lydinti GPH. Palyginus *CRISP3* ir *MSMB*

raiškos pokyčius priklausomai nuo priešinės liaukos histologinio verifikavimo matyti, kad maža *CRISP3* ir didelė *MSMB* raiška dažnesnė esant kliniškai reikšmingam PV.

Pacientai suskirstyti į dvi grupes pagal *LMTK2* ir *MSMB* genų raiškos pokyčius kraujyje. Didelė *LMTK2* ir didelė *MSMB* raiška – geros prognozės grupė; maža *LMTK2* ir maža *MSMB* raiška – blogos prognozės grupė (n=134). Pacientai pasiskirstė po lygiai į grupes, po 67 atvejus.

LMTK2 ir *MSMB* genų raiškos pokyčiai įvertinti priklausomai nuo pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų (18 lent.).

18 lentelė. *LMTK2* ir *MSMB* genų raiškos kraujyje analizė priklausomai nuo sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu pacientų amžiaus ir klinikinių – pataloginių charakteristikų

Parametras	<i>LMTK2</i> ir <i>MSMB</i> raiška		P
	gera prognozė, n (%)	bloga prognozė, n (%)	
Amžiaus grupė: 47-63 metai 64-75 metai	38 (56,7%) 29 (43,3%)	40 (59,7%) 27 (40,3%)	0,726
PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją (ng/ml): ≤10 >10	59 (88,1%) 8 (11,9%)	65 (97,0%) 2 (3,0%)	0,048
PSA koncentracija kraujo serume po biopsijos (ng/ml): ≤10 >10	46 (68,7%) 21 (31,3%)	52 (77,6%) 15 (22,4%)	0,242
Uždegimas: nustatytas nenustatytas	22 (32,8%) 45 (67,2%)	21 (31,3%) 46 (68,7%)	0,853
GPH: nustatyta nenustatyta	40 (59,7%) 27 (40,3%)	43 (64,2%) 24 (35,8%)	0,594
Priešinės liaukos vėžio diagnozė kliniškai reikšmingas kliniškai nereikšmingas	17 (25,4%) 50 (74,6%)	17 (25,4%) 50 (74,6%)	1

PSA – priešinės liaukos specifinis antigenas, GPH – gerybinė priešinės liaukos hiperplazija

Maža *LMTK2* ir maža *MSMB* raiška kraujyje dažniau stebėta jaunesniems (47-63 metai) pacientams palyginus su vyresnio amžiaus (64-75 metai) pacientais. Įvertinus *LMTK2* ir *MSMB* raišką kraujyje priklausomai nuo pacientų PSA koncentracijos kraujo serume prieš transperinealinę biopsiją, gautas statistiškai reikšmingas pasiskirstymas tarp *LMTK2* ir *MSMB* raiškos kraujyje ir PSA koncentracijos kraujo serume (p=0,048) (18 lent.). Maža *LMTK2* ir maža *MSMB* raiška kraujyje dažniau stebėta pacientams esant 10 ng/ml ir mažesnei PSA koncentracijai kraujo serume prieš ir po biopsijos. Įvertinus pacientų *LMTK2* ir *MSMB* raiškos pasiskirstymą kraujyje priklausomai nuo lydinčio uždegimo, maža *LMTK2* ir maža *MSMB* raiška

dažniau nustatyta nesant uždegimui. Palyginus *LMTK2* ir *MSMB* raiškos pokyčių pasiskirstymą priklausomai nuo ligą lydinčios GPH matyti, kad maža *LMTK2* ir maža *MSMB* raiška dažniau nustatyta esant GPH. Įvertinus *LMTK2* ir *MSMB* raišką priklausomai nuo priešinės liaukos vėžio histologinio verifikavimo matyti, kad duomenys abiejose grupėse pasiskirstė vienodai tiek esant mažai, tiek didelei *LMTK2* ir *MSMB* raiškai, kai stebimas kliniškai reikšmingas ar nereikšmingas PV.

MSMB geno raiškos ir *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo tarpusavio analizės rezultatai pateikti 19 lentelėje.

19 lentelė. *MSMB* geno raiškos ir *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo tarpusavio analizė sergančiųjų priešinės liaukos vėžiu kraujyje

Parametras	<i>MSMB</i> (-57 C/T) polimorfizmas			p
	TT, n (%)	CT, n (%)	CC, n (%)	
<i>MSMB</i> raiška				0,009
maža	14 (73,7%)	78 (45,9%)	4 (100,0%)	
didelė	5 (26,3%)	92 (54,1%)	0	

Tyrimo nustatyta statistiškai reikšminga sąsaja tarp *MSMB* geno raiškos ir *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo variantų ($p=0,009$) (19 lent.). *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo CT variantas dažniau nustatytas esant didelei *MSMB* geno raiškai kraujyje, o TT variantas – mažai *MSMB* raiškai, kas atitinka literatūros duomenis.

Atlikus koreliacinę analizę ir įvertinus *MSMB* geno raišką kraujyje priklausomai nuo *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo, nustatytas statistiškai reikšmingas teigiamas ryšys ($r_s=0,166$ $p=0,021$) (20 lent.).

20 lentelė. *MSMB* geno raiškos ir *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo koreliacinė analizė

Parametras	<i>MSMB</i> raiška	
	r_s	p
<i>MSMB</i> (-57 C/T) polimorfizmas	0,166	0,021

r_s – Spirmeno koreliacijos koeficientas

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Pasaulyje ir daugelyje Europos valstybių PV išlieka viena dažniausiai diagnozuojamų onkologinių ligų tarp vyrų. Dėl didėjančio sergamumo PV, 2006 metais Lietuvoje buvo pradėta įgyvendinti “Lietuvos priešinės liaukos vėžio ankstyvos diagnostikos programa“. Nepaisant to, sergančiųjų PV išgyvenamumas išlieka vis dar mažas dėl laiku nedidžiuo PV.

Tiriamąjį darbą metu buvo nustatyti ir išanalizuoti *CRISP3*, *LMTK2*, *MSMB* genų raiškos ir *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo kraujyje pokyčiai sergant PV.

Atlikto tyrimo rezultatai tik iš dalies atitinka literatūroje pateikiamus rezultatus, nes remiantis kitų tyrėjų duomenimis šių genų raiška buvo tiriama kraujyje bei navike – baltymų lygyje arba genų raiška ir VNP nustatoma navike, ko mūsų tyrime nebuvo atlikta.

CRISP3. Pacientų amžiaus įtaka biologiniam PV vystymuisi ir toliau išlieka gana prieštaringa, nes statistiškai reikšmingo skirtumo tarp amžiaus grupių ir *CRISP3* raiškos kraujyje nebuvo nustatyta. Galima įžvelgti tik tendencingumą, tačiau teigti, kad vienoje ar kitoje amžiaus grupėje nustatomas didesnė ar mažesnė *CRISP3* raiška, negalima. Literatūros duomenimis vyrams PV rizika padidėja po 50 metų amžiaus [48]. Mūsų atliktas tyrimas atitinka, dalies tyrėjų duomenis, kad tarp jaunesnio ir vyresnio amžiaus pacientų ir *CRISP3* baltymo raiškos priešinės liaukos navikiniame audinyje patikimo ryšio nėra ($p=0,280$) [14] ($p=0,529$) [39].

Didesnė PSA koncentracija kraujo serume gali būti nustatoma tiek esant priešinėje liaukoje navikui, tiek esant GPH [70, 9]. Sąsaja tarp *CRISP3* raiškos ir PSA koncentracijos kraujo serume nėra tiksliai nustatyta. Pavyzdžiui, literatūroje vienoje publikacijoje pateikiami statistiškai reikšmingi skirtumai tarp didelės *CRISP3* baltymo raiškos navike ir didesnės PSA koncentracijos kraujo serume prieš gydymą ($p=0,045$) [39], kitose publikacijose tokia sąsaja nekonstatuota ($p=0,212$) [14]. Tuo tarpu, šiame tyrime stebimas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp *CRISP3* raiškos kraujyje ir PSA koncentracijos kraujo serume po biopsijos ($p=0,016$) (8 lent.). Rezultatai rodo, kad esant 10 ng/ml ir mažesnei PSA koncentracijai kraujo serume, tikimybė nustatyti didelę *CRISP3* raišką kraujyje yra didesnė ($r=-0,165$, $p=0,022$) (9 lent.).

PV gali būti diagnozuojamas kartu su priešinės liaukos pataloginėmis būklėmis – uždegimu ar GPH [71]. Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad *CRISP3* raiška yra didesnė priešinės liaukos naviko ląstelėse, palyginti su GPH ląstelėmis [14]. Bashir ir bendraautorių [14] tyrime didelė *CRISP3* baltymo raiška dažniau nustatyta priešinės liaukos naviko ląstelėse

lyginant su gerybiniais priešinės liaukos audiniais ($p < 0,0001$). Šiame tyrime statistiškai reikšmingos sąsajos tarp *CRISP3* raiškos ir GPH nekonstatuota.

Literatūroje pateikiama, kad *CRISP3* ir *MSMB* yra tarpusavyje susiję ir kad *CRISP3* raiškos pokyčiai turi įtakos *MSMB* raiškos pokyčiams. Manoma, kad didelė *CRISP3* raiška, dėl *CRISP3* sąveikos su *MSMB*, lemia mažesnę *MSMB* raišką. Kadangi *MSMB* dalyvauja naviko augimo slopinimo procese, tai šio baltymo sumažėjusi raiška yra susijusi su PV išsivystymu [72]. Šio tyrimo metu nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp *MSMB* ir *CRISP3* genų raiškos kraujyje ($p < 0,001$) (16 lent.). Parodyta, kad didelė *CRISP3* ir maža *MSMB* raiška kraujyje dažniau identifikuota tiems pacientams, kurių PSA koncentracija kraujo serume po transperinealinės biopsijos 10 ng/ml ir mažesnė ($p = 0,030$) (17 lent.).

LMTK2. Literatūroje rasti vos keli tyrimai, kuriuose buvo analizuojama *LMTK2* raiška sergant PV. Tyrimuose nurodoma, kad priešinės liaukos navikinėse ląstelėse nustatyta mažesnė *LMTK2* raiška negu epitelinėse priešinės liaukos vėžio ląstelėse ar GPH ląstelėse [19, 46, 5].

Šio tyrimo rezultatai rodo, kad palyginus *LMTK2* raišką kraujyje pagal amžiaus grupes, statistiškai reikšmingo ryšio nenustatyta.

Tiriant PSA koncentracijos kraujyje priklausomybę nuo *LMTK2* raiškos, gauta sąsaja, kad esant mažai *LMTK2* raiškai, PV dažniausiai verifikuojamas, kai PSA koncentracija kraujo serume prieš biopsiją padidėjusi nežymiai, t.y. iki 10 ng/ml ($p = 0,003$) (10 lent.). Tarp šių parametrų nustatyta silpna, tačiau teigiamai reikšminga koreliacija ($r_s = 0,196$ $p = 0,006$) (11 lent.). Shah ir bendraautorių [31] tyrime maža *LMTK2* raiška LNCaP-KD ląstelėse rodo statistiškai reikšmingą PSA raiškos padidėjimą ($p < 0,001$).

Literatūros šaltiniuose nėra duomenų apie *LMTK2* raišką ir sąsają su GPH, tačiau nurodoma, kad *LMTK2* raiška yra mažesnė priešinės liaukos naviko ląstelėse, palyginti su GPH ląstelėmis [19, 49]. Harries ir bendraautorių [5] tyrime maža *LMTK2* mRNA dažniau nustatyta PV sergantiems pacientams adenokarcinomose lyginant su gerybiniais priešinės liaukos audiniais ($p = 3,2 \times 10^{-7}$). Šiame tyrime statistiškai reikšmingos sąsajos tarp *LMTK2* raiškos ir GPH nekonstatuota.

Literatūros duomenimis maža *LMTK2* ir maža *MSMB* genų raiška siejama su padidėjusia PV rizika [5]. Remiantis šio tyrimo duomenimis nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp *LMTK2* ir *MSMB* genų raiškos kraujyje ($p < 0,001$) (16 lent.). Maža *LMTK2* ir maža *MSMB* raiška kraujyje dažniau nustatyta pacientams esant 10 ng/ml ir mažesnei PSA koncentracijai kraujo serume prieš transperinealinę biopsiją ($p = 0,048$) (18 lent.).

MSMB. Šiame tyrime statistiškai reikšmingo ryšio tarp *MSMB* raiškos kraujyje ir pacientų amžiaus nekonstatuota. Literatūroje pateikiami kontraversiški duomenys. Sjöblom ir bendraautoriai [1] nenustatė reikšmingos sąsajos tarp pacientų amžiaus diagnozės metu ir *MSMB* raiškos navike ($p=0,7511$) bei *MSMB* baltymo raiškos navike prostatektomijos ir adatos biopsijos mėginiuose (atitinkamai, $p=0,2563$ ir $p=0,3078$). Tuo tarpu tame pačiame tyrime jie parodė, kad maža *MSMB* baltymo raiška kraujyje yra statistiškai reikšmingai susijusi su pacientų amžiumi ($p=0,0452$) [1]. Kitose publikacijose ši sąsaja taip pat nebuvo nustatyta [73].

Sjöblom ir bendraautorių [1] duomenimis nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingos koreliacijos tarp *MSMB* baltymo raiškos kraujo serume ir pacientų amžiaus diagnozės metu sergantiems PV ($r_s=0,1550$ $p>0,05$). Mūsų tyrimo metu ši koreliacija taip pat nebuvo stebima.

Plačiai PV diagnostikai taikomas PSA tyrimas. Pažymėtina, kad PSA yra specifinis priešinės liaukos žymuo, tačiau nespecifinis priešinės liaukos vėžiui. Padidėjusi PSA koncentracija kraujo serume gali būti nustatoma tiek esant priešinėje liaukoje navikui, tiek esant GPH [9]. Literatūroje pateikiami kontraversiški duomenys tarp PSA koncentracijos kraujo serume ir *MSMB* raiškos. Haiman ir bendraautoriai [73] nenustatė reikšmingos sąsajos tarp pacientų PSA koncentracijos kraujo serume ir *MSMB* baltymo raiškos kraujyje ($p=0,37$). Šio tyrimo metu ši sąsaja taip pat nekonstatuota. Priešingai, Dahlman ir bendraautoriai [72] tyrimo metu nustatė statistiškai reikšmingą skirtumą tarp didelės *MSMB* baltymo raiškos ir mažesnės PSA koncentracijos kraujo serume prieš gydymą ($p<0,001$).

Koreliacinės analizės rezultatai neparodė statistiškai reikšmingo ryšio tarp *MSMB* raiškos ir PSA koncentracijos kraujo serume, kas prieštarauja Haiman ir bendraautorių [73] tyrimui, kurio metu buvo nustatyta silpnai teigiama koreliacija tarp PSA koncentracijos kraujo serume ir *MSMB* baltymo raiškos kraujyje ($r=0,23$ $p<0,001$). Sjöblom ir bendraautoriai [1] taip pat parodė silpnai teigiamą ryšį tarp *MSMB* baltymo raiškos kraujyje ir laisvo bei bendro PSA koncentracijos kraujo serume (atitinkamai, $r_s=0,3990$ $p<0,0001$; $r_s=0,3200$ $p<0,0001$).

Įvertinus priešinės liaukos būklę, stebimas kartu su priešinės liaukos naviku, sąsajos tarp *MSMB* raiškos ir uždegimo bei GPH nebuvo nustatyta.

***MSMB* (-57 C/T) polimorfizmas.** Plačiai tyrinėjamas *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmas, tačiau publikuotų tyrimų rezultatai kontraversiški. Vieni tyrėjai teigia, kad yra sąsaja tarp *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo ir rizikos susirgti PV [1], kiti tokios sąsajos nenustatė [6]. Literatūroje pateikiami duomenys, kad *MSMB* -57 TT variantas turi didžiausią riziką susirgti PV ir lemia mažesnę *MSMB* raišką [1, 6, 15].

Šiame tyrime, palyginus *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo variantų pasiskirstymą pagal amžiaus grupes, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. Gauti rezultatai sutampa su

literatūroje pateiktais duomenimis. Kader ir bendraautorai [68] nenustatė reikšmingos sąsajos tarp *MSMB* geno rs10993994 VNP ir pacientų amžiaus diagnozės metu ($p=0,080$).

Kader ir bendraautorai [68] nenustatė reikšmingos sąsajos tarp *MSMB* geno rs10993994 VNP ir PSA koncentracijos kraujo serume ($p=0,331$). Šiame tyrime, palyginus *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo variantų pasiskirstymą pagal PSA koncentraciją kraujo serume, statistiškai reikšmingų skirtumų taip pat nenustatyta. Tačiau Chang ir bendraautorai [50] nustatė statistiškai reikšmingą pasiskirstymą tarp rs10993994 polimorfizmo ir PSA koncentracijos ($p=0,03$) didelės rizikos Kaukaziečiams vyrams, tačiau nebuvo nustatyta sąsajos tarp PSA koncentracijos ir rs10993994 polimorfizmo tarp Afroamerikiečių vyrų ($p=0,12$). Xu ir bendraautorai [69] nustatė statistiškai reikšmingą ryšį tarp rs10993994 polimorfizmo ir laisvo bei bendro PSA koncentracijos kraujyje (atitinkamai, $p=4,9 \times 10^{-5}$ ir $p=0,00014$). Tyrėjai parodė, kad TT rizikos alelis yra susijęs su padidėjusia laisvo ir bendro PSA koncentracija kraujo serume.

Literatūros duomenimis Mhatre ir bendraautorai [66] nustatė statistiškai reikšmingą sąsają tarp didelės *MSMB* raiškos priešinės liaukos audinyje ir *MSMB* (rs10993994) polimorfizmo CC varianto ($p<0,05$). Šiame tyrime identifikuota statistiškai reikšminga, labai silpnai teigiama, koreliacija tarp *MSMB* raiškos ir *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo ($r_s=0,166$ $p=0,021$) (20 lent.). Parodyta, kad esant didelei *MSMB* geno raiškai kraujyje dažnesnis rs10993994 polimorfizmo CT variantas ($p=0,009$) (19 lent.).

Manoma, kad tokios priešinės liaukos gerybinės ligos kaip priešinės liaukos uždegimas ar GPH padidina riziką susirgti PV [71]. Šiame tyrime sąsajos tarp uždegimo bei GPH ir *MSMB* polimorfizmo nenustatyta. Literatūroje pateikiamas vienintelis tyrimas, kuriame buvo siekiama nustatyti sąsają tarp *MSMB* geno rs10993994 (-59 C/T) VNP ir GPH. Tyrimo metu nebuvo nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp VNP ir GPH ($p=0,060$) [23].

Apibendrinant pateiktus literatūros duomenis matyti, kad PV vystymuisi tampa svarbi molekulinė žymenų predispozicija. CRISP3, MSMB ir LMTK2 tyrimai sergantiesiems PV pradėti neseniai, tačiau vis dar trūksta susistemintų duomenų, todėl šie tyrimai ypač aktualūs. Ateityje susisteminta informacija bus naudinga ir reikšminga gydytojams urologams tiriant pacientus, kuriems įtariamas kliniškai reikšmingas PV prieš pritaikant transperinealinę priešinės liaukos biopsiją.

IŠVADOS

1. Didelė *CRISP3* ir maža *LMTK2* raiška kraujyje yra susijusi su PSA koncentracija kraujo serume ($p=0,016$; $p=0,003$).
2. Pacientams sergantiems kliniškai nereikšmingu priešinės liaukos vėžiu dažniau nustatytas *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo CT variantas, tačiau tokiems pacientams rekomenduotinas aktyvus stebėjimas dėl T alelio sąsajos su padidėjusia agresyvaus priešinės liaukos vėžio rizika.
3. Pacientus, kuriems identifikuotas kliniškai nereikšmingas priešinės liaukos vėžys, bet pagal *CRISP3*, *LMTK2* ir *MSMB* raišką kraujyje patenka į blogos prognozės grupę, būtina taikyti aktyvų stebėjimą.

SANTRAUKA

Darbo autorius: Dovilė Šiuškaitė

Darbo pavadinimas: Molekulinių žymenų tyrimas identifikuojant kliniškai reikšmingą priešinės liaukos vėžį

Darbo tikslas: įvertinti molekulinių žymenų reikšmę, siekiant identifiкуoti kliniškai reikšmingą priešinės liaukos vėžį.

Darbo uždaviniai: nustatyti *CRISP3*, *LMTK2*, *MSMB* genų raišką pacientų kraujyje bei įvertinti sąsają su klinikinėmis – pataloginėmis charakteristikomis; nustatyti *MSMB* geno polimorfizmo dažnį pacientų kraujyje bei įvertinti sąsają su klinikinėmis – pataloginėmis charakteristikomis; palyginti molekulinių žymenų tarpusavio sąsają identifiкуojant kliniškai reikšmingą priešinės liaukos vėžį.

Tyrimo objektas. Tyrime dalyvavo 193 priešinės liaukos vėžiu sergantys pacientai, kurie 2016 – 2018 m. histologiniam verifikavimui buvo stacionarizuojami Nacionalinio Vėžio Instituto Onkourologijos skyriuje transperinealinei priešinės liaukos biopsijai. Molekulinių žymenų tyrimams buvo naudojamas periferinis kraujas likęs po visų privalomų tyrimų. Kontrolinę grupę sudarė 20 sveikų vyrų kraujo ėminiai.

Metodai. *CRISP3*, *LMTK2* ir *MSMB* genų raiškos pokyčiams kraujyje įvertinti buvo taikomas tikrojo laiko polimerazės grandininės reakcijos (TL-PGR) metodas. Genų raiškos pokyčiams apskaičiuoti naudotas $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodas. *MSMB* geno (-57 C/T) polimorfizmas iširtas panaudojus pirosekoskaitos metodiką.

Rezultatai. Nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp *CRISP3* raiškos kraujyje ir PSA koncentracijos kraujo serume po priešinės liaukos transperinealinės biopsijos ($p=0,016$); tarp *LMTK2* raiškos kraujyje ir PSA koncentracijos kraujo serume prieš priešinės liaukos transperinealinę biopsiją ($p=0,003$). Statistiškai reikšminga sąsaja konstatuota tarp didelės *CRISP3* ir mažos *MSMB* raiškos kraujyje ir PSA koncentracijos kraujo serume po biopsijos ($p=0,030$); mažos *LMTK2* ir mažos *MSMB* raiškos kraujyje ir PSA koncentracijos kraujo serume prieš biopsiją ($p=0,048$); *MSMB* raiškos kraujyje ir *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo variantų ($p=0,009$).

Išvados. Didelė *CRISP3* ir maža *LMTK2* raiška kraujyje yra susijusi su PSA koncentracija kraujo serume ($p=0,016$; $p=0,003$). Pacientams sergantiems kliniškai nereikšmingu priešinės liaukos vėžiu dažniau nustatytas *MSMB* (-57 C/T) polimorfizmo CT variantas, tačiau tokiems pacientams rekomenduotinas aktyvus stebėjimas dėl T alelio sąsajos su padidėjusia agresyvaus priešinės liaukos vėžio rizika. Pacientus, kuriems identifiкуotas kliniškai nereikšmingas priešinės

liaukos vēžys, bet pagal *CRISP3*, *LMTK2* ir *MSMB* raišķā kraujyje patenka ģ blogos prognozēs grupē, būtina taikyti aktyvų stebėjimą.

SUMMARY

Thesis author: Dovilė Šiuškaitė

Full title of the thesis: The study of the molecular biomarkers for the identification of clinically significant prostate cancer

The aim of the study: to evaluate the significance of molecular biomarkers for the identification of clinically significant prostate cancer.

Objectives: to determine the expression of *CRISP3*, *LMTK2*, *MSMB* genes in patients' blood and to evaluate the relationship with clinical – pathological characteristics; to determine the frequency of *MSMB* gene polymorphism in patients' blood and to evaluate the relationship with clinical – pathological characteristics; to compare the relationship between molecular biomarkers for the identification of clinically significant prostate cancer.

The object of the study. 193 prostate cancer patients were involved in the study. All patients were hospitalized for the histological verification in the Oncourology Department of National Cancer Institute during the period of 2016 – 2018 for transperineal prostate biopsy. Peripheral blood remained after all mandatory blood tests were used for the research of molecular biomarkers. The control group consisted of 20 healthy male blood samples.

Methods. A real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to evaluate *CRISP3*, *LMTK2* and *MSMB* genes expression level. Changes in gene expression were calculated using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *MSMB* gene (-57 C/T) polymorphism was investigated using pyrosequencing method.

Results. Significant correlation was found between *CRISP3* expression in blood and serum PSA levels after transperineal prostate biopsy ($p=0.016$); between *LMTK2* expression in blood and serum PSA levels before transperineal prostate biopsy ($p=0.003$). Statistically significant association was assessed between high *CRISP3* and low *MSMB* expression in blood and serum PSA levels after biopsy ($p=0.030$); low *LMTK2* and low *MSMB* expression in blood and serum PSA levels before prostate biopsy ($p=0.048$); *MSMB* expression in blood and *MSMB* (-57 C/T) polymorphism variants ($p=0.009$).

Conclusions. High *CRISP3* and low *LMTK2* expression in blood are related to serum PSA concentration ($p=0.016$; $p=0.003$). *MSMB* (-57 C/T) polymorphism CT variant was more often identified for the patients with clinically insignificant prostate cancer, however, due to the T allele association with an increased risk of aggressive prostate cancer, for such patients active surveillance is recommended. Moreover, active surveillance must be used for the patients with clinically insignificant prostate cancer, who get into the poor prognosis group according to *CRISP3*, *LMTK2* and *MSMB* expression in blood.

PADĖKA

Noriu padėkoti visiems, kurie padėjo rašyti šį darbą. Dėkoju Kęstučiui Sužiedėliui už suteiktą galimybę atlikti magistro darbą Nacionalinio Vėžio instituto Mokslinių tyrimų centro Molekulinės onkologijos laboratorijoje. Reiškiu nuoširdžią padėką savo baigiamojo darbo vadovei dr. Dianai Schweigert už kantrybę, reiklumą, naudingus patarimus ir pastabas, suteiktas žinias bei skatinimą siekti kuo geresnių darbo rezultatų. Dėkoju konsultantei jaunesniajai mokslo darbuotojai doktorantei Julijai Fadejevai už pagalbą atliekant eksperimentinius tyrimus ir palaikymą rašant magistro darbą. Taip pat dėkoju visam NVI Molekulinės onkologijos laboratorijos kolektyvui už draugišką darbo aplinką, kuri skatina tobulėti ir siekti užsibrėžtų tikslų.

Su pagarba,
Dovilė Šiuškaitė

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Sjöblom L, Saramäki O, Annala M, Leinonen K, Nättinen J, Tolonen T, et al. Microseminoprotein-Beta Expression in Different Stages of Prostate Cancer. PLoS One. 2016; 11(3):e0150241.
2. Sharma P, Zargar-Shoshtari K, Pow-Sang JM. Biomarkers for prostate cancer: present challenges and future opportunities. Future Sci OA. 2015; 2(1):FSO72.
3. Pasaulio sveikatos organizacija. Tarptautinė vėžio tyrimų agentūra, GLOBOCAN 2012 projektas. Interneto prieiga: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
4. Nacionalinis vėžio institutas, Vėžio kontrolės ir profilaktikos centras. Vėžio registras, Vėžys Lietuvoje 2012 metais. Interneto prieiga: http://www.nvi.lt/wpcontent/uploads/2016/04/Vezys_lietuvoje_2012.pdf/
5. Harries LW, Perry JR, McCullagh P, Crundwell M. Alterations in LMTK2, MSMB and HNF1B gene expression are associated with the development of prostate cancer. BMC Cancer. 2010; 10:315.
6. Peng T, Zhang L, Zhu L, Mi YY. MSMB gene rs10993994 polymorphism increases the risk of prostate cancer. Oncotarget. 2017; 8(17):28494-28501.
7. Dellavedova T. Prostatic specific antigen. From its early days until becoming a prostate cancer biomarker. Arch Esp Urol. 2016; 69(1):19-23.
8. Saini S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. Cell Oncol (Dordr). 2016; 39(2):97-106.
9. Zhang M, Chen L, Yuan Z, Yang Z, Li Y, Shan L, et al. Combined serum and EPS-urine proteomic analysis using iTRAQ technology for discovery of potential prostate cancer biomarkers. Discov Med. 2016; 22(122):281-295.
10. http://www3.lrs.lt/pls/inter3/dokpaieska.showdoc_l?p_id=268622&p_query=&p_tr2=
11. Kang BJ, Jeun M, Jang GH, Song SH, Jeong IG, Kim CS, et al. Diagnosis of prostate cancer via nanotechnological approach. Int J Nanomedicine. 2015; 10:6555-69
12. Pentylala S, Whyard T, Pentylala S, Muller J, Pfail J, Parmar S, et al. Prostate cancer markers: An update. Biomed Rep. 2016; 4(3):263-268.
13. Shui IM, Lindström S, Kibel AS, Berndt SI, Campa D, Gerke T, et al. Prostate cancer (PCa) risk variants and risk of fatal PCa in the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. Eur Urol. 2014; 65(6):1069-75.
14. Al Bashir S, Alshalalfa M, Hegazy SA, Dolph M, Donnelly B, Bismar TA. Cysteine- rich secretory protein 3 (CRISP3), ERG and PTEN define a molecular subtype of prostate cancer with implication to patients' prognosis. J Hematol Oncol. 2014; 7:21.

15. Sutcliffe S, De Marzo AM, Sfanos KS, Laurence M. MSMB variation and prostate cancer risk: clues towards a possible fungal etiology. *Prostate*. 2014; 74(6):569-78.
16. Husain I, Shukla S, Soni P, Husain N. Role of androgen receptor in prostatic neoplasia versus hyperplasia. *J Cancer Res Ther*. 2016; 12(1):112-6.
17. Patel ND, Parsons JK. Epidemiology and etiology of benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction. *Indian J Urol*. 2014; 30(2):170-6.
18. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 2015; 36(1):3-23.
19. Shah K, Bradbury NA. Kinase modulation of androgen receptor signaling: implications for prostate cancer. *Cancer Cell Microenviron*. 2015; 2(4). pii: e123.
20. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol*. 2015; 4(3):365-80.
21. Davey RA, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev*. 2016; 37(1):3-15.
22. Chughtai B, Forde JC, Thomas DD, Laor L, Hossack T, Woo HH, et al. Benign prostatic hyperplasia. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2:16031.
23. Ban JY, Yoo KH. Promoter Polymorphism (rs12770170, -184C/T) of Microseminoprotein, Beta as a Risk Factor for Benign Prostatic Hyperplasia in Korean Population. *Int Neurourol J*. 2014; 18(2):63-7.
24. Videčnik Zorman J, Matičič M, Jeverica S, Smrkolj T. Diagnosis and treatment of bacterial prostatitis. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2015; 24(2):25-9.
25. Zhou M. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 2018; 31(S1):S71-79.
26. Schrecengost R, Knudsen KE. Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Semin Oncol*. 2013; 40(3):244-58.
27. Gaudreau PO, Stagg J, Soulières D, Saad F. The Present and Future of Biomarkers in Prostate Cancer: Proteomics, Genomics, and Immunology Advancements. *Biomark Cancer*. 2016; 8(Suppl 2):15-33.
28. Li Y, Mongan J, Behr SC, Sud S, Coakley FV, Simko J, et al. Beyond Prostate Adenocarcinoma: Expanding the Differential Diagnosis in Prostate Pathologic Conditions. *Radiographics*. 2016; 36(4):1055-75.
29. Stark T, Livas L, Kyprianou N. Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. *Transl Androl Urol*. 2015; 4(4):455-63.
30. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev*. 2010; 24(18):1967-2000.

31. Shah K, Bradbury NA. Lemur Tyrosine Kinase 2, a novel target in prostate cancer therapy. *Oncotarget*. 2015; 6(16):14233-46.
32. Holm HV, Dahl AA, Klepp OH, Fosså SD. Modern treatment of metastatic prostate cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2017; 137(11):803-805.
33. John M. Treating Localized Prostate Cancer: A Review of the Research for Adults. Eisenberg Center for Clinical Decisions and Communications Science. 2016. 2, 5 p.
34. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. 2000.
35. Shaw GL, Thomas BC, Dawson SN, Srivastava G, Vowler SL, Gnanapragasam VJ, et al. Identification of pathologically insignificant prostate cancer is not accurate in unscreened men. *Br J Cancer*. 2014; 110(10):2405-11.
36. Van Etten JL, Dehm SM. Clonal origin and spread of metastatic prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2016; 23(4):R207-17.
37. Vaidyanathan V, Naidu V, Karunasinghe N, Javed A, Pallati R, Marlow G, et al. SNP-SNP interactions as risk factors for aggressive prostate cancer. *F1000Res*. 2017; 6:621.
38. Baker SJ, Reddy EP. Understanding the temporal sequence of genetic events that lead to prostate cancer progression and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(37):14819-20.
39. Noh BJ, Sung JY, Kim YW, V SG, Park YK. Prognostic value of ERG, PTEN, CRISP3 and SPINK1 in predicting biochemical recurrence in prostate cancer. *Oncol Lett*. 2016; 11(6):3621-3630.
40. VanderWeele DJ, Brown CD, Taxy JB, Gillard M, Hatcher DM, Tom WR, et al. Low-grade prostate cancer diverges early from high grade and metastatic disease. *Cancer Sci*. 2014; 105(8):1079-85.
41. Sobin LH, Wittekind CH, editors. *TNM classification of malignant tumours*. 6th edition. New York: Wiley-Liss; 2002. 243-245p.
42. Chen RC, Chang P, Vetter RJ, Lukka H, Stokes WA, Sanda MG, et al. Recommended patient-reported core set of symptoms to measure in prostate cancer treatment trials. *J Natl Cancer Inst*. 2014; 106(7).
43. Cancer.gov [internetinè svetainè]. National Cancer Institute at the National Institutes of Health; [atnaujinta 2018, cituota 2018 05 05]. Adresas: <https://www.cancer.gov/types/prostate/understanding-prostate-changes#prostate-cancer>
44. van Rij S, Gilling P. Recent advances in treatment for Benign Prostatic Hyperplasia. *F1000Res*. 2015; 4. pii: F1000 Faculty Rev-1482.

45. Gater A, Abetz-Webb L, Battersby C, Parasuraman B, McIntosh S, Nathan F, et al. Pain in castration-resistant prostate cancer with bone metastases: a qualitative study. *Health Qual Life Outcomes*. 2011; 9:88.
46. Cuzick J, Thorat MA, Andriole G, Brawley OW, Brown PH, Culig Z, et al. Prevention and early detection of prostate cancer. *Lancet Oncol*. 2014; 15(11):e484-92.
47. Rinckleb AE, Surowy HM, Luedeke M, Varga D, Schrader M, Hoegel J, et al. The prostate cancer risk locus at 10q11 is associated with DNA repair capacity. *DNA Repair (Amst)*. 2012; 11(8):693-701.
48. Perdana NR, Mochtar CA, Umbas R, Hamid AR. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Med Indones*. 2016; 48(3):228-238.
49. Jiang X, Zhang M, Bai XY, Li S, Wu H. Association between 17q25.3-rs6465657 polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis based on 19 studies. *Onco Targets Ther*. 2016; 9:4491-503.
50. Chang BL, Hughes L, Chen DY, Gross L, Ruth K, Giri VN. Validation of association of genetic variants at 10q with prostate-specific antigen (PSA) levels in men at high risk for prostate cancer. *BJU Int*. 2014; 113(5b):E150-6.
51. Yilmaz Ö, Kurul Ö, Ates F, Soydan H, Aktas Z. Does an asymmetric lobe in digital rectal examination include any risk for prostate cancer? results of 1495 biopsies. *Int Braz J Urol*. 2016; 42(4):704-9.
52. Walsh AL, Considine SW, Thomas AZ, Lynch TH, Manecksha RP. Digital rectal examination in primary care is important for early detection of prostate cancer: a retrospective cohort analysis study. *Br J Gen Pract*. 2014; 64(629):e783-7.
53. Chen FK, de Castro Abreu AL, Palmer SL. Utility of Ultrasound in the Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Prostate Cancer: State of the Art. *J Nucl Med*. 2016; 57(Suppl 3):13S-18S.
54. Keyes M, Crook J, Morton G, Vigneault E, Usmani N, Morris WJ. Treatment options for localized prostate cancer. *Canadian Family Physician*. 2013; 59(12):1269-1274.
55. Jayadevappa R, Chhatre S, Wong YN, Wittink MN, Cook R, Morales KH, et al. Comparative effectiveness of prostate cancer treatments for patient-centered outcomes: A systematic review and meta-analysis (PRISMA Compliant). *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(18):e6790.
56. Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*. 2017; 317(24):2532-2542.
57. Park JC, Eisenberger MA. Advances in the Treatment of Metastatic Prostate Cancer. *Mayo Clin Proc*. 2015; 90(12):1719-33.

58. Pathak BR, Breed AA, Nakhawa VH, Jagtap DD, Mahale SD. Growth inhibition mediated by PSP94 or CRISP-3 is prostate cancer cell line specific. *Asian J Androl.* 2010; 12(5):677-89.
59. Dhaulakhandi DB, Kumawat M, Thakran R, Parshad S. Structural and functional analysis of CRISP3 protein in relation to disease of exocrine pancreas. *Astrocyte.* 2017; 3:201-8
60. Ribeiro FR, Paulo P, Costa VL, Barros-Silva JD, Ramalho-Carvalho J, Jerónimo C, et al. Cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP3) is strongly up-regulated in prostate carcinomas with the TMPRSS2-ERG fusion gene. *PLoS One.* 2011; 6(7):e22317.
61. Karunasinghe N, Bishop K, Murray P, Xu Y, Goudie M, Ng L, et al. Role of β -microseminoprotein from prostate cancer initiation to recurrence: A mini-review. *World J Clin Urol.* 2014; 3(1): 20-30.
62. Grupp K, Kohl S, Sirma H, Simon R, Steurer S, Becker A, et al. Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence. *Mod Pathol.* 2013; 26(5):733-42.
63. Marín-Aguilera M, Reig Ò, Lozano JJ, Jiménez N, García-Recio S, Erill N, et al. Molecular profiling of peripheral blood is associated with circulating tumor cells content and poor survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget.* 2015; 6(12):10604-16.
64. Bencze J, Mórotz GM, Seo W, Bencs V, Kálmán J, Miller CCJ, et al. Biological function of Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2): implications in neurodegeneration. *Mol Brain.* 2018; 11(1):20.
65. Dey I, Bradbury NA. Activation of TPA-response element present in human Lemur Tyrosine Kinase 2 (lmtk2) gene increases its expression. *Biochem Biophys Res.* 2017; 12:140-150.
66. Mhatre DR, Mahale SD, Khatkhatay MI, Achrekar SK, Desai SS, Jagtap DD, et al. The rs10993994 in the proximal MSMB promoter region is a functional polymorphism in Asian Indian subjects. *Springerplus.* 2015; 4:380.
67. Waters KM, Stram DO, Le Marchand L, Klein RJ, Valtonen-André C, Peltola MT, et al. A common prostate cancer risk variant 5' of microseminoprotein-beta (MSMB) is a strong predictor of circulating beta-microseminoprotein (MSP) levels in multiple populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(10):2639-46.
68. Kader AK, Sun J, Isaacs SD, Wiley KE, Yan G, Kim ST, et al. Individual and cumulative effect of prostate cancer risk-associated variants on clinicopathologic variables in 5,895 prostate cancer patients. *Prostate.* 2009; 69(11):1195-205.

69. Xu X, Valtonen-André C, Sävblom C, Halldén C, Lilja H, Klein RJ. Polymorphisms at the Microseminoprotein-beta (*MSMB*) Locus Associated With Physiological Variation in Beta-Microseminoprotein (β -MSP) and Prostate Specific Antigen (PSA) Levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(8): 2035–2042.
70. Helfand BT, Loeb S, Hu Q, Cooper PR, Roehl KA, McGuire BB, et al. Personalized prostate specific antigen testing using genetic variants may reduce unnecessary prostate biopsies. *J Urol.* 2013; 189(5):1697-701.
71. Dai X, Fang X, Ma Y, Xianyu J. Benign Prostatic Hyperplasia and the Risk of Prostate Cancer and Bladder Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(18):e3493.
72. Dahlman A, Rexhepaj E, Brennan DJ, Gallagher WM, Gaber A, Lindgren A, et al. Evaluation of the prognostic significance of MSMB and CRISP3 in prostate cancer using automated image analysis. *Mod Pathol.* 2011; 24(5):708-19.
73. Haiman CA, Stram DO, Vickers AJ, Wilkens LR, Braun K, Valtonen-André C, et al. Levels of beta-microseminoprotein in blood and risk of prostate cancer in multiple populations. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105(3):237-43.