

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Kristina
STUOPELYTĖ

Organizmo skysčių RNR tyrimai
prostatos vėžio diagnostikai ir ligos
eigos prognozavimui

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
biologija (N 010)

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2014–2019 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų instituto Žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje.

Moksliniai tyrimai buvo remiami Lietuvos mokslo tarybos ir ES struktūrinės paramos fondų lėšomis. Taip pat gautos LMT ir VU stipendijos už akademinis pasiekimus.

Mokslinė vadovė – prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

VILNIUS UNIVERSITY

Kristina
STUOPELYTĖ

Analysis of RNA in bodily fluids for prostate cancer diagnosis and outcome prediction

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2014 and 2019 at Human Genome Research Laboratory, Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University.

The research was supported by Research Council of Lithuania (RCL), EU structural funds, and scholarships from RCL and VU were granted for academic accomplishments.

Academic supervisor – Prof. Dr. Sonata Jarmalaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology, N 010).

TURINYS

SANTRUMPOS	7
IVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Prostatos vėžys	13
1.1.1. Prostatos anatomija ir patologija	13
1.1.2. Prostatos vėžio epidemiologija.....	16
1.1.3. Prostatos vėžio rizikos veiksniai	17
1.1.4. Prostatos vėžio pataloginės charakteristikos	17
1.1.5. Kastracijai atsparaus PV vystymasis	21
1.2. miRNR	23
1.2.1. miRNR biogeneze	23
1.2.2. miRNR veikimo mechanizmai	24
1.2.3. miRNR ir vėžys.....	26
1.2.4. Organizmo skysčių miRNR ir vėžys	28
1.3. Androgenų receptorius	29
1.3.1. Androgenų receptoriaus atsako kelias.....	29
1.3.2. Androgenų receptoriaus variantai	30
1.3.3. AR-V ir kastracijai atsparus prostatos vėžys (KAPV)	31
1.3.4. Tirtųjų AR-V charakteristikos.....	34
2. MĖGINIAI IR METODAI.....	36
2.1. Ligoniai ir mėginiai.....	36
2.1.1. Prostatos vėžiu sergantys ligoniai	36
2.1.2. Kastracijai atsparių prostatos vėžiu sergantys ligoniai.....	40
2.2. Metodai	43
2.2.1. RNR gryninimas.....	43
2.2.2. miRNR mikrogardelės.....	44
2.2.3. Kopijinės DNR sintezė.....	45
2.2.4. Kiekybinė atvirkštinė transkriptazė PGR.....	46
2.2.5. Statistinė analizė.....	48
3. REZULTATAI.....	51
3.1. miRNR prostatos vėžio diagnostikai.....	51
3.1.1. Visuminė miRNR raiškos analizė prostatos navikuose.....	51
3.1.2. miRNR analizė šlapime.....	53
3.1.3. Diagnostinio miRNR potencialo vertinimas	54
3.2. miRNR biocheminio atkryčio prognozei	58
3.2.1. Visuminė miRNR raiškos analizė mikrogardelėmis	58
3.2.2. Šlapimo miRNR prognostinio potencialo vertinimas	60

3.3.	miRNR atsako į gydymą prognozei	63
3.3.1.	miRNR tyrimas KAPV sergančių ligonių šlapime.....	63
3.3.2.	Šlapimo miRNR atsako į gydymą prognozavimui	65
3.4.	AR-V transkriptai atsako į gydymą prognozei.....	68
3.4.1.	AR-V tyrimai prostatos audiniuose.....	68
3.4.2.	AR-V nustatymas kraujyje	69
3.4.3.	AR-V atsako į gydymą prognozavimui.....	70
4.	REZULTATŲ APTARIMAS	76
4.1.	miRNR prostatos vėžio diagnostikai.....	76
4.2.	miRNR biocheminio atkryčio prognozei	78
4.3.	miRNR atsako į gydymą prognozei	80
4.4.	AR-V transkriptai atsako į gydymą prognozei.....	81
	IŠVADOS	83
	REZULTATŲ VIEŠINIMAS	84
	<i>CURRICULUM VITAE</i>	87
	PADĖKA	88
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	89
	PRIEDAI.....	102
	PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	126

SANTRUMPOS

AA – abiraterono acetatas
ADT – androgenų deprivacijos terapija
AK – asimptomatiųjų asmenų kontrolinė grupė; jiems nėra pasireiškę prostatos vėžio simptomai (angl. *asymptomatic controls*)
AR arba AR-FL – androgenų receptorius (angl. *androgen receptor full length*)
ARE – androgenų atsako elementai (angl. *androgen response elements*)
AR-V – androgenų receptorius variantas
AT – atvirkštinė transkriptazė/transkripcija
AT-kPGR – kiekybinė atvirkštinės transkriptazės PGR (angl. *quantitative reverse transcription PCR*)
AUC – plotas po ROC kreive (angl. *area under the ROC curve*)
bp – bazių pora
BCR – biocheminė ligos progresija arba atkrytis (angl. *biochemical recurrence*)
CI – pasikliautinis intervalas (angl. *confidence interval*)
CNN – cirkuliuojančios naviko nukleorūgštys (angl. *circulating tumor nucleocacids*)
Cq – kiekybinės PGR ciklo numeris (angl. *cycle of quantification*)
Ct – ankstesnis kiekybinės PGR ciklo numerio pavadinimas (angl. *threshold cycle*)
CVL – cirkuliuojančios vėžio ląstelės (angl. *circulating tumor cells*)
DHT – dihidrotestosteronas (angl. *dihydrotestosterone*)
dNTP – deoksiribonukleozidtrifosfatas
DRE – digitalinis rektalinis tyrimas (angl. *digital rectal examination*)
FC – raiškos skirtumas kartais (angl. *fold change*)
G – Gleason
GPH – gerybinė prostatos hiperplazija
HR – santykinė rizika (angl. *hazard ratio*)
HSP – karščio šoko baltymas (angl. *heat-shock proteins*)
iRNR – informacinė RNR
ISUP – Tarptautinė urologinės patologijos draugija (angl. *International Society of Urological Pathology*)
KAPV – kastracijai atsparus prostatos vėžys
kDNR – kopijinė DNR
miRNR – mikroRNR (angl. *microRNA*)
nt – nukleotidas
onkomiR – naviko augimą skatinanti, onkogeninė miRNR
OS – bendrasis išgyvenamumas (angl. *overall survival*)
PFS – išgyvenamumas be progresijos (angl. *progression-free survival*)
PIA – proliferacinė uždegiminė atrofija (angl. *proliferative inflammatory atrophy*)
PIN – prostatinė intraepitelinė neoplazija (angl. *prostatic intraepithelial neoplasia*)
PSA – prostatos specifinis antigenas
pT – naviko stadija (angl. *pathological stage*)
PV – prostatos vėžys

RISC – genų raišką slopinantis nukleoproteininis kompleksas (angl. *RNR-induced silencing complex*)

ROC kreivė – sprendimus priimančiojo ypatybių kreivė (angl. *receiver operating characteristic curve*)

RP – radikali prostatektomija

rpm – apsisukimų skaičius per minutę (angl. *revolutions per minute*)

TFS – Thermo Fisher Scientific

TLDA – mažo tankio *TaqMan* gardelė (angl. *TaqMan Low Density Array*)

TMPRSS2-ERG – translokacijos/delecijos suformuotas sulietinis *TMPRSS2* ir *ERG* genų transkriptas

TNM – sistema naviko išplitimo laipsniui nurodyti: naviko išplitimas pačioje prostatoje (angl. *Tumor*), metastazavimas į limfmazgius (angl. *Node*) bei kitus organus (angl. *Metastasis*)

ĮVADAS

Prostatos vėžys (PV) – dažniausias vyrų onkologinis susirgimas Lietuvoje ir pasaulyje, ypač vakarų šalyse [Bray ir kt., 2018; Ferlay ir kt., 2019]. Nors vyresnio amžiaus ir rizikos grupėms priklausantiems asmenims atliekami prostatai specifinio antigeno (PSA) tyrimai, diegiami naujos kartos diagnostiniai testai, tačiau PV vis tiek išlieka pirmoje vietoje pagal vyresnio amžiaus vyrų sergamumą ir mirtingumą. Šiuo metu PV diagnostikai taikomi metodai, tokie kaip PSA koncentracijos kraujyje matavimas, digitalinis rektalinis tyrimas, sisteminė biopsija ir kt., yra gana jautrūs, tačiau nepakankamai specifiški – nustatoma daug klaidingai teigiamų atvejų, pvz., hiperplazijų. Nors lokalaus PV gydymas yra gana efektyvus, o agresyvus ligos vystymasis būdingas mažesnei daliai ligonių, tokie PV atvejai laikomi kliniškai reikšmingais, nes jiems būdinga bloga ligos prognozė ir trumpesnis išgyvenamumas. Kastracijai atspari prostatos vėžio (KAPV) forma kol kas tebėra nepagydoma ir yra pagrindinė mirties nuo PV priežastis. Per pastarąjį dešimtmetį KAPV sergančių ligonių išgyvenamumą ir gyvenimo kokybę pagerino nauji vaistai [Berg ir kt., 2017]: nauji taksanų grupės preparatai (docetakselis, kabazitakselis), radionuklidas Ra-233, imonoterapinis vaistas sipuleucelis-T ir naujos kartos antiandrogenai, tokie kaip androgenų receptoriaus inhibitoriai enzalutamidas ir apalutamidas bei androgenų sintezę slopinantis abiraterono acetatas [Nuhn ir kt., 2019]. Tačiau dėl heterogeniškos KAPV prigimties apie 20–40 % ligonių iškart pasireiškia pirminis atsparumas šiems naujiems vaistams [de Bono ir kt., 2011; Ryan ir kt., 2013].

Vystantis vėžiui pakinta visi ląstelėje vykstantys procesai, tarp jų ir genų raiškos bei miRNR raiškos reguliavimas. miRNR yra trumpos, nekoduojančios, apie 22 nt ilgio RNR, atliekančios svarbų vaidmenį daugumos eukariotų fiziologiniuose procesuose. Priklausomai nuo miRNR reguliacinio regiono komplementarumo taikiniui, genų raiška tildoma dviem pagrindiniais būdais: ribojama transliacija arba skaldomas transkriptas [Willard ir Koochekpour, 2012]. miRNR vykdoma genų raiškos reguliacija svarbi visiems ląstelėje vykstantiems procesams, o nukrypimai lemia širdies, nervų sistemos vystymosi, uždegiminių, autoimuninių ligų, vėžio, įskaitant PV, vystymąsi [Naeini ir Ardekani, 2009]. Vėžio tyrimuose seniai žinomi tokie terminai, kaip naviko augimą slopinančios ir skatinančios miRNR, tačiau dėl miRNR konteksto svarbos (audinio, organo, stadijos ir kt.) vienareikšmiškas miRNR skirstymas nėra galimas [Tong ir Nemunaitis, 2008]. Gausėjant tyrimams ir juos apibendrinant, nustatyta, kad miRNR

raiškos profilis skiriasi ne tik tarp sveiko ir navikinio audinio, bet ir tarp skirtingų vėžio tipų, subtipų [Naeini ir Ardekani, 2009; Di Leva ir Croce, 2013; Silva-Sanos ir kt. 2014]. Remiantis miRNR raiška, galima atskirti ankstyvos ir vėlesnės stadijos vėžį bei agresyvias jo formas [Brase ir kt., 2011; Shen ir kt., 2012]. PV atvejus palyginus su nenavikiniais audiniais, nustatomas savitas miRNR raiškos profilis, kuris kinta ligai vystantis. Svarbiu atradimu tapo miRNR nustatymas kūno skysčiuose, t. y. kraujyje [Selth ir kt., 2012; Cheng ir kt., 2013; Huang ir kt., 2015], šlapime [Corcoran ir kt., 2014], sėkliniame skystyje [Guzel ir kt., 2015] ir kt. Šlapimas dažniausiai renkamas visiškai neinvaziniu būdu, todėl šlapimo miRNR gali tapti jautriais, mažai invaziniais PV diagnostiniais, prognostiniais ir prediktyviniais žymenimis [Balacescu ir kt., 2017], tačiau kol kas nėra paskelbtų KAPV ligonių šlapime atliktų miRNR tyrimų.

Tyrimai rodo, kad androgenų receptoriaus (AR) atsako kelias išlieka aktyvus KAPV ir turi didelę reikšmę jo vystymuisi ir progresijai. Viena iš aktyvinimo priežasčių galėtų būti AR geno transkriptų variantai (AR-V), kurie neturi ligando prisijungimo domeno ir yra visada aktyvūs. Nuo pat atradimo AR-V buvo susieti su pirminiu ir įgytu atsparumu prieš AR nukreiptiems vaistams [Dehm ir kt., 2008; Guo ir kt., 2009; Hu ir kt., 2009; Sun ir kt., 2010]. Šiuo metu žinoma daugiau kaip 20 AR-V [Paliouras ir kt., 2016], iš kurių dėl plačiausio paplitimo labiausiai ištirtinetas yra tik AR-V7 [Scher ir kt., 2017]. AR-V7 nustačius skysčių biopsijoje, reikšmingai išaugo klinikinių tyrimų ir komerciškai prieinamų testų skaičius, tačiau gilesniam KAPV kancerogenezės ir heterogeniškumo supratimui kol kas trūksta platesnės apimties ir išsamesnių AR-V tyrimų [Antonarakis ir kt., 2014; Steinestel ir kt., 2015; Antonarakis ir kt., 2017].

Darbo tikslas – atrinkti prostatos vėžiui specifines miRNR ir androgenų receptoriaus variantus tyrimui šlapime ir kraujyje bei įvertinti jų diagnostinę, prognostinę vertę ir tinkamumą atsako į gydymą vertinimui.

Uždaviniai:

1. Ištirti visuminės miRNR raiškos profilį navikiniuose ir nenavikiniuose prostatos audiniuose, pasirinktus taikinius validuoti didesnėje mėginių imtyje ir įvertinti sąsajas su klinikiniais-patologiniais rodikliais.
2. Ištirti atrinktas miRNR (miR-148a, -365, -375 ir -429) prostatos vėžiu (PV), gerybine prostatos hiperplazija (GPH) sergančių ir asimptomatinių asmenų (AK) šlapime ir įvertinti šių miRNR diagnostinį potencialą.

3. Ištirti atrinktas miRNR (miR-19a/19b, -21) PV ir GPH sergančių ligonių šlapime bei įvertinti šių miRNR diagnostinį ir prognostinį potencialą.
4. Ištirti atrinktas miRNR (miR-148a, -365, -375 ir -429) kastracijai atspariu PV (KAPV) sergančių ligonių šlapime, palyginti su neagresyvaus PV ir kontrolinių asmenų duomenimis ir įvertinti šių miRNR prognostinį potencialą bei tinkamumą atsako į gydymo abiraterono acetatu vertinimui.
5. Ištirti androgenų receptoriaus (AR-FL) ir AR variantų (AR-V: AR-V1, -V3 ir -V7) raišką navikiniuose ir nenavikiniuose prostatos audiniuose ir įvertinti sąsajas su klinikiniais-patologiniais rodikliais bei prognostinį potencialą.
6. Ištirti AR-FL ir AR-V transkriptų kiekį KAPV sergančių ligonių kraujyje ir įvertinti AR transkriptų prognostinį potencialą.

Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Šiame tyrime pirmą kartą Lietuvoje visuminė miRNR raiška buvo įvertinta prostatos audiniuose ir nustatyta keletas dešimčių navikiniame audinyje pakitusios raiškos miRNR. Išanalizavus sąsajas su klinikiniais rodikliais, atrinktos reikšmingiausiai besiskiriančios raiškos miRNR ir pritaikytos tyrimams didelėje PV ligonių ir kontrolinių asmenų imtyje. Tyrimas parodė, kad miRNR analizė neinvaziniu būdu surinktuose šlapimo mėginiuose leistų specifiskai diagnozuoti PV ankstyvoje stadijoje ir prognozuoti biocheminį ligos atkrytį. Kol kas trūksta jautrių ir specifinių biožymenų, kuriais remiantis būtų galima atskirti kliniškai reikšmingus agresyvios eigos vėžio atvejus ir išvengti nereikalingo gydymo. Taigi su PV klinikiniais-patologiniais rodikliais koreliuojančios ir už PSA testą specifiskiau veikiančios šlapimo miRNR galėtų būti pritaikytos PV diagnostikoje.

Atrinktos specifiskiausios prostatos vėžiui miRNR pirmą kartą pasaulyje buvo ištirtos ir kastracijai atspariu prostatos vėžiu (KAPV) sergančių ligonių šlapime. Pakitęs miRNR kiekis, nustatytas prieš gydymą abiraterono acetatu (AA) surinktuose šlapimo mėginiuose, buvo susietas su trumpesniu išgyvenamumu be progresijos (PFS) ir bendroju išgyvenamumu (OS). KAPV yra nepagydoma liga, todėl vaistais gebama tik prailginti išgyvenamumą. Ilgainiui visi ligoniai tampa atsparūs gaunamam preparatui, o didelei daliai ligonių pasireiškia ir pirminis atsparumas, dėl to labai svarbu parinkti konkrečiu atveju tinkamiausią gydymą ir tikslinti gydymo schemas.

Šiame tyrime androgenų receptoriaus (AR-FL) ir AR variantų (AR-V) raiška buvo įvertinta Lietuvos KAPV ligonių prostatos audiniuose. Nustačius reikšmingas sąsajas su agresyvesne ligos eiga, AR transkriptai buvo tiriami KAPV ligonių kraujyje, paimtame prieš AA gydymą ir AA gydymo metu. Pirmą kartą pasaulyje buvo ištirti viso kraujo AR-V1 ir AR-V3, o didesnis transkriptų kiekis buvo susietas su trumpesniu išgyvenamumu be progresijos ir bendroju išgyvenamumu. AR atsako kelias ne tik išlieka aktyvus vystantis KAPV, bet vaidina pagrindinį vaidmenį. AR-V ištyrimas ligonių kraujyje yra naudingas gilinant suvokimą apie KAPV heterogeniškumą, biologinio atsparumo mechanizmų vystymąsi ir gali padėti tinkamiau parinkti esamus ir kurti naujus vaistus.

Ginami teiginiai

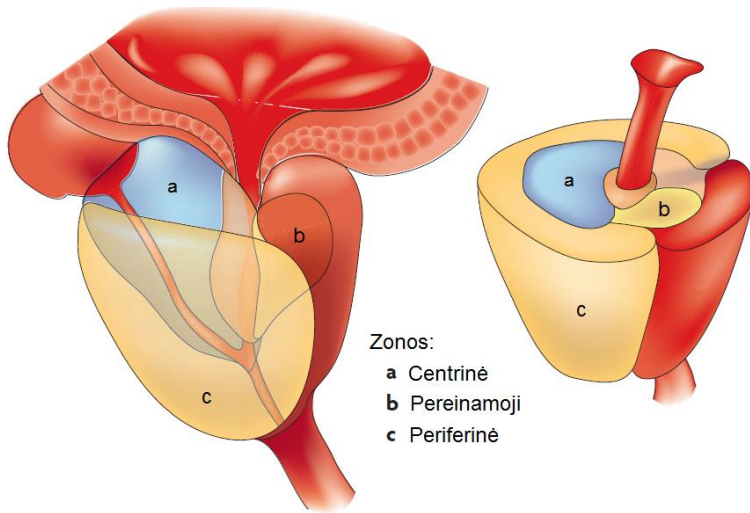
1. miR-148a, -365, -375 ir -429 yra PV specifinės ir/ar reikšmingai siejasi su PV klinikiniais-patologiniais rodikliais, todėl galėtų būti panaudotos PV diagnozės patikslinimui.
2. Šlapime nustatomų miR-148a ir miR-375 derinys yra jautrus molekulinis įrankis neinvazinei PV diagnostikai, o miR-19b ir miR-19a/b derinys specifiskai prognozuoja biocheminę ligos progresiją.
3. Šlapime nustatomų miR-375 ir -429 derinys specifiskai atskiria KAPV nuo PV ir kontrolinių tiriamųjų grupių.
4. Abiraterono acetatu (AA) gydomiems ligoniams šlapime nustatoma miR-148 prognozuoja išgyvenamumą be progresijos, o miR-148a ir miR-375 derinys – bendrąjį išgyvenamumą.
5. Didesnė AR-V1 ir -V7 raiška navikiniuose audiniuose būdinga agresyvios eigos PV, be to, AR-V7 raiška prognozuoja biocheminę ligos progresiją po radikalios prostatektomijos.
6. Didesnis KAPV kraujyje nustatytas AR-FL ir -V1 transkriptų kiekis AA gydomų ligonių kraujyje prognozuoja trumpesnę išgyvenamumą be progresijos ir bendrąjį išgyvenamumą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Prostatos vėžys

1.1.1. Prostatos anatomija ir patologija

Prostata (arba priešinė liauka) yra graikinio riešuto dydžio ($3 \times 3 \times 5$ cm) neporinė vyrų lytinė liauka, gaminanti skystį, įeinantį į sėklos sudėtį. Prostata šlapimo pūslės apačioje gaubia šlaplę ir siekia tiesiąją žarną. Nors nėra ryškaus suskirstymo į skiltis kaip, pvz., pelėse, išskiriamos kelios zonos: centrinė, pereinamoji/tranzitinė (angl. *periurethral transition*) ir periferinė (1.1 pav.). Pastaroji yra pati didžiausia ir iš jos į šlaplę atsiveria 15–30 latakų [Timms, 2008].



Zonos:
a Centrinė
b Pereinamoji
c Periferinė

	Prostatos zonos		
	Periferinė	Pereinamoji	Centrinė
Gerybinė prostatos hiperplazija			
Aukšto laipsnio PIN			
Karcinoma			

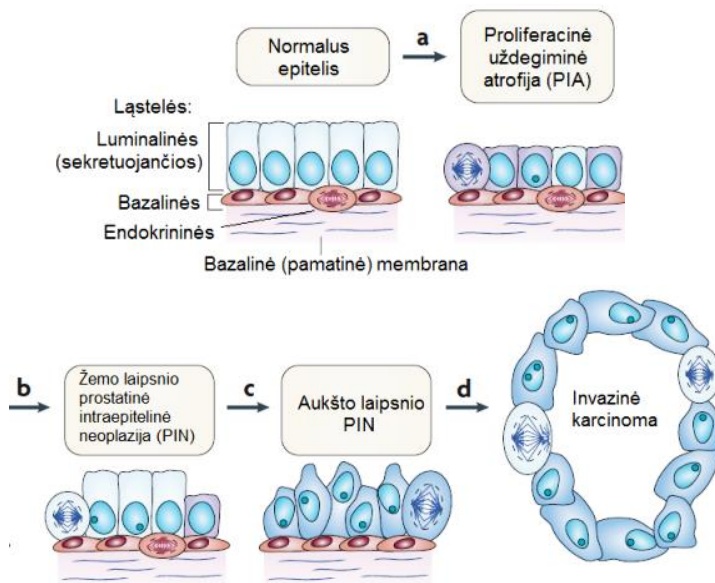
Kaip dažnai nustatoma:		Labai dažnai		Nedažnai
		Vidutiniškai dažnai		Nenustatoma

1.1 pav. Prostatos zoninė sandara, ligos ir ligų pasiskirstymas zonose (pritaikyta pagal De Marzo ir kt., 2007). PIN – prostatinė intraepitelinė neoplazija.

Histologiškai prostatos epitelį sudaro luminalinio, bazalinio ir neuroendokrininio tipo ląstelės, o zoninis pasiskirstymas ir histologinė sandara glaudžiai siejasi su pagrindiniais prostatos susirgimais (1.1 pav.).

- **Gerybinė prostatos hiperplazija (GPH)** – dažnas vyresnių vyrų neonkologinis susirgimas, kuris vystosi pereinamojoje zonoje. Prostate padidėja ir ima spausti šlaplės kanalą, taip sukeldama įvairius simptomus, iš kurių plačiausiai žinomas yra sutrikęs šlapinimasis. GPH vystymosi priežastys išlieka neaiškios, bet žinoma, kad įtakos turi pakitusi hormonų pusiausvyra senstant, uždegiminio atsako keliai [Kahokehr ir Gilling; 2014]. Iš GPH negali išsivystyti PV, nes šie susirgimai vystosi skirtingose prostatos zonose.

- Dėl pasikartojančių prostatos pažeidimų, infekcijų, citotoksinų ir kitų endogeninių ar išorinių veiksnių, į prostatos audinį infiltravę limfocitai, makrofagai ir neutrofilai į aplinką išskiria reaktyvias deguonies formas (ROS, nuo angl. *reactive oxygen species*), sukeliančias DNR pažeidimus, ląstelių pažeidimus bei mirtį [Vral ir kt., 2012]. Audinio pažeidimas ir ląstelių praradimas skatina epitelio atsinaujinimą, dėl to periferinėje prostatos dalyje nustatoma **proliferacinė uždegiminė atrofija (PIA)** (nuo angl. *proliferative inflammatory atrophy*) (1.2A pav.). Tai atrofines sritys, kuriose intensyviai vyksta ląstelių dalinimasis [De Marzo ir kt., 2007]. Jei tokios ląstelės ir toliau dauginasi DNR pažeidimas sukeliančioje, ROS gausioje aplinkoje, PIA gali progresuoti į prostatinę intraepitelinę neoplaziją (PIN).



1.2 pav. Prostatos vėžio vystymosi etapai (pritaikyta pagal De Marzo ir kt., 2007, paaiškinimai tekste).

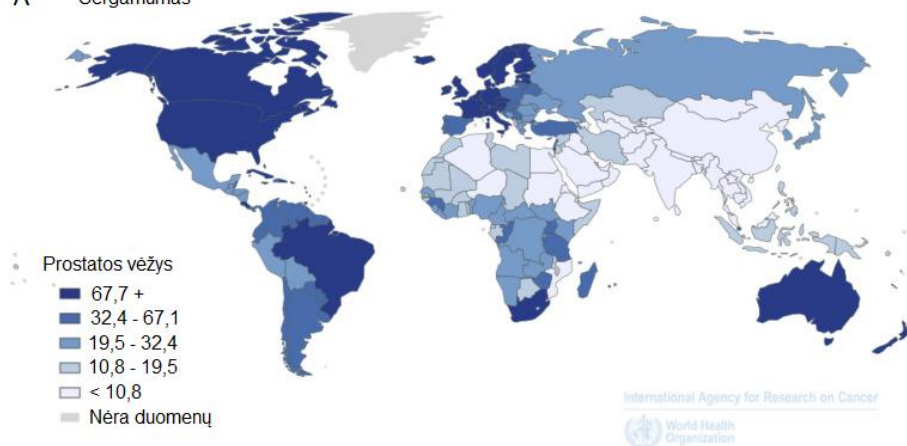
- **Prostatinė intraepitelinė neoplazija (PIN)** nuo angl. *prostatic intraepithelial neoplasia*), manoma, yra pradinė PV vystymosi stadija [De Marzo ir kt., 2003] (1.2B-C pav.). Tai prostatos ląstelių formos ir dydžio pokyčiai, histologiškai apibūdinami kaip luminalinių ląstelių hiperplazija, kai sumažėja bazalinio tipo ląstelių skaičius (bet, kitaip nei prostatos vėžio atveju, jų yra), stebimi padidėję, atipiški, neteisingai nusidažantys branduoliai (angl. *hyperchromasia*) ir branduolėliai. Pacientams su aukšto laipsnio PIN nustatoma išaugusi ląstelės proliferacinių žymenų raiška. Palyginus su PV, PIN iš epitelio neišplinta į kitas prostatos zonas ar už jos ribų (1.1 pav.), tačiau tokiam asmeniui rizika susirgti PV yra didesnė, todėl jam reguliariai turi būti atliekami papildomi tyrimai.

- **Prostatos vėžys (PV) arba prostatos adenokarcinoma** – liaukinių prostatos ląstelių supiktybėjimas, dažniausiai nustatomas periferinėje prostatos zonoje (1.1 pav. ir 1.2D pav.). Nors fenotipiškai PV labai skirtingas, histologiškai >95 % atvejų nustatoma luminalinio tipo adenokarcinoma, likusią dalį sudaro smulkiųjų ląstelių karcinoma, sarkoma ir kt. Palyginus su kitų lokalizacijų epiteliniais navikais, PV atveju neišskiriami histopatologiniai subtipai, kuriais remiantis būtų galima prognozuoti ligos eigą ir atsaką į gydymą. Didžioji dalis navikų (90 %) randama pačioje prostatoje, vis dar neišplitę į aplinkinius audinius ir organus, todėl gydymas yra gana sėkmingas. PV metastazės nustatomos limfmazgiuose, plaučiuose, kepenyse, smegenyse, tačiau dažniausiai – kauluose, dėl to ligos progresija nustatoma atlikus dubens, šonkaulių, stuburo kaulų rentgeno tyrimus.

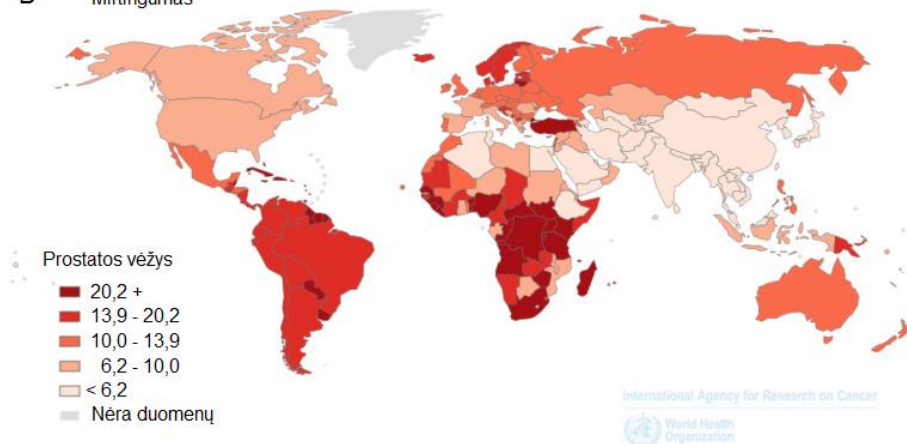
1.1.2. Prostatos vėžio epidemiologija

Prostatos vėžys (PV) yra vienas dažniausių onkologinių susirgimų pasaulyje ir antra pagal dažnumą vyrų mirties priežastis nuo vėžio vakarų pasaulyje [Bray ir kt., 2018; Ferlay ir kt., 2019] (1.3 pav.). Lietuvoje kasmet užregistruojama apie 2000 naujų susirgimo ir apie 500 mirties nuo PV atvejų (Lietuvos vėžio registro duomenys, pagal internetinę nuorodą <https://www.nvi.lt/naujausi-duomenys/>).

A Sergamumas



B Mirtingumas



1.3 pav. Sergamumo (A) ir mirtingumo (B) nuo prostatos vėžio geografinis pasiskirstymas pasaulyje (pritaikyta pagal Ferlay ir kt., 2015). Duomenys standartizuoti pagal ligonių amžių ir perskaičiuoti 100000 gyventojų.

1.1.3. Prostatos vėžio rizikos veiksniai

Nors nustatyta, kad PV vystymuisi reikšmės gali turėti nesubalansuota mityba (riebus maistas, mėsos produktai), žalingi įpročiai (alkoholio vartojimas, rūkymas), ligos istorija (hormonų pusiausvyros sutrikimas, prostatos uždegimas, vazektomija, įvairios lytiniu keliu perduodamos ligos), pagrindiniais PV rizikos veiksniais išlieka amžius, šeiminė ligos istorija ir rasė (pagal internetinę prieigą: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>):

- **Amžius.** Rizika susirgti PV didėja su amžiumi: dažniausiai PV diagnozuojamas ~65–75 m. amžiaus vyrams, o dažniausiai mirštama sulaukus >75 m. Vyresniems kaip 40 m. vyrams tikimybė susirgti PV yra 1 iš 500, >50 m. – 1 iš 50, >60 m. – 1 iš 14, >70 m. – 1 iš 9.

- **Rasė.** Skaičiuojant visai gyvenimo trukmei, vidutinė tikimybė susirgti yra maždaug 1 vyrui iš 6, bet analizuojant atskirai rasėse rodikliai skiriasi dvigubai: baltaodžiams tikimybė susirgti PV yra 1 iš 8, o afroamerikiečiams – 1 iš 4. Nustatyta, kad afroamerikiečiai PV serga maždaug 60 % dažniau nei baltaodžiai. Aukščiausi PV sergamumo rodikliai nustatomi Šiaurės Amerikoje, šiaurės Europoje, Australijoje, o žemiausi – Afrikoje, Azijoje, Pietų Amerikoje. Nors susirgimo dažnis tarp regionų gali skirtis iki 100 kartų, labiausiai skirtumus lemia ekonominis ir medicinos lygis.

- **Šeiminiai susirgimai.** Jei PV buvo diagnozuotas šeimoje (tėvui, broliui), tikimybė susirgti šeimos nariui yra 2–3 kartus didesnė. Riziką didina diagnozė jauname amžiuje bei susirgimas ir kitomis onkologinėmis ligomis.

1.1.4. Prostatos vėžio patloginės charakteristikos

PV dažniausiai nustatomas vyresniems nei 50 m. vyrams atliekant prostatai specifinio antigeno (PSA) testą (aprašyta žemiau) arba vykdant digitalinį rektalinį tyrimą (DRE, nuo angl. *digital rectal examination*), kai apčiuopos per išangę metu prostatoje aptinkama netipiškų sukietėjimų, pakitimų. Nustačius aukštesnę PSA koncentraciją ir/ar netipiškus darinius, imama biopsija, ir vertinama PV stadija. PV į stadijas skirstomas pagal 3 kriterijus: naviko išplitimo laipsnį, PSA kiekį kraujyje ir *Gleason* balą:

1. Naviko išplitimo laipsnis nustatomas pagal **TNM sistemą** – naviko išplitimą pačioje prostatoje (T, nuo angl. *Tumor*) ir metastazavimą į limfmazgius (N, nuo angl. *Node*) bei kitus organus (M, nuo angl. *Metastasis*)

[Cheng ir kt., 2012]. Detalus naviko išplitimo skirstymas pateiktas 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. TNM sistema, taikoma prostatos vėžio atveju (pagal internetinę prieigą <http://prostatecancer.about.com/od/symptomsanddiagnosis/a/tnmstaging.htm>)

Skirstymas ir požymiai	
T – Naviko dydis	
T0	Naviko nėra
T1	Navikas nerastas pirminės apžiūros metu, tačiau aptiktas ištyrus biopsijos medžiagą ar operacijos metu, o vėžinės ląstelės surado: a – ≤5 % paimto audinio; b – >5 % paimto audinio; c – navikas aptiktas esant padidėjusiam PSA kiekiui atlikus biopsiją
T2	Navikas neišplitęs už prostatos ribų ir nustatomas: a – ≤50 % vienos skilties; b – >50 % vienos skilties; c – abiejose skiltyse
T3	Navikas išplitęs už priešinės liaukos kapsulės ribų: a – išplitęs, bet sėklinės pūslelės nepažeistos; b – sėklinės pūslelės pažeistos
N – limfmazgių pažeidimas	
N0	Nepažeisti
N1	Pažeisti
M – metastazių buvimas	
M0	Metastazių nėra
M1	Metastazės nustatytos a – nutolusiuose limfmazgiuose; b – kauluose; c – kitoje kūno dalyje

Santrumpos: M – metastazės (angl. *metastasis*); N – metastazės limfmazgiuose (angl. *node*); PSA – prostatai specifinis antigenas; T – naviko dydis ir išplitimas (angl. *tumor*)

2. **Gleason (G) balas** – PV klasifikacijos sistema, kai remiantis mikroskopiniu vaizdu nustatomas PV diferenciacijos laipsnis. *Gleason* sistema buvo sukurta 1966 m. Donaldo F. Gleasono ir ISUP bendruomenės (angl. *International Society of Urological Pathology*), o peržiūrėta bei atnaujinta 2005 m. [Epstein ir kt., 2005] ir 2014 m. [Epstein ir kt., 2016]. Įvertį sudaro dviejų skaičių (nuo 1 iki 5) suma, kur didesnis skaičius reiškia blogiau diferencijuotą naviką. Ėmus taikyti *Gleason* sistemą, pirmas įvertis buvo skiriamas dažniausių, antras – antroje vietoje pagal dažnumą nustatytų

ląstelių diferenciacijos laipsnio įvertinimui. Tad $3 + 3 = 6$ įverčiai buvo skiriami geros diferenciacijos, o $5 + 5 = 10$ – blogos diferenciacijos, labiausiai pakitusiems navikams ir blogiausioms prognozėms apibūdinti. Po 2005 m. atnaujinimo antras įvertis skiriamas pagal blogiausios diferenciacijos lašteles, o po 2014 m. atnaujinimo įverčiai buvo apjungti į 5 grupes, kur $G \leq 6$ navikai priskiriami ISUP 1 grupei, G7 yra išskirstyti į 3 + 4 ir 4 + 3 ir priskiriami ISUP 2 bei ISUP 3 grupėmis, atitinkamai, $G = 8$ navikai patenka į ISUP 4, o $G > 9$ laikomi ISUP 5. Turint išsamesnius išgyvenamumo duomenis, kliniškai mažiausiai reikšmingais navikais laikomi ne tik ISUP 1 (buvę G6), bet ir ISUP 2 navikai, o dabartinė klasifikacijos sistema įgalina tą padaryti.

3. **Prostatai specifinis antigenas (PSA)**, dar žinomas kaip kalikreinas-3 (KLK3), yra nedidelis glikoproteinas, būdingas tik prostatai ir būtinas normaliam jos funkcionavimui. Normalus PSA kiekis kraujyje yra iki 3–4 ng/mL, o su patologija arba su PV siejamas PSA kiekio padidėjimas, kai PSA koncentracija yra >10 ng/mL. Nustačius PSA 4–10 ng/mL (vadinamoji „pilkoji zona“) PV tik įtariamas ir reikalingi papildomi tyrimai, kuriais remiantis būtų galima patvirtinti PV diagnozę. Atradus PSA ir ėmus vyresnio amžiaus vyrus tikrinti rutiniškai (angl. *PSA screening*), didesnė PSA koncentracija kraujyje vienareikšmiškai buvo siejama su PV. Dabar žinoma, kad didesnis PSA kiekis nustatomas ir kitų susirgimų atveju (GPH, prostatos uždegimo ir kt.), taip pat būdingas vyresniems vyrams, priklauso nuo etninės grupės, rasės [Adhyam ir Gupta, 2012] ir net gali būti susijęs su profesija (pvz., dviratininkams). Nors pritaikius PSA rutiniams tyrimams buvo nustatyta labai daug naujų PV atvejų, reikšmingai (iki 30 %) išaugo ir klaidingai teigiamų atvejų skaičius. Klaidingai teigiamiems atvejams atliekamos intervencinės procedūros ir operacijos, manoma, gali sukelti uždegimą ir paskatinti naviko piktybėjimą [Spans ir kt., 2013; Velonas ir kt., 2013]. Taip pat gali pablogėti gyvenimo kokybė (šlapimo nelaikymas, nepilnavertis lytinis gyvenimas ir kt.), gali kilti psichologinių problemų. Daugumai PV atvejų esant neagresyviems, tokius įtartinus atvejus pakanka tik stebėti. Be to, nustatyta, kad esant agresyviai PV fenotipui PSA koncentracija kraujyje kartais gali ir nepadidėti [Ather ir Siddiqui, 2012]. Dėl visų šių priežasčių intensyviai ieškoma naujų molekulinį žymenų, kuriuos kuo mažiau invaziniu būdu būtų galima nustatyti skysčių biopsijoje (kraujyje, šlapime) ir jais pakeisti ar papildyti PSA testą, tokiu būdu atidžiai sekant ligos pokyčius, o ligoniams sukelti kuo mažiau skausmo ir diskomforto.

Remiantis TNM sistema, *Gleason/ISUP* įverčiai ir PSA koncentracija kraujyje, prostatos vėžys skirstomas į 4 stadijas (1.2 lentelė).

1.2 lentelė. Prostatos vėžio stadijos (pritaikyta pagal Cheng ir kt., 2012; patikslinta pagal *Prostate Cancer Stages and Other Ways to Assess Risk*; internetinė prieiga: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>)

PV stadija	T	N	M	ISUP grupė	PSA konc. (ng/mL)
I	cT1	N0	M0	1	<10
	cT2a			1	<10
	pT2			1	<10
IIA	cT1	N0	M0	1	10–20
	cT2a / pT2			1	10–20
	cT2b / cT2c			1	<20
IIB	T1–2	N0	M0	2	<20
IIC	T1–2	N0	M0	3–4	<20
IIIA	T1–2	N0	M0	1–4	Bent 20
IIIB	T3–4	N0	M0	1–4	Bet kokia
IIIC	Bet koks	N0	M0	5	Bet kokia
IVA	Bet koks	N1	M0	Bet kokia	Bet kokia
IVB	Bet koks	Bet koks	M1	Bet kokia	Bet kokia

Santrumpos: ISUP – angl. *International Society of Urological Pathology*; M – metastazės (angl. *metastasis*); N – metastazės limfmazgiuose (angl. *node*); PSA – prostatai specifinis antigenas; PV – prostatos vėžys; T – naviko dydis ir išplitimas (angl. *tumor*).

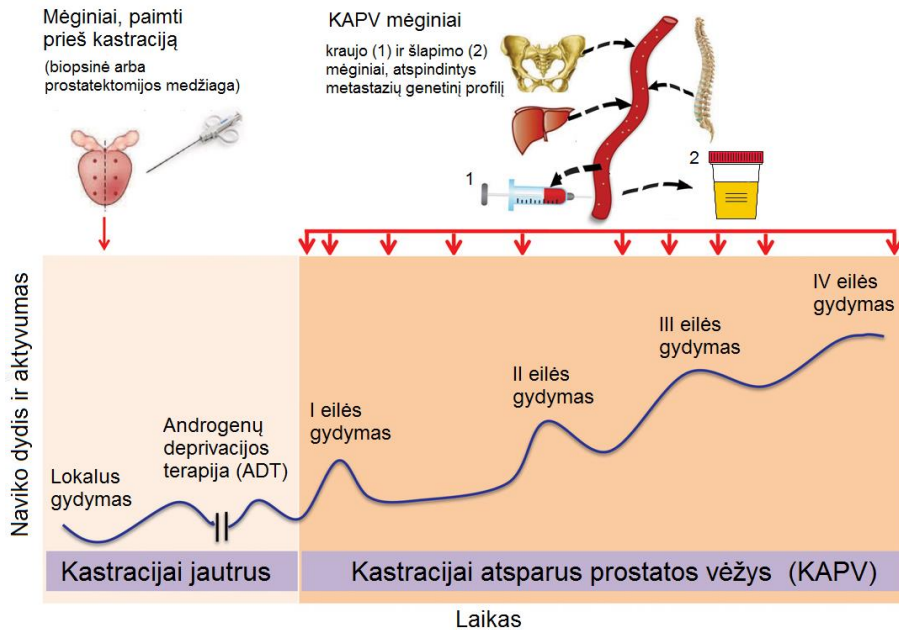
1.1.5. Kastracijai atsparaus PV vystymasis

PV laikomas daugiažidiniu, nes navikuose nustatomi nepriklausomi daugybiniai, histologiškai ir genetiškai skirtingi navikiniai židiniai [Serenaite ir kt., 2015]. PV heterogeniškumas gali paaiškinti skirtingą klinikinę eigą ir skirtumus tarp kliniškai reikšmingo ir mažos rizikos PV. Nors PV yra vyresnių vyrų liga, piktybiniai histologiniai pakitimai nustatomi analizuojant 20–40 m. sveikų vyrų prostatos biopsijos pjūvius, o tai rodo, kad PV ima vystytis santykinai jauname amžiuje. Išanalizavus autopsijos rezultatus paaiškėjo, kad trečdalis >70 m. ir pusė >80 m. baltaodžių vyrų serga mažos rizikos PV [Jahn ir kt., 2015].

Nustačius pažengusį PV ir/ar įtariant agresyvią ligos eigą, atliekama prostatektomija – pašalinamas navikas arba visa prostata (radikali prostatektomija, RP), o po operacijos ligoniai turi reguliariai tikrintis, ar liga neatsinaujino. Pagrindinis stebėjimo rodiklis yra PSA kiekis kraujyje: nustačius $\geq 0,2$ ng/mL koncentraciją, laikoma, kad liga atsinaujino ir konstatuojama biocheminė ligos progresija arba atkrytis (BCR nuo angl. *biochemical disease progression*). Jei ligoniui buvo atlikta RP, o PSA koncentracija auga, vadinasi, liga yra išplitusi už prostatos ribų, o PSA produkuoja metastazės. Ankstyva progresija konstatuojama ligai atsinaujinus per 3 mėn., o įtarus agresyvų PV fenotipą ir išplitusią ligą, iškart po RP turėtų būti skiriamas papildomas (adjuvantinis) gydymas, tačiau kol kas agresyviam PV fenotipui atskirti trūksta jautrių molekulinų biožymenų.

Kadangi prostatos vėžys yra priklausomas nuo hormonų androgenų, nustačius BCR, ligoniui skiriamas gydymas, mažinantis androgenų kiekį organizme – hormonų arba androgenų deprivacijos terapija (ADT, nuo angl. *androgene deprivation therapy*). Skiriami du pagrindiniai gydymo būdai: 1) chirurginė kastracija, kai pašalinamos abi sėklidės, arba 2) medicininė/cheminė kastracija, kai androgenų kiekis mažinamas vaistais. Jei/kai PSA koncentracija ir toliau didėja, konstatuojamas kastracijai atsparus prostatos vėžys (KAPV) ir skiriami chemoterapiniai preparatai, antiandrogenai (AA, ENZ ir kt.), imunoterapija, Radžio-223 dichloridas ir kt., o jei ligonio būklė yra per sunki, skiriamas paliatyvusis gydymas. Gydymui priskiriama eilė ir jis tęsiamas tol, kol nepasireiškia du iš trijų stebimų kriterijų: biocheminė (didėjanti PSA koncentracija kraujyje), radiologinė progresija (nauji ar padidėję metastaziniai židiniai) ar nustatomas bendras klinikinės būklės pablogėjimas. Šiuos klinikinius tyrimus galėtų papildyti šiuo metu populiarėjanti skysčių biopsija – molekulinų žymenų tyrimas prieš gydymą ir jo eigoje reguliariai

renkamuose ligonių kūno skysčiuose (šlapime, kraujyje). Kadangi metastazių biopsinę medžiagą paimti labai sunku, o PV dažniausiai metastazuoja į kaulus, stebėti ligos vystymąsi ir vertinti atsaką į gydymą būtų galima pagal kraujyje ir šlapime cirkuliuojančias naviko nukleorūgštis (CNN) ir kraujyje cirkuliuojančias vėžio ląsteles (CVL), kurios atspindi situaciją pirminiuose navikuose ir metastazėse (1.4 pav.).



1.4 pav. Kastracijai atsparaus prostatos vėžio (PV) vystymasis ir gydymo bei tyrimų strategija. I–IV ir tolimesniems gydymo etapams įvairiu eiliškumu taikomas ir kartojamas gydymas abiraterono acetatu, enzalutamidu, docetakseliu, kabazitakseliu, o skysčių biopsijos mėginiai (kraujas, šlapimas), imami prieš gydymą ir gydymo eigoje.

1.2. miRNR

mikroRNR arba miRNR (angl. *microRNA*, *miRNA*) yra trumpos, apie 22 nt ilgio, baltymo nekoduojančios RNR molekulės, kurios dalyvauja genų raiškos reguliacijoje, specifiskai prisijungdamos prie informacinės RNR (iRNR). Šiuo metu žinoma apie 2600 subrendusių žmogaus miRNR [*miRBase*, pagal internetinę nuorodą <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>], o daug ląstelėje vykstančių procesų, pvz., dauginimasis, diferenciacija, metabolizmas, žūtis ir kt., manoma, yra reguliuojama pasitelkiant miRNR [Cozar ir kt., 2019]. miRNR susilaukė labai didelio mokslininkų dėmesio, nes netrukus po atradimo buvo nustatyta, kad iki 60 % žmogaus baltymus koduojančių iRNR transkriptų raiška bent dalinai priklauso nuo prie jų besijungiančių miRNR [Catto ir kt., 2011].

1.2.1. miRNR biogenezė

miRNR yra endogeninės molekulės – jas koduoja pats organizmas. miRNR genai, kurie vadinami *MIR*, nustatomi visame genome: ne tik baltymus koduojančių genų intronuose (tokios miRNR vadinamos mirtronais) ir baltymų nekoduojančių genų egzoninėse ir introninėse dalyse, bet ir transpozoninėse DNR sekose bei pasikartojančiuose genomo elementuose [Lee, 2013]. miRNR genų įvairovei didelės įtakos turėjo genų duplikacijos, kurios nulėmė *MIR* genų klasterinį išsidėstymą ir policistroninę pirminių transkriptų struktūrą [Kim ir kt., 2006].

Kanoninė miRNR biogenezė skirstoma į žemiau pateiktus etapus ir vaizduojama 1.5 pav.:

- **pri-miRNR** – pirminis miRNR transkriptas, kurio transkripciją vykdo RNR polimerazė Pol II, pagrindinė baltymus koduojančių genų polimerazė. Kelis šimtus nukleotidų siekiantis transkriptas yra labai panašus į iRNR transkriptus, nes 5' gale yra kepurė, o 3' galas poliadenilintas. Pasikartojančios, dažnai priešingai išsidėsčiusios *MIR* sekos nulemia pri-miRNR transkriptams būdingą plaukų segtuko antrinę struktūrą (angl. *hairpin*). Tokias struktūras atpažįsta ir į „pavienius smeigtukus“ skelia branduolio mikroprocesorius, sudarytas iš nukleazės Pasha ir pagalbinio baltymo DGCR8, dar vadinamo Drosha.

- **pre-miRNR** – tarpinis plaukų segtuko formos ~60–70 nt ilgio miRNR brendimo produktas, atskeltas Pasha/Drosha komplekso. Pre-miRNR tolimesniam brendimui iš branduolio į citoplazmą perneša baltymas Eksportinas-5.

- **miRNR dupleksas** – miRNR brendimo produktas, kuris susiformuoja nukleazei Dicer citoplazmoje nuskeliant smeigtuko galvutę Eksportino-5 perneštai pre-miRNR. miRNR dupleksą sudaro dvigrandinė ~22 nt ilgio RNR molekulė, kurią išvyniojus viena seka pasirenkama ir gali jungtis į genų raišką slopinantį nukleoproteininį kompleksą RISC (angl. *RNR-induced silencing complex*).

- **subrendusi miRNR** – viengrandinė miRNR seka, kartu su Argonautų šeimos baltymais sudaranti RISC nukleoproteininį kompleksą. Nepasirinkta seka (angl. *passenger*) paprastai suskaidoma, bet tikslus miRNR grandinės pasirinkimas nėra iki galo išaiškintas [Willard ir Koochekpour, 2012].

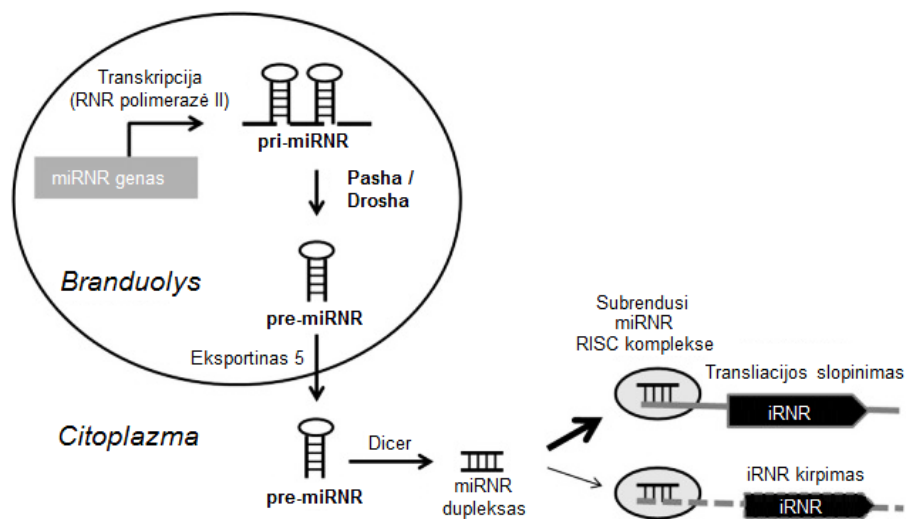
Priklausomai nuo ląstelės tipo, tam tikros rūšies miRNR ar jos reguliacinių mechanizmų, miRNR gali susidaryti ir alternatyviu, nekanoniniu, būdu. Nekanoninei miRNR biogenezei dažniausiai trūksta kurio nors baltymo, dėl to kelias vadinamas atitinkamai nuo to baltymo priklausomu ar nepriklausomu. Pavyzdžiui, miRNR susidarant iš iškirptų intronų (jau minėti mirtronai), susidariusi struktūra yra panaši į pre-miRNR, kurią atpažįsta Eksportinas-5 ir Dicer, taigi miRNR bręsta nuo Drosha nepriklausomu būdu [Lee, 2013].

1.2.2. miRNR veikimo mechanizmai

miRNR genų raišką veikia prisijungdamos prie netransliuojamo iRNR transkripto 3' galo ir inicijuodamos taikinio kirpimą arba slopindamos jo transliaciją. miRNR ir baltymų komplekso prisijungimas prie iRNR gali veikti ir kaip tiesioginė kliūtis, trukdanti jungtis ribosomoms ir vykdyti baltymų transliaciją, ir kaip žymė transkripto „nukepurinimui“ ir po to sekančiam suskaldymui. Konkrečiu atveju miRNR aktyvumas priklauso nuo 2–8 nt reguliacinio regiono sekos (angl. *seed region*) ir taikinio atitikimo (komplementarumo) lygio: kuo didesnis atitikimas, tuo didesnė tikimybė, kad RNR transkriptas bus kerpamas [Willard ir Koochekpour, 2012; Goodall ir kt., 2013] (1.5 pav.).

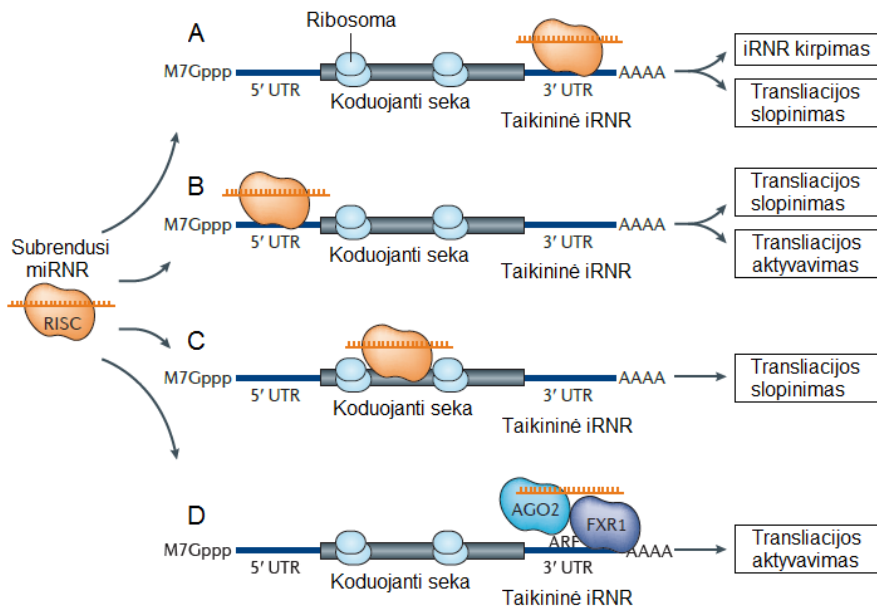
miRNR reguliacija yra labai sudėtingas procesas. Esant nepilnam atitikimui, viena miRNR turi daugybę taikinių, o prie vieno iRNR transkripto gali jungtis daug miRNR [Bartel, 2009]. Parodyta, kad svarbiausius ląstelėje vykstančius procesus valdančių genų transkripcija yra daug aktyvesnė nei transliacija. Vadinas, ląstelė neieško energijos tuo metu nereikalingų baltymų sintezei ir/ar suardymui, o susikuria savotišką

buferinę sistemą, kurioje svarbų vaidmenį transkriptų lygmenyje atlieka miRNR [Tong ir Nemunaitis, 2008].



1.5 pav. miRNR biogenezė (pritaikyta pagal Goodall ir kt., 2013).

Nors jungimasis prie netransliuojamos iRNR 3' srities laikomas pagrindiniu mechanizmu (1.6A pav.), galimi ir kiti miRNR prisijungimo ir veikimo būdai. Esant sekų atitikimui, RISC kompleksas gali jungtis ir kitose vietose: transkripto atviro skaitymo rėmelyje, 5' netransliuojamoje transkripto dalyje ar net geno promotoriuje. Tokiais atvejais miRNR nebūtinai atlieka geno raiškos slopinimo funkciją, bet, pavyzdžiui, jungdamasi prie promotoriaus gali konkuruoti dėl prisijungimo vietos su transkripciją slopinančiais baltymais ir tokiu būdu paskatinti genų raišką [Place ir kt., 2008]. Kad jungtųsi prie promotoriaus, miRNR turi būti branduolyje, ir eksperimentiškai toks miRNR pernešimas atgal į branduolį yra parodytas [Hwang ir kt., 2007]. Jungdamasi prie 5' netransliuojamos transkripto dalies, miRNR gali ir skatinti, ir slopinti transkripto transliaciją (1.6B pav.), o jungdamasi atviro skaitymo rėmelyje transliaciją slopina (1.6C pav.). Kai kurios miRNR geba sąveikauti su reguliaciniais baltymais, pvz., FXR1 (nuo angl. *Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1*), ir tokiu būdu aktyvinti taikinio raišką (1.6D pav.).

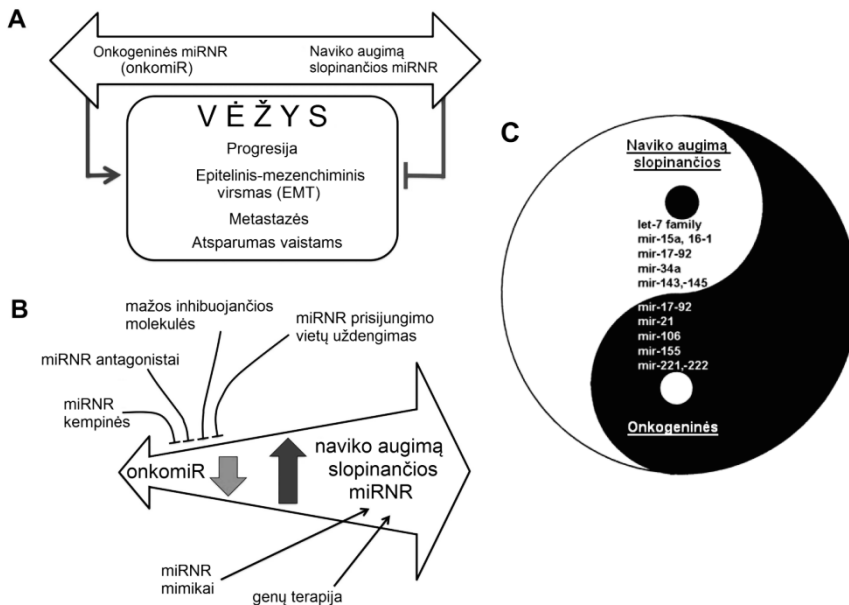


1.6 pav. Galimi miRNR veikimo mechanizmai, kai miRNR ir baltymai (RISC kompleksas) jungiasi prie transkripto (A) 3' galo netransliuojamos srities (3'UTR), (B) 5'UTR srities, (C) atviro skaitymo rėmelyje ir (D) 3'URT, bet ne slopina transkripto translaciją, o ją aktyvina. M7Gppp – 5' gale esanti ir transkriptą apsauganti „kepurė“ (pritaikyta pagal Ling ir kt., 2013).

1.2.3. miRNR ir vėžys

Netrukus po miRNR atradimo buvo išsiaiškinta, kad tam tikrų miRNR raiška vystantis vėžiui padidėja, kitų sumažėja, o miRNR raiškos profilis yra specifinis vėžio tipui bei priklauso nuo naviko histologinio tipo, stadijos, ir kt. miRNR, kurių raiška išauga daugumos lokalizacijų vėžio atvejais, imtos vadinti onkogeninėmis miRNR arba onkomiR, o miRNR, kurių raiška sumažėja – naviko augimą slopinančiomis [Gambari ir kt., 2016], o ląstelėje vykstantys procesai buvo priskirti jų reguliacijai (1.7A pav.) [Stähler ir kt., 2012; Walter ir kt., 2013]. Atlikus daugiau tyrimų paaiškėjo, kad ryškios ribos brėžti negalima, nes tos pačios miRNR, priklausomai nuo vėžio tipo, gali būti ir skatinančios, ir slopinančios kancerogenezę (pvz., priklausančios miR-17-92 klasteriui). Šis fenomenas kartais vaizduojamas *yin yang* modeliu (1.7C pav.) [Tong ir Nemunaitis, 2008]. Priklausomai nuo sutrikusios miRNR funkcijos tam tikro vėžio atveju, siūloma daugybė miRNR panaudojimo būdų gydymui (1.7B pav.). Onkogenines miRNR siūloma slopinti miRNR antagonistais, mažomis inhibuojančiomis molekulėmis ar dirbtinėmis RNR molekulėmis – miRNR kempinėmis (angl. *miRNA*

sponges), turinčiomis daug miRNR prisijungimo vietų ir gebančiomis konkurencingai atitraukti miRNR nuo taikinių, arba uždengiančiomis taikinio vietas (angl. *miRNA mask*). Padidinti naviko augimą slopinančių miRNR raišką galima naudojant identiškąs sintetines miRNR – miRNR mimikus – ar taikant genų terapiją [Gambari ir kt., 2016].



1.7 pav. miRNR ir vėžys. Dvejos miRNR funkcijos vystantis vėžiui (A); miRNR biologinio aktyvumo atstatymo ir panaudojimo gydymui būdai (B) (pritaikyta pagal Gambari ir kt., 2016).

Vystantis vėžiui miRNR raiška gali būti pakeičiama daug skirtingų būdų:

- **Chromosomų aberacijos** – didžiausią įtaką miRNR raiškai daranti pažaida. Nustatyta, kad apie pusė *MIR* genų yra išsidėstę su vėžiu siejamuose, nestabiliuose genomo regionuose, kuriuose yra „lūžios“ sritys, vyksta virusų (pvz., žmogaus papilomos viruso) integracija, prarandamas heterozigotiškumas ir kt. [Callin ir kt., 2004]. Dažni ir genų skaičiaus pokyčiai (CNV, nuo angl. *copy number variation*), kai priklausomai nuo vėžio tipo ir miRNR nustatoma *MIR* genų amplifikacija arba delecija. Pavyzdžiui, plaučių vėžio atveju randama daugiau onkogeninių miRNR (miR-21, miR-17, miR-155) genų kopijų [Czubak ir kt., 2015]. Ir priešingai, leukemijų atveju dažnai nustatoma 13q14 lokuso ir jame esančių miR-15/16 delecija [Lovat ir kt., 2018].

- **miRNR brendimo** pokyčiai taip pat nustatomi daugelyje vėžio atvejų. Tarp vėžinių ir sveikų ląstelių nenustačius miRNR transkripcijos pokyčių, bet radus reikšmingai mažiau subrendusių miRNR, sumažėjimas buvo susietas su *DROSHA* praradimu [Thomson ir kt., 2006]. Plaučių vėžio atveju sumažėjęs Dicer aktyvumas lėmė mažesnę let-7 raišką [Karube ir kt., 2005], ir atvirkščiai, tiriant onkogenines miRNR buvo rasta daugiau miRNR brendimui reikalingų *DICER1* ir *DROSHA* genų kopijų [Czubak ir kt., 2015].

- Sutrikusi **epigenetinė reguliacija** taip pat labai svarbi, nes iki 50 % *MIR* genų siejama su CpG salomis ir DNR metiliniu [Saestrom ir kt., 2007]. Pakitus DNR metilinimui, keičiasi miRNR genų raiška: plaučių vėžio atveju nustatyta išaugusi miR-21 raiška, susieta su tos srities hipometiliniu, o plaučių, krūties, gaubtinės žarnos navikuose radus miR-124a raiškos sumažėjimą, nustatytas miRNR ar miRNR geno-šeimininko (angl. *miRNA host gene*) promotoriaus hipermetilimas.

1.2.4. Organizmo skysčių miRNR ir vėžys

Kaip jau minėta, miRNR raiškos profilis ne tik yra specifinis audiniui, bet ir keičiasi priklausomai nuo fiziologinių sąlygų ir ligų, pvz., prostatos vėžio, taip pat priklauso nuo ligos agresyvumo bei kinta ligai progresuojant [Nguyen ir kt., 2013; Watahiki ir kt., 2013]. Susidomėjimas miRNR ženkliai padidėjo išsiaiškinus, jog vėžiui specifiniai miRNR raiškos pokyčiai gali būti nustatomi kūno skysčiuose. Manoma, kad miRNR užląstelinėje aplinkoje randamos ne atsitiktinai, o veikia kaip signalinės molekulės, nes yra specialiai išskiriamos vienu ir paimamos kitų ląstelių [Lee, 2013]. Nepaisant to, kad miRNR yra ribonukleorūgštys, šios molekulės yra labai stabilios, nes apie 90 % miRNR yra susijungusios su baltymais (Ago2, HDL ir kt.) [Zhu ir Fan, 2011], o apie 10 % miRNR cirkuliuoja supakuotos į mažas pūsleles, pvz., egzomas. Dėl šių priežasčių miRNR išlieka atsparios nukleazių poveikiui ir yra randamos įvairiuose organizmo skysčiuose [Weber ir kt., 2010].

Prostatos vėžio atveju miRNR tyrinėjamos tokiuose organizmo skysčiuose kaip kraujas [Selth ir kt., 2012; Cheng ir kt., 2013; Nguyen ir kt., 2013; Huang ir kt., 2015], šlapimas [Corcoran ir kt., 2014; Stuopelyte ir kt., 2016a; Stuopelyte ir kt., 2016b] ar prostatos išskyros [Guzel ir kt., 2015]. Jau yra tyrimų, demonstruojančių šlapimo miRNR diagnostinę, prognostinę vertę bei panaudojimą atsako į gydymą prognozavimui ir terapijai [Xiao ir

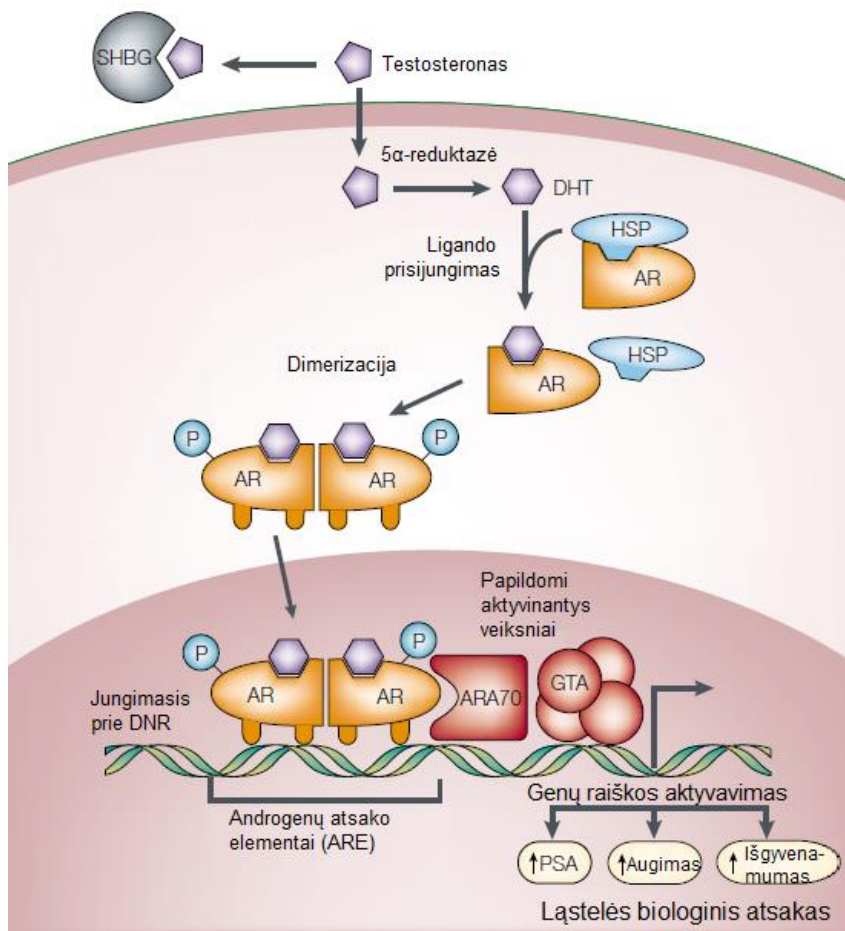
kt., 2013; Balacescu ir kt., 2017], todėl šlapime esančios miRNR yra labai tinkamas žymuo PV tyrimams.

1.3. Androgenų receptorius

1.3.1. Androgenų receptoriaus atsako kelias

Didžioji dalis androgeninių steroidų sintetunami sėklidėse ir tik nedidelė dalis –antinksčių liaukose [Feng ir He, 2019]. Vienas pagrindinių androgeninių hormonų yra testosteronas, iš kurio 5 α -reduktazė sintetina dihidrotestosteroną (DHT, angl. *dihydrotestosterone*) [Schmidt ir Tindall, 2011]. Šie ir kiti hormonai gali jungtis su androgenų receptoriais (AR). DHT būdingas didesnis giminingumas AR, dėl to tokiam pačiam genų transkripcijos iniciavimui užtenka mažesnio hormono kiekio [Lonergan ir Tindall, 2011].

AR yra 110 kDa baltymas, priklausantis branduolio steroidinių receptorių šeimai, po aktyvacijos veikiantis kaip transkripcijos veiksnys [Lonergan ir Tindall, 2011; Huang ir kt., 2018]. Kai citoplazmoje nėra ligandų (hormonų), AR sąveikauja su karščio šoko baltymais (HSP, angl. *heat-shock proteins*) [Feng ir He, 2019], ir tokio komplekso sudėtyje yra neaktyvus. Tačiau ligandui prisijungus prie AR, iš komplekso pašalinamas HSP, ir AR tampa aktyvus [Maughan ir Antonarakis, 2015; Huang ir kt., 2018]: įvyksta konformaciniai pokyčiai, AR homodimerizacija ir AR-ligando kompleksai pernešami į branduolį [Darshan ir kt., 2011]. Branduolyje AR jungiasi prie androgenų atsako elementų (ARE, angl. *androgen response elements*) – specifinių DNR sričių, dažniausiai esančių androgenų reguliuojamų genų promotoriuose. AR-DNR kompleksai pritraukia įvairius papildomus aktyvinančius veiksnius (angl. *coactivators*) ir inicijuojama transkripcija (1.8 pav.) AR atsako kelias yra būtinas normaliai prostatos ląstelės veiklai, nes jam sutrikus paveikiama ne tik su androgenais susijusių genų, tokių kaip *PSA*, raiška, bet ir raiška kitų genų, susijusių su ląstelės augimo, dalijimosi, migracijos bei ilgaamžiškumo procesais [Andersen ir kt., 2010; Lonergan ir kt. Tindall, 2011; Huang ir kt., 2018].

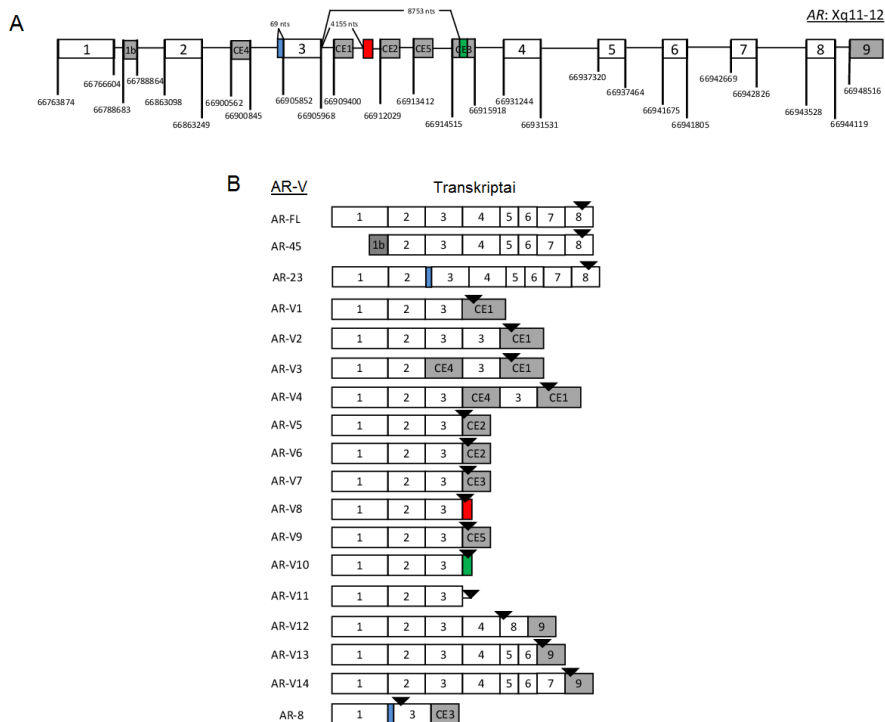


1.8 pav. Androgenų receptoriaus (AR) atsako kelias (pritaikyta pagal Feldman ir Feldman, 2001). Visi paaiškinimai tekste, išskyrus SHBG – baltymas, iš kepenų krauju pernešantis lytinius hormonus ir palaikantis juos neaktyvioje formoje (angl. Sex hormone binding globulin).

1.3.2. Androgenų receptoriaus variantai

AR variantai (AR-V) – alternatyvaus splaisingo metu iš *AR* geno susidarantys transkriptai ir baltymo formos. Atliekant AR baltymo imunoanalizę, AR-V buvo matomi kaip mažesnės molekulinės masės juostos [Gregory ir Wilson, 2001]. Atlikus detalią analizę, paaiškėjo, kad šios baltymo formos neturi ligando prisijungimo domeno (LBD nuo angl. *ligand binding domain*), išsidėsčiusio 5–8 egzonuose [Gregory ir Wilson, 2001; Tepper ir kt., 2002]. Nesant LBD, AR-V yra nuolat aktyvūs ir yra siejami su atsparumu vaistams, nukreiptiems prieš AR atsako kelią [Antonarakis ir kt., 2014]. Vietoje įprastos nepakitusio AR-FL (angl. *full length AR*) transkripto

sekos, AR-V turi „slaptus“ arba kryptinius egzonus (CE, nuo angl. *cryptic exon*), kurie yra lokalizuoti AR geno introninėse dalyse ir paprastai į įprastinio AR-FL seką nepatenka, nes yra iškerpami (1.9A pav.). Dabar nustatyta apie 20 unikalių AR-V transkriptų, kurie skiriasi savo CE arba jų išsidėstymu (1.9B pav.).



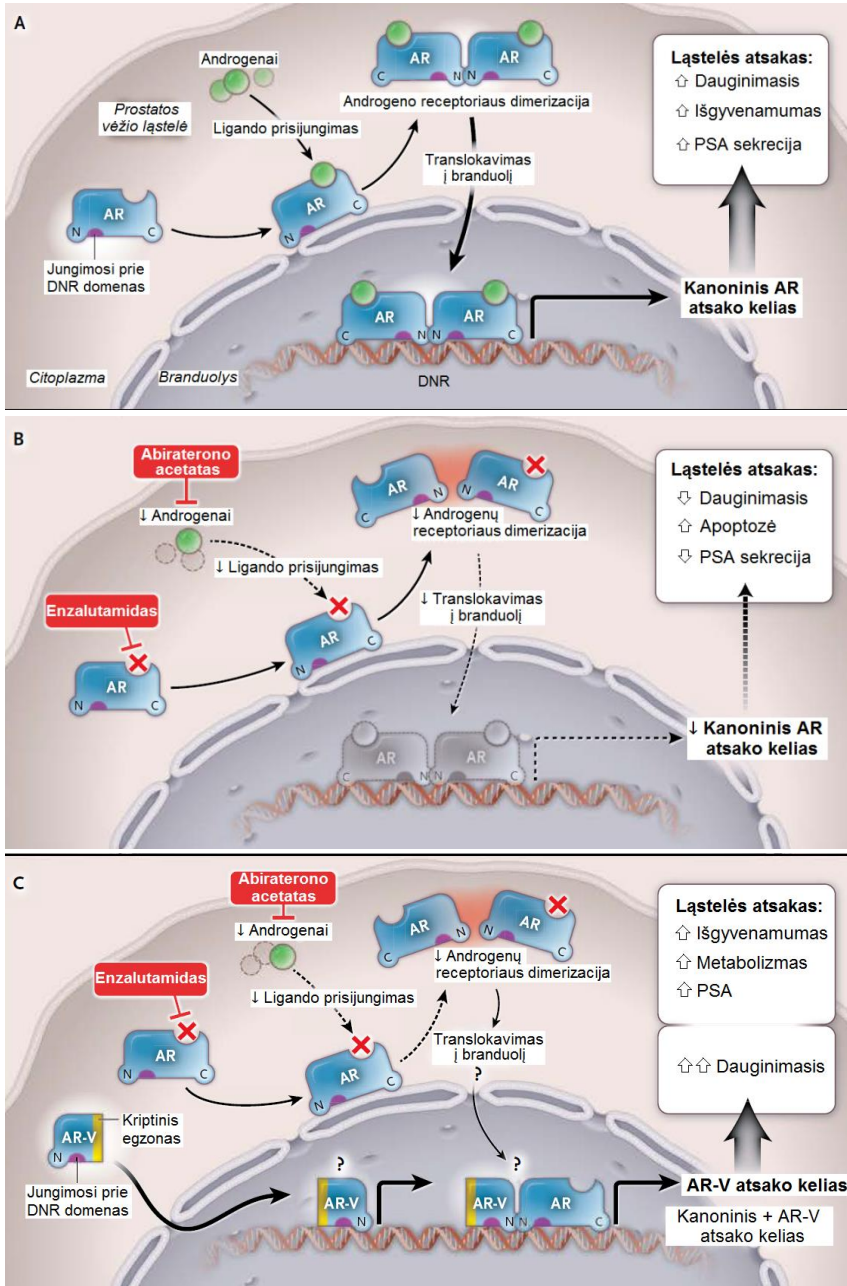
1.9 pav. Androgenų receptoriaus (AR) geno ir AR transkriptų variantų (AR-V) struktūra. (A) Viso ilgio AR geno schema, kurioje pagal hg19 žmogaus genomo anotaciją pažymėti įprasti (balti stačiakampiai) ir kryptiniai egzonus (pilki ir spalvoti stačiakampiai); (B) AR-V nomenklatūra ir egzoninė sudėtis (pritaikyta pagal Lu ir Luo, 2013).

1.3.3. AR-V ir kastracijai atsparus prostatos vėžys (KAPV)

KAPV vystymosi metu AR atsako kelias išlieka vienu svarbiausių reguliacinių mechanizmų. Medicinine ar medikamentine kastracija apribojus androgenus organizme, PV ląstelėse nebegali veikti prostatos ląstelei gyvybiškai svarbus AR atsako kelias ir kurį laiką PV vystymasis sulėtėja. Ląstelės patiria genetinį spaudimą, orientuotą į AR atsako kelią aktyvinančių mutacijų palaikymą, todėl KAPV dažnai nustatoma AR geno amplifikacija ir mutacijos reguliaciniuose AR baltymo domenuose (pvz., ligando prisijungimo domene, LBD), dėl kurių AR atsako kelias veikia ir nesant

androgenų. Dabar didelis dėmesys skiriamas AR variantams, kurie alternatyvaus splaisingo metu susiformuoja be LBD veikia ne tik be androgenų, bet ir yra visada aktyvūs.

Esant androgenų, PV ląstelėje veikia kanoninis AR atsako kelias. Atsakui reikalingi androgenai aukščiau aprašytu būdu jungiasi prie AR, AR dimerizuojasi, keliauja į branduolį ir aktyvindamas atsako kelio genų transkripciją skatina ląstelės išgyvenamumą, dauginimąsi ir PSA sintezę (1.10A pav.). Nauji vaistai yra nukreipti prieš AR atsako kelią: abiraterono acetatas (AA) slopina androgenų sintezę, o enzalutamidas (ENZ) blokuoja androgenų prisijungimą prie AR. AR nebegali dimerizuotis, nebepatenka į branduolį, o AR atsako kelias blokuojamas, dėl to sustoja ląstelės augimas, sumažėja PSA sekrecija, ląstelėse vyksta apoptozė (1.10B pav.). AR-V ženkliai sumažina AA ir ENZ efektyvumą, nes veikdami be androgenų dimerizuojasi tarpusavyje arba jungiasi su AR-FL ir patekę į branduolį ne tik palaiko kanoninį AR atsako kelią, bet ir skatina PV ląsteles dalintis dar sparčiau (1.10C pav.).



1.10 pav. Atsparumas vaistams, blokuojantiems androgenų receptoriaus (AR) kelią, ir nulemtas AR variantų (AR-V). AR atsako kelias, įprastai veikiantis prostatos vėžio ląstelėje (A), slopinamas vaistų (abiraterono acetato ir enzalutamido) (B) ir AR-V nulemtas atsparumas vaistams (pritaikyta pagal P. S. Nelson, 2014).

1.3.4. Tirtųjų AR-V charakteristikos

Nors nustatyta apie 20 AR-V, daugiausiai tyrimų atlikta su AR-V1, AR-V3, AR-V7, AR-V9 ir AR-V12 (dar žinomo kaip AR^{v567es}). Jie klinikinėje medžiagoje nustatomi dažniausiai ir randami RNR bei baltymų lygmenyje.

- **AR-V7** yra plačiausiai analizuojamas AR-V, nes dažnai randamas klinikinėje KAPV medžiagoje ir seniausiai siejamas su atsparumu gydymui [Lu ir kt., 2013]. AR-V7 sudarytas iš 3 įprastų ir kryptinio egzono CE3. Palyginus PV ląstelių linijų 22Rv1 ir VCaP citoplazmos ir branduolio baltymų ekstraktus, AR-V7 buvo aptiktas abiejuose iš jų. Taip pat AR-V7 buvo rastas branduolyje nepriklausomai nuo androgenų buvimo, kas patvirtina jį esant nuolat aktyvų [Hu ir kt., 2009]. Naujausi tyrimai rodo, kad navikai, kuriuose vyksta AR-V7 sintezė, turi daug daugiau pažaidų DNR reparacijos sistemos genuose, dėl to yra imlesni imunoterapijai [Boudadi ir kt., 2018].

- **AR-V1** susidaro po AR geno trečio egzono prisijungus CE1 kriptiniam egzonui. AR-V1 buvo nustatytas kaulų metastazėse, pirminiuose PV navikuose ir nenavikiniame prostatos audinyje [Armstrong ir Gao, 2019]. AR-V1 baltymas dažniausiai randamas citoplazmoje, todėl palyginus su kitais AR-V, kurie randami branduolyje ir yra visada aktyvūs, AR-V1 aktyvus tik tam tikromis sąlygomis ir greičiausiai vienas pats negeba inicijuoti transkripcijos. Nustatyta, kad AR-V1 gali ir homodimerizuotis, ir sudaryti heterodimerus su AR-V7 ar AR-FL [Zhan ir kt., 2017]. Pastebėta, kad jungiantis į dimerą su AR-V7, ligando (androgenų) buvimas nėra reikalingas, tačiau kai jų esama, dimerizacija pagreitinėja. Taip pat pastebėta, kad ląstelėje esant androgenams AR-V1 mažina AR-FL patekimą į branduolį ir slopina AR-V7 transaktyvaciją. P.A. Watson tyrėjų grupė [Watson ir kt., 2010] nustatė, kad vykstant AR-V1 ir AR-V7 raiškai ląstelės auga lėčiau, negu esant tik AR-V7. Abi mokslininkų grupės padarė išvadą, kad AR-V1 yra vyraujantis-neigiamas AR-V, ir reikalingi tolimesni funkciniai tyrimai.

- **AR-V3** turi du kriptinius egzonus: CE3 išsidėstęs tarp 2 ir 3 egzono, o CE1 yra transkripto gale. AR-V3 nustatomas kartu su AR-V7 ir AR-V9 [Kallio ir kt., 2018] ir yra susietas su abiraterono acetatu gydomų KAPV ligočių trumpesniu išgyvenamumu be progresijos [Kohli ir kt., 2017]. Tyrimai rodo, kad KAPV ligočių cirkuliuojančiose vėžio ląstelėse AR-V3 randamas dažniau nei AR-V7 [Da Laere ir kt., 2017].

- **AR-V9** turi kriptinį egzoną CE5, kuris šiame AR-V yra išsidėstęs po AR geno 3 egzono. Naudojant prieš AR-V7 nukreiptas siRNR, kartu buvo

nuslopinta ir AR-V9 raiška, kas rodo šių transkriptų kriptinių egzonų sekų panašumą [Kohli ir kt., 2017]. Nors AR-V9, kaip ir AR-V1, aktyvus tik tam tikromis sąlygomis, tačiau padidinus jo raišką skatinamas nuo androgenų nepriklausomas AR transkripcinis aktyvumas net ir veikiant ENZ. Taip pat nustatyta, kad KAPV ligoniams, kurių biopsijose, paimtose prieš pradėdant gydymą AA, buvo rastas didžiausias AR-V9 kiekis, pasireiškė pirminis atsparumas gydymui [Kohli ir kt., 2017]. Tačiau yra ir prieštaringų tyrimų, pavyzdžiui, S.Q. To su kolegomis [To ir kt., 2018] jokios reikšmingos sąsajos tarp kraujyje esančių AR-V7 bei AR-V9 ir atsako į gydymą nenustatė.

- **AR-V12**, arba AR^{V567es}, neturi kriptinių egzonų, nes šis transkriptas susidaro alternatyvaus splaisingo metu praleidus 5, 6 ir 7 egzonus ir 4 egzonui iškart jungiantis su 8 egzonu. AR-V12 visada aktyvus, jo raiška dažnai nustatoma KAVP ksenograftuose ir metastazėse [Hu ir kt., 2011; Zhang ir kt., 2011] bei rasta padidėjusi ENZ atspariuose ksenograftuose [Cao ir kt., 2014]. Transgeninėms pelėms, kuriose buvo paskatinta AR-V12 sintezė, labai anksti buvo nustatyta hiperplazija ir į aplinkinius audinius išplitę navikai [Liu ir kt., 2013].

2. MĖGINIAI IR METODAI

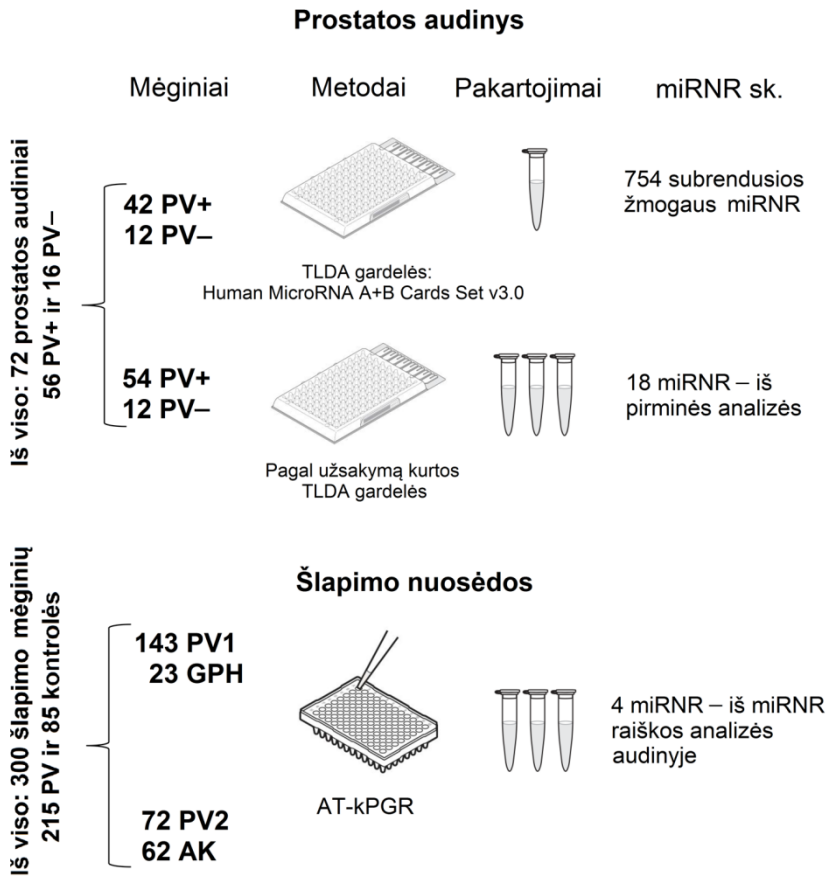
2.1. Ligoniai ir mėginiai

2.1.1. Prostatos vėžiu sergantys ligoniai

Prostatos audinių rinkimas miRNR analizei. Prostatos audinių ir šlapimo mėginiai buvo surinkti iš 237 PV sergančių ligonių, kuriems buvo atliktas PSA testas, prostatos biopsija ir radikali prostatektomija (RP). Į tyrimą įtraukti ligoniai buvo gydyti Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VULSK) Urologijos skyriuje nuo 2008 m. sausio mėn. iki 2014 sausio mėn. Palyginimui šlapimas buvo surinktas iš 23 asmenų, kuriems nustatyta gerybinė prostatos hiperplazija (GPH), ir 62 asimptomatinių kontrolinių asmenų – PV nesergančių vyrų, kurių serumo PSA koncentracija neviršija 3 ng/mL. Tyrimui buvo gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas (2007-11-23 Nr. 50 ir 2011-09-07 Nr. 6B-11-275), o dalyvaujantys tyrime asmenys buvo informuoti apie tyrimo eigą ir pasirašė sutikimą dalyvauti. Šis tyrimas buvo didesnės 2008 m. inicijuotos biožymenų paieškos studijos dalis, todėl mėginiai rinkti ir ruošti remiantis standartizuota, anksčiau aprašyta metodika [Sabaliauskaite ir kt., 2012; Daniunaite ir kt., 2014].

Navikiniai (≥ 70 % vėžinių ląstelių, PV+) ir nenavikiniai (0 % vėžinių ląstelių, PV-) audiniai buvo atrinkti po histopatologinės analizės [Sabaliauskaite ir kt., 2012; Daniunaite ir kt., 2014] ir perduoti molekuliniais genetiniams tyrimams. miRNR raiškos tyrimas buvo atliktas naudojant 72 skystame azote užšaldytus prostatos audinius (56 PV+ ir 16 PV-): visuminė miRNR raiškos analizė buvo atlikta 42 PV+ ir 12 PV-, o atrinktų miRNR validavimas – 42 PV+ ir 12 PV- audiniuose (2.1 pav.).

Biocheminė ligos progresija (BCR) buvo patvirtinama, kai dviem iš eilės matavimais nustatyta $\geq 0,2$ ng/mL ir didėjanti PSA koncentracija kraujyje. Iš 56 PV+ atvejų duomenys apie ligos eigą (angl. *follow-up*) buvo žinomi 55 asmenims (98,2 %), iš kurių BCR pasireiškė 18 (32,7 %). Sulietinio transkripto *TMPRSS2-ERG* tyrimai buvo atlikti Žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje dr. Rasos Sabaliauskaitės ir publikuoti anksčiau [Sabaliauskaite ir kt., 2012; Demidenko ir kt., 2015]. Išsamūs klinikiniai-patologiniai duomenys (naviko stadija, *Gleason* balas ir kt.) pateikti 2.1 lentelėje.



2.1 pav. miRNR tyrimo schema. miRNR raiška vertinta navikiniuose ir nenavikiniuose prostatos vėžio audiniuose (PV+ ir PV–, atitinkamai) ir PV bei kontrolinių šlapime. GPH – gerybinė prostatos hiperplazija, AK – sveiki asmenys, TLDA – mažo tankio *TaqMan* gardelės, AT-kPGR – kiekybinė atvirkštinės transkriptazės PGR.

Šlapimo mėginių rinkimas miRNR analizei. miRNR tyrimui šlapimas buvo surinktas iš dviejų nepriklausomų PV sergančių ligonių ir kontrolinių asmenų imčių:

1. Šlapimas, rinktas kateterizuojant PV ligonių šlapimo pūslę prieš operaciją, palygintas su tokiu pat būdu rinktais tiriamųjų, kuriems nustatyta GPH, mėginiais: **PV1** (N = 143) vs. **GPH** (N = 23). Duomenys apie PV ligos eigą vidutiniškai buvo rinkti 2,7 m. ir buvo žinomi 91,6 % atvejų (131/143);

2. Prieš operaciją surinkti šlapimo mėginiai palyginti su rutiniams tyrimams rinktu asimptomatinių kontrolinių asmenų šlapimu: **PV2** (N = 72) vs. **AK** (N = 62). Informacija apie šios imties ligonių PV2 eigą buvo žinoma

75 % atvejų (54/72) ir vidutiniškai buvo 1,0 m. AK amžiaus vidurkis buvo 63,3 m. ir atitiko PV1 ir PV2 imčių amžių. Detali informacija apie visas minėtas imtis pateikta 2.1 lentelėje.

PV sergančių ir kontrolinių asmenų šlapimo mėginiai buvo apdoroti vienodai: ~30 mL šlapimo buvo 15 min centrifuguota 1000 rpm 4 °C temperatūroje. Centrifugatas pašalintas, paliekant apie 2 mL skysčio. Nuosėdos du kartus praplautos, resuspenduojant PBS ir laikytos –80 °C temperatūroje.

2.1 lentelė. Ligonių, sergančių prostatos vėžiu (PV), gerybine prostatos hiperplazija (GPH) ir asimptomatinių asmenų (AK) klinikinės-patologinės charakteristikos

Rodiklis		Audiniai (N = 72)		Šlapimas (N = 300)			
		PV+ (N=56)	PV- (N=16)	PV1 (N=143)	PV2 (N=72)	GPH (N=23)	AK (N=62)
Amžius	Vidurkis ± SEM, m.	61,6 ± 0,9	62,0 ± 0,6	61,4 ± 0,6	61,7 ± 0,9	74,2 ± 1,4	63,3 ± 1,2
	Intervalas, m.	48–73	53–70	42–74	41–73	59–83	30–81
G	6; N (%)	20 (35,7)	-	75 (52,4)	15 (20,8)	-	-
	≥7; N (%)	36 (64,3)	-	68 (47,6)	56 (77,8)	-	-
	Než.; N (%)	-	-	-	1 (1,4)	-	-
Išsk. G	≤(3+4); N (%)	49 (87,5)	-	118 (82,5)	53 (73,6)	-	-
	≥(4+3); N (%)	7 (12,5)	-	10 (7,0)	18 (25,0)	-	-
	Než.; N (%)	-	-	15 (10,5)	1 (1,4)	-	-
pT	≤2; N (%)	38 (67,9)	-	112 (78,3)	55 (76,4)	-	-
	3; N (%)	18 (32,1)	-	31 (21,7)	16 (22,2)	-	-
	Než.; N (%)	-	-	-	1 (1,4)	-	-
BCR	Taip; N (%)	18 (32,1)	-	26 (18,2)	9 (12,5)	-	-
	Ne; N (%)	37 (66,1)	-	105 (73,4)	45 (62,5)	-	-
	Než.; N (%)	1 (1,8)	-	12 (8,4)	18 (25,0)	-	-
Serumo PSA	Vidurkis ± SEM, ng/mL	10,8 ± 4,5	6,6 ± 1,8	9,7 ± 1,0	8,5 ± 0,9	7,8 ± 1,3	-
	Intervalas, ng/mL	2,8–84,2	2,6–17,0	0,1–84,2	2,3–38,0	0,8–28,1	-
	Než.; N (%)	2 (3,6)	-	3 (2,1)	-	2 (8,7)	-
T-E	Taip; N (%)	37 (66,1)	-	56 (39,2)	16 (22,2)	-	-
	Ne; N (%)	19 (33,9)	-	41 (28,7)	10 (13,9)	-	-
	Než.; N (%)	-	-	46 (32,2)	46 (63,9)	-	-
Operacinis kraštis	Teigiamas; N (%)	22 (39,3)	-	-	-	-	-
	Neigiamas; N (%)	34 (60,7)	-	-	-	-	-
	Než.; N (%)	-	-	-	-	-	-

Santrumpos: AK – asimptomatinės kontrolės; BCR – biocheminė ligos progresija; G – Gleason balas; Išsk. G – pagal ISUP sistemą išskirstytas Gleason balas; Než. – nežinoma; pT – naviko stadija; PV+ navikinis prostatos audinys; PV- nenavikinis prostatos audinys; SEM – standartinė vidurkio paklaida; T-E – *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkripto statusas.

Prostatos audinių rinkimas AR transkriptų analizei. Prostatos audiniai AR transkriptų analizei buvo atrinkti iš anksčiau aprašytų PV1 ir PV2 imčių. Iš viso AR transkriptų raiška vertinta 112 prostatos audinių mėginiuose (100 PV+ ir 12 PV-); detalios klinikinės-patologinės charakteristikos pateiktos S1 priedų lentelėje. Iš 98 PV ligonių (98 %), kurių duomenys apie ligos eigą buvo žinomi (mediana 30,5 mėn.), 27 ligoniams buvo diagnozuota biocheminė ligos progresija (27,6 %).

2.1.2. Kastracijai atspariu prostatos vėžiu sergantys ligoniai

Mėginių rinkimas AR transkriptų analizei. Kraujo ir šlapimo mėginiai buvo renkami iš 102 kastracijai atspariu prostatos vėžiu (KAPV) sergančių ligonių nuo 2017 m. vasario iki 2018 lapkričio mėn. Abiraterono acetatas (AA) buvo paskirtas kaip pirmos eilės vaistas 88 ligoniams ir 14 ligonių – kaip antros eilės vaistas po docetakselio. Kraujas buvo renkamas į *PAXgene Blood RNA Tubes* mėgintuvėlius prieš pradėdant gydymą AA (AA-0) ir ligai progresavus arba dukart kas 6 mėn., jei atsakas į gydymą yra geras. Ligos progresija buvo laikoma, jei buvo tenkinami bent 2 iš 3 kriterijų: biocheminė arba radiologinė ligos progresija ir/arba stebimas bendras klinikinės būklės pablogėjimas. Palyginimui buvo surinktas kraujas iš 14 atitinkamo amžiaus asimptomatinių kontrolinių asmenų (amžiaus mediana 63,0 m.). Tyrimui buvo gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas (Nr. 158200-17-874-411), o ligoniai pasirašė sutikimą dalyvauti tyrime. Detalios klinikinės-patologinės KAPV charakteristikos pateiktos 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Ligonių, sergančių kastracijai atspariu prostatos vėžiu (KAPV) ir įtrauktų į androgenų transkriptų tyrimą kraujyje, klinikinės-patologinės charakteristikos

Rodiklis	Vertė
KAPV ligoniai, N	102
Amžiaus mediana PV diagnozės metu, m. (IQR)	67,9 (11,1)
Amžiaus mediana KAPV diagnozės metu, m. (IQR)	75,4 (11,4)
ISUP grupė (biopsijos medžiaga)	
≤2; N (%)	57 (55,9)
3; N (%)	11 (10,8)
≥4; N (%)	25 (24,5)
Nežinoma; N (%)	9 (8,8)
Naviko stadija (biopsijos medžiaga, cT)	
≤2; N (%)	33 (32,4)
≥3; N (%)	65 (63,7)
Nežinoma; N (%)	4 (3,9)
Radikalus gydymas	
Taip; N (%)	41 (40,2)
Ne; N (%)	59 (57,8)
Nežinoma; N (%)	2 (2,0)
Teigiamo atsako į ADT mediana, mėn. (IQR)	40,0 (73,5)
Kaulų metastazės prieš AA	
Taip; N (%)	87 (85,3)
Ne; N (%)	15 (14,7)
Visceralinės metastazės prieš AA	
Taip; N (%)	10 (9,8)
Ne; N (%)	92 (90,2)
Metastazės limfmazgiuose prieš AA	
Sritiniuose, N (%)	31 (30,4)
Ne sritiniuose, N (%)	21 (20,6)
Abiejuose, N (%)	16 (15,7)
Nebuvo, N (%)	66 (64,7)
Metastatinės ligos apimtis	
Didelė, N (%)	38 (37,3)
Maža, N (%)	64 (62,7)
PSA prieš AA mediana, ng/mL (IQR)	39,4 (80,0)
Gydymas AA	
I eilės; N (%)	88 (86,3)
II eilės (po DTX); N (%)	14 (13,7)
PFS mediana, mėn (IQR)	8,9 (7,3)
Mirtis	
Taip; N (%)	56 (54,9)
Ne; N (%)	45 (44,1)
OS mediana, mėn. (IQR)	16,6 (14,6)

Santrumpos: AA – abiraterono acetatas; ADT – androgenų deprivacijos terapija; KAPV – kastracijai atsparus prostatos vėžys; DTX – docetakselis; IQR – kvartilinis plotis; ISUP – angl. *International Society of Urological Pathology*; OS – bendrasis išgyvenamumas; PV – prostatos vėžys; PFS – išgyvenamumas be progresijos; PSA – prostatai specifinis antigenas.

^b Metastatinė liga laikyta didelės apimties, kai nustatytos visceralinės metastazės ir/ar ≥ 4 kaulinės metastazės, iš kurių ≥ 1 už ašinio skeleto ir kaulinio dubens ribų ir/ar nustatytos metastazės limfmazgiuose virš diafragmos.

Išgyvenamumas be progresijos (PFS) ir bendrasis išgyvenamumas (OS) buvo skaičiuojamas nuo AA gydymo pradžios iki gydytojo patvirtintos ligos progresijos arba mirties nuo bet kokios priežasties. Duomenys apie ligos progresiją buvo žinomi 96,1 % (98/102) ligonių (4 ligonių ligos eiga buvo nežinoma). Pagal PFS trukmę ligoniai buvo suskirstyti į ilgo (> 8 mėn., ER), vidutinio (3–8 mėn., MR) ir trumpo (< 3 mėn., SR) atsako į gydymą grupes. 11 ligonių, kurie savo noru nebetęsė jiems paskirto gydymo AA ir po kelių mėnesių mirė, buvo priskirti trumpo atsako į gydymą grupei (SR).

2.2. Metodai

2.2.1. RNR gryninimas

RNR gryninimas iš prostatos audinio. Visuminė RNR buvo išgryninta naudojant *mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific (TFS))* ir laikantis gamintojo rekomendacijų. Apie 50 mg skystame azote užšaldyto ir iki miltelių homogenizuoto prostatos audinio buvo užpilama 600 μ L buferinio lizės tirpalo *Lysis/Binding Buffer*, pridedama 60 μ L reagento *miRNA Homogenate Additive*, stipriai supurtoma ir 10 min inkubuojama lede. Pridedama 600 μ L fenolio/chloroformo mišinio (*Acid-Phenol: Chloroform*), vėl stipriai supurtoma ir centrifuguojama 5 min $10000 \times g$. Viršutinė vandeninė fazė nusiurbama ir, sumaišius su 1,25 karto didesniu tūriu 96 % etanolio, nešama ant kolonėlės, tada plaunama vieną kartą 700 μ L plovimo tirpalu 1 (*miRNA Wash Solution 1*) ir dukart po 500 μ L plovimo tirpalu 2/3 (*miRNA Wash Solution 2/3*), kaskart centrifuguojant po 10–15 s $10000 \times g$. RNR eliucijai įvykdyti ant kolonėlės užnešama 100 μ L 95 °C temperatūros eliucijos tirpalo (*Elution Solution*) ir centrifuguota 30 s visu greičiu. Laikantis gamintojo protokolo, dalies mėginių RNR buvo gryninta naudojant TRIzol reagentą (*TFS*) ir eliuciją vykdant 30 μ L vandens be RNazių. Abiem metodais išgryninta RNR laikoma –80 °C temperatūroje.

RNR gryninimas iš šlapimo. Visuminė RNR iš šlapimo gryninta naudojant rinkinį *miRNeasy Mini Kit (Qiagen)*, pritaikius gamintojo protokolą RNR gryninimui iš organizmo skysčių. 200 μ L šlapimo nuosėdų sumaišoma su 1 mL lizės tirpalo *QIAzol Lysis Reagent*, supurtoma ir 5 min inkubuojama kambario temperatūroje. Tada į mėginius įnešama 25 fmol sintetinės cel-miR-39 (*Qiagen*) ir 200 μ L chloroformo, smarkiai supurtoma, inkubuojama 2–3 min kambario temperatūroje ir 15 min centrifuguojama $12000 \times g$ 4 °C temperatūroje. Nuo šio etapo RNR gryninama pagal gamintojo protokolą: nusiurbtas viršutinis sluoksnius maišomas su 1,5 didesniu tūriu 96 % etanolio, sumaišoma, per kelis kartus pernešama ant kolonėlės ir plaunama vieną kartą su 700 μ L buferinio tirpalo *Buffer RWT* ir dukart po 500 μ L buferinio tirpalo *Buffer RPE*, kaskart centrifuguojant po 15 s $10000 \times g$. Eliucija vykdoma ant kolonėlės dukart užnešant 30 μ L vandens be nukleazių, o išgryninta RNR laikoma –80 °C temperatūroje.

RNR gryninimas iš kraujo. Visuminė RNR buvo gryninama iš 2,5 mL periferinio užšaldyto kraujo, surinkto į *PAXgene Blood RNA Tube* mėgintuvėlius, pagal rekomendacijas naudojant *PAXgene Blood miRNA Kit*

rinkinį (viskas iš *PreAnalytiX*, *QIAGEN / BD Company*). Mėginiai buvo atšildomi kambario temperatūroje per 24 h, kad pilnai įvyktų eritrocitų lizė, tada centrifuguojami $3000 \times g$ 10 min centrifugoje su svyrančio kampo rotoriumi. Centrifugatas nupilamas, ląstelių nuosėdos praplaunamos vandeniu be RNazių ir darkart centrifuguojama. Ląstelės resuspenduojamos 350 μL buferyje *Buffer BM1*, įnešama 300 μL *Buffer BM1* buferio ir 40 μL proteinazės K, supurtoma ir inkubuojama 10 min $65\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje termopurtyklėje, purtant 900 rpm greičiu. Praėjus inkubacijos laikui, į ląstelių lizatą nešama 666 g sintetinio KLK3-IC transkripto (angl. *kallikrein-3 internal control*) [Nurmi ir kt., 2000]. Lizatas homogenizuojamas ir išvalomas nuo ląstelių nuolaužų pernešus jį ant *Shredder spin column* kolonėlės ir centrifuguojant 3 min visu greičiu (apie $20000 \times g$). Centrifugatas atsargiai surenkamas, užpilama 700 μL 100 % kambario temperatūros izopropanolio, supurtoma ir per kelis kartus pernešus ant *PAXgene RNA spin column* kolonėlės centrifuguojama kaskart po 1 min $14000 \times g$. Centrifugatas kaskart pašalinamas, kolonėlė plaunama su 350 μL buferio *Buffer BM3* ir centrifuguojama 15 s $14000 \times g$. Ant kolonėlės užnešama 80 μL DNazės I mišinio (10 μL DNazės I ir 70 μL *Buffer RDD* buferio) ir inkubuojama 15 min kambario temperatūroje. Toliau tęsiamas plovimas: plaunama vieną kartą su 350 μL buferio *Buffer BM3* ir dukart su 500 μL buferio *Buffer BM4*, kaskart centrifuguojant po 15 s $14000 \times g$ ir pašalinant surenkamąjį mėgintuvėlį su centrifugatu. Eliucija atliekama dukart ant kolonėlės nešant po 40 μL eliucijos buferio *Buffer BR5* ir centrifuguojant po 1 min $14000 \times g$. Gauta RNR inkubuojama 5 min $55\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje termopurtyklėje, perkeliama ant ledo ir iškart naudojama tolimesniems etapams arba laikoma $-80\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.

Išgrynintos RNR koncentracija ir kokybiniai parametrai buvo tikrinti naudojant spektrofotometrą *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*) ir kapiliarinės elektroforezės prietaisą *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*).

2.2.2. miRNR mikrogardelės

Tiriant visuminę miRNR raišką mikrogardelių metodu, pirmiausia 100 ng visuminės RNR maišoma su sintetine kontroline miRNR (*Spike-In solution*, *Agilent Technologies*), defosforilinama, denatūruojama ir žymima 3-pCp cianinu, laikantis *miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* (*Agilent Technologies*) protokolo. Žymėti mėginiai išdžiovinami koncentratoriuje, resuspenduojami ir hibridizuojami ant *Human microRNA Microarray 8 x 60K* formato mikrogardelių (*Agilent*

Technologies), pagamintų pagal duomenų bazės *miRBase* 16.0 versiją. Hibridizacija vykdoma mikrogardelės 20 h laikant hibridizavimo krosnyje 55 °C temperatūroje. Mikrogardelės plaunamos genų raiškos gardelių plovimo buferių rinkiniu ir nedelsiant nuskenuojamos *Agilent SureScan* skeneriu. Naudota ši programinė įranga: skenavimui – *Agilent Microarray Scan Control*, o pradinių miRNR raiškos duomenų išgavimui – *Feature Extraction software v10.7* (viskas iš *Agilent Technologies*).

2.2.3. Kopijinės DNR sintezė

Kopijinės DNR (kDNR) sintezė **visuminei miRNR raiškos analizei prostatos audiniuose mažo tankio *TaqMan* gardelėmis (TLDA)** buvo atlikta naudojant *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems* (*ABI*), *TFS*) rinkinį. 7,5 µL tūrio reakcijos mišinys buvo paruoštas pagal gamintojo protokolą ir jį sudarė 500 ng visuminės RNR, atvirkštinė transkriptazė *MultiScribe*, 10× A ir B gardelei specifiniai pradmenys *Megaplex RT*, 10× buferinis tirpalas, deoksiribonukleozidtrifosfatai (dNTP), MgCl₂ ir vanduo be nukleazių. Gausinta 40 ciklų: 2 min 16 °C, 1 min 42 °C ir 1 s 50 °C temperatūroje, reakcija nutraukiama inkubuojant 5 min 85 °C temperatūroje.

kDNR sintezė **miRNR raiškos validavimui prostatos audiniuose pagal užsakymą kurtomis TLDA gardelėmis** buvo atlikta naudojant tą patį *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* rinkinį (*ABI*, *TFS*). Buvo ruošiami 15 µL tūrio atvirkštinės transkriptazės (AT) reakcijos mišiniai, kurių kiekvieną sudarė 350 ng visuminės RNR, atvirkštinė transkriptazė *MultiScribe*, pradmenys *RT Pool-16*, 10× buferinis tirpalas, dNTP, RNazių inhibitorius ir vanduo be nukleazių. AT reakcija vykdoma inkubuojant 30 min 16 °C, 30 min 42 °C ir 5 min 85 °C temperatūroje.

kDNR sintezė **AR transkriptų raiškos tyrimui prostatos audiniuose** buvo atlikta naudojant *Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase* (*TFS*) pagal gamintojo rekomendacijas. 1 µg išgrynintos RNR buvo 5 min inkubuojama su DNaze I 37 °C temperatūroje. Kartu kiekvienam mėginiui buvo atliekama AT reakcijos kontrolė (AT–), kuomet į reakcijos mišinį neįnešama *Maxima Enzyme Mix* AT fermentų mišinio (kurio sudėtyje yra atvirkštinė transkriptazė), ir tokiu būdu patikrinama, ar išgrynintos RNR mėginyje nėra genomines DNR. Galutinį 20 µL reakcijos tūrį sudarė DNaze I paveikta RNR, AT fermento mišinys *Maxima Enzyme Mix* ir reagentų mišinys 5× *Reaction Mix* (buferinis tirpalas, dNTP, oligo(dT)18 ir atsitiktiniai heksameriniai pradmenys). AT reakcija vykdyta 10 min 25 °C, 15 min 50 °C ir 5 min 85 °C

temperatūroje, naudojant kiekybinės PGR prietaisą *Proflex™ 3x32-well PCR System (TFS)*.

kDNR sintezė **miRNR analizei šlapime** buvo vykdoma naudojant visuminę RNR, *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* rinkinį ir plaukų smeigtuko struktūros AT pradmenis *TaqMan Human MiRNA Assays* (viskas iš *ABI, TFS*). Atrinktoms miR-148a, -365, -375 ir -429 gamintojo pradmenų kodai buvo 000470, 001020, 000564 ir 001024, atitinkamai. Pagal gamintojo rekomendacijas, reakcija atliekama 15 µL tūryje, ir ją sudaro 7 µL reakcijos mišinio komponentų (10× *Reverse Transcription Buffer*, dNTP, atvirkštinė transkriptazė *MultiScribe™*, RNazių inhibitorius ir vanduo be nukleazių), 3 µL tiriamosios miRNR pradmens ir 5 µL visuminės RNR. Kiekvienam mėginiui ir kiekvienam tiriamajam miRNR genui ruošiami atskiri mišiniai. AT reakcija vykdoma inkubuojant po 30 min 16 °C ir 42 °C temperatūroje, fermento aktyvumas stabdomas mėginius 5 min palaikant 85 °C temperatūroje. kDNR produktai iškart naudojami tolimesniems tyrimo etapams arba apie savaitę iki analizės laikomi –80 °C temperatūroje.

kDNR sintezė **AR transkriptų analizei kraujyje** buvo vykdoma naudojant visuminę RNR ir *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, TFS)* rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Siekiant kuo specifiškesnio tyrimo, kDNR sintezė buvo atliekama ne visai RNR, bet tik tiems transkriptams, kurių raišką tirsime kPGR etape. Atrinktų genų (AR-FL, AR variantų (AR-V1, -V3 ir -V7) ir kontrolių (TBP, GUSB, KLK3-IC)) pradmenų ir zondų mišiniai *20× TaqMan™ Gene Expression Assays (ABI, TFS)* buvo skiedžiami su vandeniu be nukleazių santykiu 1:100. Galutinį 30 µL tūrio reakcijos mišinį sudarė 2× *Reaction Mix, SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix* reakcijos mišinys, *SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix* AT ir polimerazės fermentų mišinys, atskiesti pradmenys ir 4,5 µL visuminės RNR. kDNR sintezės reakcija atliekama inkubuojant reakcijos mišinius 30 min 50 °C ir 2 min 95 °C temperatūroje termocikleryje, papildomai atliekant 14 papildomo pagrausavimo (preamplifikacijos) ciklą, kurių kiekvienas susideda iš inkubavimo 15 s 95 °C ir 4 min 60 °C temperatūroje. Pasibaigus reakcijai, gauta kDNR skiedžiama vandeniu be nukleazių santykiu 1 : 1 ir iškart naudojama tolimesniems etapams arba laikoma –80 °C temperatūroje.

2.2.4. Kiekybinė atvirkštinės transkriptazės PGR

Kiekybinė atvirkštinės transkriptazės kiekybinė PGR (AT-kPGR) **visuminei miRNR raiškos analizei prostatos audiniuose TLDA gardelėmis** buvo atlikta naudojant *Human MicroRNA A+B TLDA cards Set v.3.0 (ABI, TFS)*.

Reakcijos mišinį (900 µL) sudarė: 6 µL kDNR, 2× reakcijos mišinys *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG* ir vanduo be nukleazių. Po 100 µL mišinio nešama į gardelės angas, gardelė dukart po 1 min centrifuguojama 1200 rpm, užsandarinama ir patalpinus į *ViiA 7 Real Time PCR System (ABI, TFS)* kPGR prietaisą paleidžiama standartinė reakcijos vykdymo programa: 10 min 95 °C ir 40 ciklų 15 s 95 °C ir 1 min 60 °C temperatūroje.

AT-kPGR **miRNR raiškos validavimui prostatos audiniuose pagal užsakymą kurtomis TLDA gardelėmis** buvo atlikta pagal užsakymą kurtomis TLDA gardelėmis (*ABI, TFS*). Reakcijos mišinį (112,5 µL) sudarė: 0,9 µL kDNR, 2× reakcijos mišinys *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG* ir vanduo be nukleazių. Tolimesnis mišinių išpilstymas į gardeles, jų centrifugavimas, sandarinimas ir kPGR sąlygos atitinka aukščiau aprašytą visuminę miRNR raiškos analizę TLDA gardelėmis.

Pradmenys **AR transkriptų raiškos tyrimui prostatos audiniuose** AT-kPGR metodu buvo pasirinkti iš publikacijų (S2 priedų lentelė). Pagal gamintojo rekomendacijas 25 µL galutinio tūrio AT-kPGR reakcijos mišinį sudarė *Maxima SYBR® Green qPCR Master Mix (2X) (TFS)* mišinys, pradmenys, vanduo be nukleazių ir 2 µL kDNR produkto. Kiekvienas mėginys tirtas atliekant tris pakartojimus, naudojant kiekybinės PGR sistemą *QuantStudio 5 Real-Time PCR System (S5) (TFS)*. Reakcija vykdyta 10 min aktyvinant fermentą 95 °C temperatūroje ir atliekant 40 gausinimo ciklų (15 s 95 °C ir 1 min 60 °C temperatūroje). Lydymosi kreivių analizė buvo atlikta po AT-kPGR reakcijos, PGR produktus lydant 1 min 95 °C, 30 s 55 °C ir 30 s 95 °C temperatūroje. Fluorescencinis signalas fiksuotas kiekvieno gausinimo ciklo gale, o atliekant kreivių analizę – tolydžiai.

AT-kPGR subrendusių **miR-148a, -365, -375 ir -429 analizė šlapime** buvo atlikta naudojant *TaqMan Human MiRNA Assays* pradmenų ir zondų mišinius (000470, 001020, 000564 ir 001024, atitinkamai (*ABI, TFS*)). 1,33 µL susintetintos kDNR buvo gausinama 20 µL reakcijos tūrio mišinyje, susidedančiame iš 2× reakcijos mišinio *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 20× atitinkamo pradmenų ir zondų mišinio *TaqMan MicroRNA Assay* (abu iš *ABI, TFS*) ir vandens be nukleazių. Reakcija vykdyta kiekybinės PGR sistema *ViiA 7 Real Time PCR System*, aktyvinant fermentą 10 min 95 °C temperatūroje ir gausinant 40 ciklų, kurių kiekvienas susideda iš 15 s 95 °C ir 1 min 60 °C temperatūroje. Fluorescencinis signalas fiksuotas kiekvieno gausinimo ciklo gale.

AT-kPGR AR transkriptų analizei kraujyje buvo naudojami pagal užsakymą kurti pradmenų ir zondų mišiniai *Custom TaqMan™ Gene Expression Assays* (AR-V1, -V3, -V7, -V9, -V12 ir sintetinio geno *KLK3-IC* sekos pateiktos S2 priedų lentelėje). Viso ilgio AR-FL ir referentiniams genams *TBP* ir *GUSB* tirti buvo pasirinkti jau sukurti mišiniai *TaqMan™ Gene Expression Assays* (Hs00171172_m1, Hs00427620_m1 ir Hs99999908_m1, atitinkamai (ABI, TFS)). AR transkriptų nustatymui audinyje ir kraujyje naudoti pradmenys dalinai persidengia (S2 priedų lentelė). Kiekviena AT-kPGR reakcija buvo atliekama tris kartus. Galutinį 10 µL reakcijos turį sudarė 2× *TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG* reakcijos mišinys (ABI, TFS), 20× pradmenų ir zondų mišinys, 1 µL 1 : 1 skiestos kDNR ir vanduo be nukleazių. AT-kPGR reakcija vykdyta kiekybinės PGR sistema *ViiA 7 Real Time PCR System* (ABI, TFS), aktyvinant fermentą 10 min 95 °C temperatūroje ir gausinant 50 ciklą 15 s 95 °C ir 1 min 60 °C temperatūroje. Fluorescencinis signalas fiksuotas kiekvieno gausinimo ciklo gale.

2.2.5. Statistinė analizė

Visuminė miRNR raiškos analizė mikrogardelėmis. miRNR raiškos statistinė analizė atlikta *GeneSpring GX v13.0* (AT) programine įranga. Statistiniam palyginimui naudotas nepriklausomų imčių t-kriterijaus testas, skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai P reikšmė buvo $\leq 0,05$, o raiškos skirtumas siekė bent 1,5 karto.

Pradinis kPGR duomenų apdorojimas. Pradiniai kiekybinės PGR duomenys buvo gauti paliekant numatytuosius amplifikacijos pradžios (angl. *baseline*) ir slenkstinės ribos (angl. *threshold*) parametrus. Visoms tyrimo dalims buvo naudota *ViiA7 Software v1.2* programinė įranga, išskyrus tai, kad AR transkriptų raiškos tyrimas audinyje buvo atliktas su *QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4.1* (abu iš ABI, TFS).

Papildomi miRNR analizės organizmų skysčiuose etapai. Tiriant organizmo skysčius, transkripto kiekis kartais yra per mažas, kad būtų nustatytas kiekybinės PGR metodu, arba to transkripto raiška nevyksta dėl biologinių priežasčių. Dėl to miRNR analizės metu toms miRNR, kurios nebuvo aptiktos, buvo priskirtos vėliausio amplifikacijos ciklo +1 vertės, o AR-V – maksimalus amplifikacijos ciklą skaičius (50). Taip pat, analizuojant kūno skysčius, naudotos papildomos kontrolės RNR gryninimo, kDNR sintezės ir kPGR efektyvumui įvertinti. Prieš normalizavimą pagal referentinių genų raišką, papildomai buvo normalizuojama pagal sintetines kontroles (cel-miR-39 šlapime ir *KLK3-IC* kraujyje): jų amplifikacijos ciklai

buvo suvienodinti ir susidaręs Cq (angl. *cycle of quantification*, dar vadinamas Ct) skirtumas/perviršis buvo atitinkamai atimtas/pridėtas prie visų tame mėginyje tirtų genų, tokiu būdu užtikrinant, kad genų raiška nebuvo iškreipta dėl techninių priežasčių. Transkriptų vertės palygintos ir kaip tolydūs dydžiai, ir kaip dichotominiai. Dichotominiam vertinimui nustatytas transkripto kiekis buvo suskirstytas į didelį ir mažą pagal medianą (miRNR šlapime ir AR-FL kraujyje) arba pagal aukščiausią Cq vertę asimptomatiniuose asmenyse (AR-V kraujyje: atvejus, kuriuose AR-V nebuvo nustatytas, priskiriant prie mažo AR-V kiekio grupės).

Genų raiškos analizė. Genų raiška normalizuota pritaikius $\Delta\Delta Ct$ metodą pagal endogenines kontroles: miRNR audinyje ir šlapime normalizuota pagal visų miRNR raišką (angl. *global*), AR transkriptų raiška audinyje analizuota pagal *HPRT1*, o kraujyje – pagal *TBP* ir *GUSB* referentinių genų raišką. Gauti įverčiai paversti santykiniais kiekiais pagal mažiausiai agresyvios ligos požymių turinčią grupę: miRNR ir AR transkriptų raiška audinyje normalizuota pagal nenavikinius prostatos audinius, miRNR šlapime – pagal asimptomatinius asmenis, miRNR ir AR transkriptai KAPV šlapime ir kraujyje – pagal ilgą atsaką į gydymą (> 8 mėn.) turinčius ligonius. Vertės \log_2 normalizuotos ir naudotos statistiniam palyginimui. miRNR ir AR transkriptų raiška palyginta taikant nepriklausomų imčių t-kriterijaus testą (angl. *Student's t test*) ir naudojant *GenEx 6* programinę įrangą (*MultiD analyses*). Koreliacija buvo įvertinta naudojant *Spearman* ir *Pearson* koreliacijos koeficientus ir *STATISTICA v.8.0* programinę įrangą.

ROC kreivių analizė. Biožymenų tinkamumas diagnostikai buvo įvertintas atlikus ROC (angl. *Receiver Operating Characteristic*) kreivių analizę. Buvo apskaičiuotas jautrumas, specifiskumas ir ploto po kreive įvertis AUC (angl. *area under the ROC curve*). Biožymenys apjungti atlikus regresinę analizę. Analizei naudota *GraphPad Prism v5.3* ir *MedCalc v18.6* programinė įranga.

Išgyvenamumo analizė. Išgyvenamumui be progresijos ir bendrajam išgyvenamumui įtaką darančių pavienių (angl. *univariate*) ir visų rodiklių (angl. *multivariate*) santykinės rizikos įvertinimas buvo atliktas *Cox* regresijos metodu (angl. *Cox proportional hazards regression*), taikant kintamųjų išbraukimo metodą (angl. *backward*). Apskaičiuota santykinė rizika (HR, angl. *hazard ratio*) ir 95 % pasikliautinieji intervalai (CI, angl. *confidence interval*). *Cox* analizė patvirtinta *Kaplan-Meier* išgyvenamumo kreivėmis, kur grupių palyginimui naudotas *Log-rank (Mantel-Cox)* testas. Analizės atliktos *GraphPad Prism v5.3* ir *MedCalc v18.6* programine įranga.

Visam grafiniam vaizdavimui naudota *GraphPad Prism v5.3*, išskyrus skritulinę (*Online Chart Tool*) ir Venn diagramą (*Venn Diagram Plotter v1.5*). Visais atvejais skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai P-reikšmė buvo $\leq 0,050$.

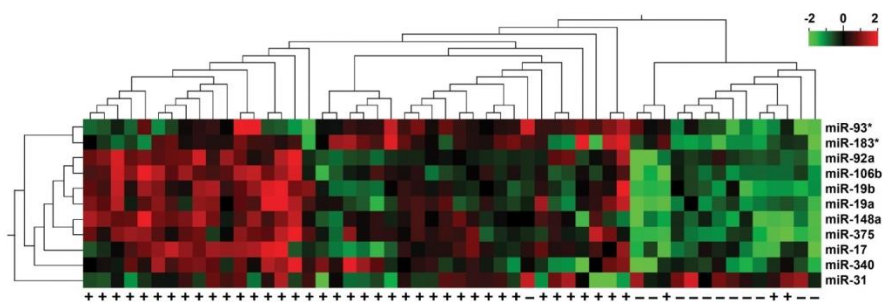
3. REZULTATAI

3.1. miRNR prostatos vėžio diagnostikai

Siekiant atrinkti PV specifines miRNR, kurias tiriant kūno skysčiuose būtų galima jautriai, specifiškai ir anksti diagnozuoti ligą, visuminė miRNR raiška pirmiausia buvo įvertinta navikiniuose ir nenavikiniuose PV audiniuose. Validavus reikšmingiausiai tarp navikinių ir nenavikinių mėginių besiskiriančias ir su įvairiais PV klinikiniais-patologiniais rodikliais koreliuojančias miRNR, 4 miRNR buvo atrinktos ir iširtos šlapime, o diagnostinis potencialas palygintas su serumo PSA [Stuopelyte ir kt., 2016a].

3.1.1. Visuminė miRNR raiškos analizė prostatos navikuose

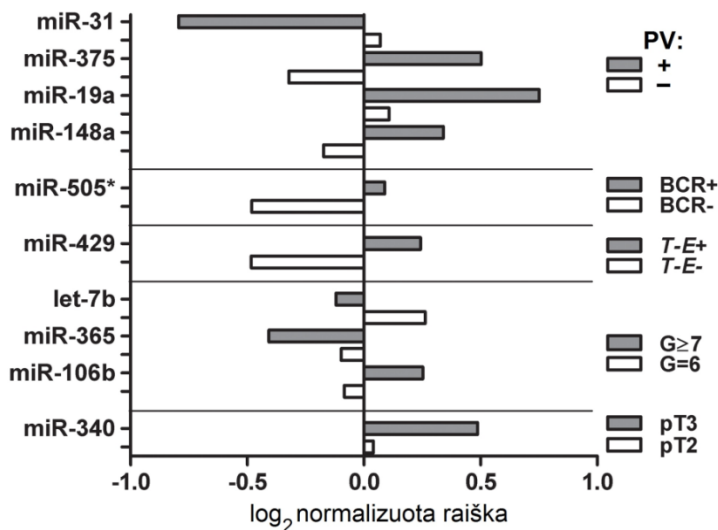
Visuminė miRNR raiškos analizė buvo atlikta 42 navikiniuose ir 12 nenavikinių prostatos mėginių, naudojant mažo tankio *TaqMan* gardeles (TLDA), įgalinančias vienu metu tirti 754 miRNR raišką. Pradinius statistinio duomenų apdorojimo kriterijus atitikusios 412 miRNR (54,6 %) buvo įtrauktos į pagrindinę statistinę analizę. Palyginus miRNR raišką navikiniuose ir nenavikiniuose audiniuose, statistiškai reikšmingai ($P < 0,05$) skyrėsi 113 miRNR, iš kurių 55 raiška buvo padidėjusi, o 58 sumažėjusi (S3 priedų lentelė). Labiausiai tarp navikinių ir nenavikinių prostatos audinių besiskiriančios raiškos miRNR vaizduojamos 3.1 pav., o kitos reikšmingos asociacijos su klinikiniais-patologiniais rodikliais (t. y. biocheminė ligos progresija (BCR), naviko stadija ir diferenciacijos laipsnis, *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkripto statusas, diagnostinis PSA, operacinis kraštas) pateiktos S3 priedų lentelėje.



3.1 pav. miRNR raiškos palyginimas navikiniuose (+) ir nenavikiniuose (-) prostatos audiniuose; vaizduojama 11 statistiškai reikšmingai tarp navikinio ir nenavikinio audinio besiskyrusių miRNR, kurios buvo atrinktos tolimesniems tyrimams; žalia spalva vaizduojama sumažėjusi, raudona – padidėjusi raiška.

Validavimui šalia 11-kos 3.1 paveiksle pavaizduotų labiausiai išsiskyrusios raiškos miRNR (10 padidėjusios ir 1 sumažėjusios raiškos) papildomai dar buvo atrinktos 7 miRNR: miR-365 ir -505* reikšmingai siejosi su biocheminiu ligos atkryčiu, o let-7b, miR-20a, -21, -195 ir -429 – su *TMPRSS2-ERG* sulietiniu transkriptu (S4 priedų lentelė). Atrinktų miRNR tyrimas buvo atliktas didesnėje prostatos audinių imtyje (N = 62: 52 navikiniai ir 12 nenavikiniai mėginiai), naudojant pagal užsakymą kurtas TLDA gardeles, kur kiekvienas genas tiriamas atliekant 3 pakartojimus.

Iš 11 atrinktų galimai PV specifinių miRNR, raiškos skirtumai buvo validuoti miR-148a, -375, ir -19a – jų raiška PV audiniuose buvo reikšmingai išaugusi (P = 0,027, P = 0,015 ir P = 0,024, atitinkamai; 3.2 pav.). Taip pat kaip ir visuminės raiškos tyrime, miR-429 kiekis buvo didesnis (P = 0,008) *TMPRSS2-ERG* teigiamuose navikuose, o miR-505* reikšmingai siejosi su progresija (P = 0,048). Geresnės diferenciacijos navikuose (G ≤ (3 + 4) ir G ≤ 6) buvo rasta išaugusi miR-429 (P < 0,001), miR-31 (P = 0,005), miR-365 (P = 0,007) ir let-7 (P = 0,022) raiška. Be to, miR-429 raiška, atvirkščiai, koreliavo su PSA koncentracija serume (Pearson r = -0,6, P < 0,0001). Visos gautos sąsajos pateiktos S4 priedų lentelėje.



3.2 pav. miRNR raiškos palyginimas tarp navikinių (+) ir nenavikinių (-) prostatos vėžiu (PV) sergančių ligonių prostatos audinių ir PV navikų grupių, suskirstytų pagal klinikinius-patologinius parametrus: biocheminę ligos progresiją (BCR+/-), sulietinio transkripto *TMPRSS2-ERG* statusą (T-E+/-), Gleason balą (G6/7) ir naviko stadiją (pT2/3). Stulpeliai vaizduoja medianą, * – P ≤ 0,05, ** – P < 0,001.

3.1.2. miRNR analizė šlapime

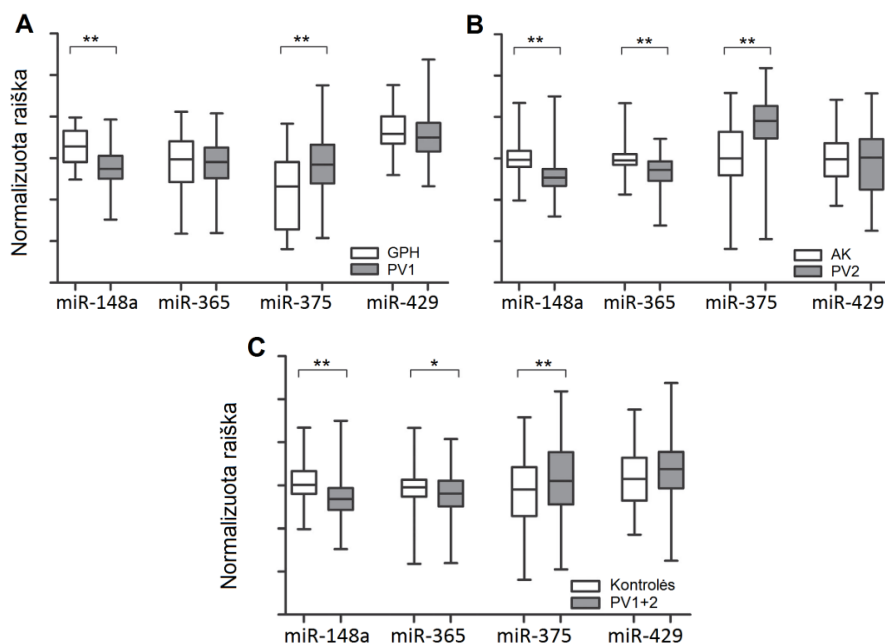
Atlikus visuminę miRNR profilio prostatos audiniuose analizę ir validavus atsirinktus taikinius, buvo įdiegtas ir atliktas miRNR tyrimas PV sergančių ligonių ir kontrolinių asmenų šlapime. miRNR analizei šlapimo nuosėdose buvo atrinktos tik tos miRNR, kurioms ne tik buvo būdinga intensyvi raiška PV audiniuose (miR-148a, -375), bet ir buvo nustatyta statistiškai reikšminga sąsaja su PV klinikiniais rodikliais (miR-365 ir -429).

Tyrimui naudoti šlapimo nuosėdų mėginiai buvo surinkti dviem būdais – kateterizuojant šlapimo pūslę operacijos metu (PV1 grupė) ir pasišlapinus prieš operaciją (PV2 grupė), – todėl ir palyginimai atlikti su atitinkamai surinktais kontrolinių asmenų mėginiais. Iš viso atrinktos miR-148a, miR-365, miR-375 ir miR-429 ištirtos 300 šlapimo mėginių, iš kurių 215 mėginių buvo PV atvejai ir 85 kontrolinių asmenų mėginiai (GPH ir AK).

PV1 (N = 143) vs. GPH (N = 23). PV ligonių šlapime buvo rastas statistiškai reikšmingai padidėjęs miR-375 kiekis ($P < 0,001$; FC 2,4), o miR-148a – sumažėjęs ($P < 0,001$; FC -2,0) (3.3A pav.). Pažymėtina, kad miR-375 raiška buvo padidėjusi ir navikiniame audinyje. Taip pat miR-429 kiekis buvo didesnis ($P = 0,029$), o miR-375 – mažesnis ($P = 0,003$) aukštesnės stadijos prostatos vėžiu sirgusių ligonių šlapime (S5 priedų lentelė).

PV2 (N = 72) vs. AK (N = 62). Nustatyta analogiška miR-148a ir miR-375 koreliacija, kaip ir PV1 grupėje. Papildomai nustatytas statistiškai patikimas miR-365 kiekio sumažėjimas ($P < 0,001$; FC -1,6) PV2 šlapimo mėginiuose, palyginus su AK mėginiais (3.3B pav.). Pažymėtina, kad miR-375 kiekis buvo 2,4 karto didesnis PV2 grupės atvejuose, kurių navikuose vyko sulietinio *TMPRSS2-ERG* transkripto raiška ($P = 0,037$).

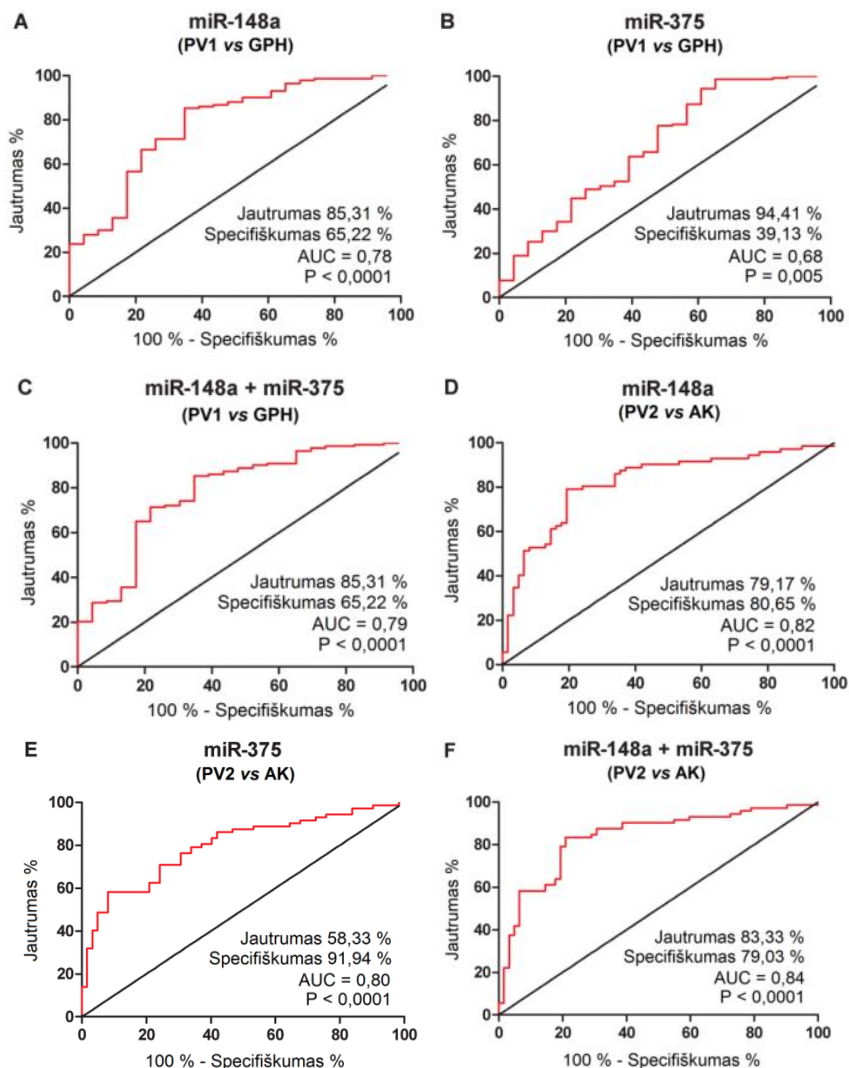
PV1+2 (N = 215) vs. GPH+AK (N = 85). Įvertinus miRNR kieki nepriklausomose imtyse, buvo atlikta bendra miRNR kiekio šlapimo mėginiuose analizė ($N = 300$). Kaip ir kiekvienoje imtyje atskirai, taip ir apjungtoje analizėje miR-375 kiekis buvo statistiškai patikimai didesnis, o miR-148a – mažesnis PV sergančių ligonių vs. kontrolinių asmenų šlapime ($P < 0,001$; FC 1,7 ir FC -1,7, atitinkamai; 3.3 C pav.). Be to, bendroje analizėje miR-365 kiekis taip pat buvo reikšmingai mažesnis vėžiu sirgusių ligonių šlapime ($P = 0,019$; FC -1,2). Didesnis miR-375 kiekis nustatytas onkologinių ligonių šlapime, kuriems buvo diagnozuotas žemesnės stadijos navikas ($P = 0,045$).



3.3 pav. miRNR analizė prostatos vėžiu (PV) sergančių ligonių ir kontrolinių asmenų šlapime: PV1 vs. asmenys, kuriems nustatyta gerybinė prostatos hiperplazija (GPH) (A), PV2 ir asimptomatiniai kontroliniai asmenys (AK) (B) ir visi PV atvejai bei apjungtos kontrolinių asmenų grupės (C). Horizontalios linijos stačiakampės diagramos viduje žymi normalizuotų duomenų medianą; ūsai – mažiausią ir didžiausią reikšmę; * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,001$.

3.1.3. Diagnostinio miRNR potencialo vertinimas

Buvo apskaičiuota šlapimo miRNR diagnostinė vertė. Didžiausią diagnostinį potencialą turinčių šlapimo miRNR (miR-148a ir miR-375) jautrumas ir specifiškumas buvo vertintas ROC kreivių analize (angl. *Receiver Operating Characteristic*). Palyginimai buvo atlikti atskirose PV grupėse naudojant šlapimo rinkimo būdą atitinkančias kontroles, t. y. PV1 vs. GPH ir PV2 vs. AK (3.4 pav.). Apskaičiuotas plotas po ROC kreivėmis –AUC (nuo angl. *Area Under the ROC Curve*) miR-148a atveju siekė 0,78 ir 0,82 (3.4A ir B pav.), o miR-375 atveju – 0,68 ir 0,80, analizuojant PV1 ir PV2 grupes, atitinkamai (3.4D ir E pav.). Didžiausia diagnostinė vertė buvo nustatyta šių miRNR deriniui ir atitinkamuose palyginimuose siekė $AUC=0,79$ ir $0,84$ (3.4C ir F pav.).

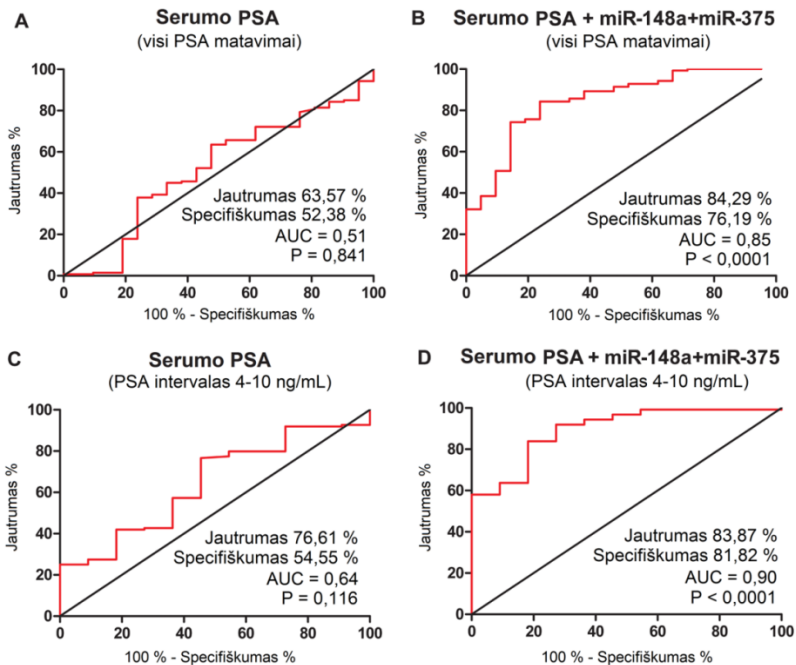


3.4 pav. Šlapime aptinkamų prostatos vėžiui (PV) specifinių miRNR ROC kreivių analizė. Šlapimo miRNR derinys su PSA (B), kai analizė atlikta pilname PSA reikšmių intervale (C) ir atskirai PSA testo „pilkojoje zonoje“ (kai PSA koncentracija 4–10 ng/mL) (D). Žymenų jautrumas ir specifiškumas vaizduojamas ROC kreivėmis; AUC – plotas po ROC kreive.

Šlapimo miRNR jautrumas ir specifiškumas buvo palygintas ir su plačiai PV diagnostikoje taikomo PSA testo charakteristikomis. Visi šlapimo miRNR įverčiai (jautrumas, specifiškumas ir AUC įvertis) buvo didesni už PSA įverčius (AUC atitinkamai lygus 0,78, 0,68 ir 0,51). Atlikus logistinę regresinę analizę ir apjungus PSA ir miRNR žymenis, derinio

charakteristikos viršijo pavienio PSA įverčius: jautrumas (84 % vs. 64 %), specifiškumas (76 % vs. 52 %) ir AUC = 0,85 vs. 0,51 (3.5A ir B pav.).

Serumo PSA ir šlapimo miRNR jautrumas ir specifiškumas buvo įvertintas PV atvejuose, kurių serumo PSA koncentracija buvo 4–10 ng/mL – vadinamojoje PSA „pilkojoje zonoje“. PV1 grupėje tokių atvejų buvo 76 iš 143 (53 %), tarp GPH – 11 iš 23 (48 %). Šioje mėginių subgrupėje PSA specifiškumas buvo ribinis (55 %), tačiau gerokai padidėjo į analizę įtraukus šlapimo miRNR (3.5C ir D pav.). Kombinuotoje analizėje buvo pasiektas aukštas PSA ir miRNR derinio jautrumas ir specifiškumas (84 % ir 82 %), o AUC siekė 0,90 (3.5D pav.).



3.5 pav. Prostato vėžiui (PV) specifinių šlapimo miRNR ir prostatai specifinio antigeno (PSA) ROC kreivių analizė. Serumo PSA (A) ir šlapimo miRNR derinys su PSA (B), kai analizė atlikta pilname PSA reikšmių intervale (C) ir atskirai PSA testo „pilkojoje zonoje“ (kai PSA koncentracija 4–10 ng/mL) (D). Žymenų jautrumas ir specifiškumas vaizduojamas ROC kreivėmis; AUC – plotas po ROC kreive; analizė atlikta tik PV1 ir gerybinės prostatos hiperplazijos mėginių grupėje.

Šiame tyrime PV specifinės miRNR buvo sėkmingai nustatytos neagresyviu PV sergančių ligonių šlapime ir jų kiekis reikšmingai skyrėsi nuo kontrolių. Tai rodo, kad šlapimo miRNR gali būti tinkamas įrankis neinvaziniam PV aptikimui net ankstyvose ligos stadijose. Taip pat šiuo

tyrimu parodyta, kad miR-375 ir miR-148a derinys gali žymiai pagerinti PSA testo jautrumą ir specifiškumą, įskaitant ir ligonius, kurių PSA testo įvertis priklauso „pilkajai zonai“ (4–10 ng ml/L).

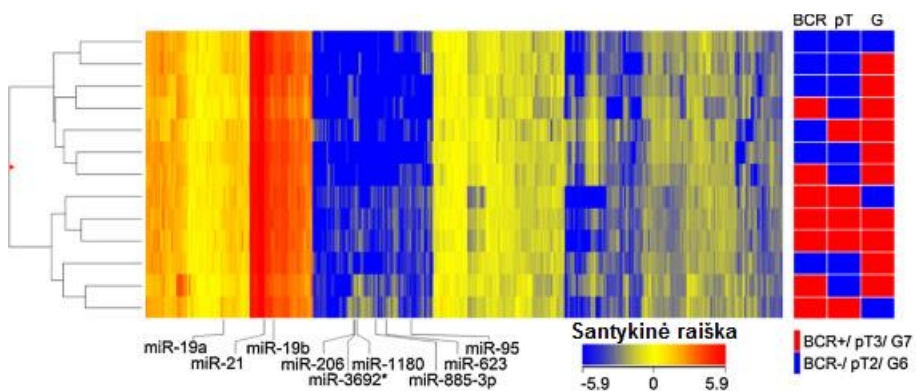
3.2. miRNR biocheminio atkryčio prognozei

Pradiniame tyrime nustatčius PV specifines miRNR ir jas identifikavus PV ligočių šlapime [Stuopelyte ir kt., 2016a], tačiau neaptikus sąsajų su ligos eigos prognoze, tyrimas buvo tęsiamas šia linkme. Siekiant atrinkti šlapimo miRNR, kuriomis remiantis būtų galima prognozuoti biocheminę ligos progresiją, visuminė miRNR raiška PV audiniuose buvo iširta mikrogardelėmis (*Agilent Technologies*). Atrinktos miRNR buvo validuotos TLDA gardelėmis metodinėje darbo dalyje aprašytu būdu, o atrinktos miRNR iširtos PV1 ir GPH šlapimo mėginių imtyse ir įvertintas jų diagnostinis ir prognostinis potencialas [Stuopelyte ir kt., 2016b].

3.2.1. Visuminė miRNR raiškos analizė mikrogardelėmis

Visuminė miRNR raiška buvo įvertinta 13 PV mėginių, iš kurių 7 atvejams vėliau pasireiškė biocheminė ligos progresija. Tokiu būdu siekta nustatyti agresyvių fenotipą lemiančias miRNR. Tyrimui pasirinktos mikrogardelės, kuriomis vienu metu mėginyje galima įvertinti 1347 subrendusių žmogaus miRNR raišką.

40,6 % (547 / 1347) tirtų miRNR raiška buvo nustatyta bent viename iš analizuotų PV mėginių, iš kurių 450 (82,3 %) miRNR raiška vyko ≥ 30 % mėginių (3.6 pav.). Šios miRNR buvo įtrauktos į pagrindinę statistinę analizę.



3.6 pav. miRNR raiška prostatos vėžio mėginiuose. Vaizduojamos tik tos miRNR, kurių raiška vyko bent 30 % mėginių (N = 450). Santykinai aukšta raiška vaizduojama raudonai, žema – mėlynai; atvejai, kuriems būdinga biocheminė ligos progresija (BCR+), aukštesnė naviko stadija (pT3) ir/ar diferenciacijos laipsnis (G3) dešinėje vaizduojami raudonai.

Visuose mėginiuose buvo nustatyta santykinai aukšta 118-kos miRNR raiška, ir tarp jų buvo tokios miRNR kaip miR-19a/b, -21 ir kitos, gerai žinomos onkogeninės miRNR (miR-15a/b, -30a/b, -34a, -17, -20a, -22 ir kt.). Daugiau nei pusės miRNR raiška buvo santykinai žema, bet didžiausi raiškos skirtumai buvo nustatyti būtent šioje grupėje (aukštos ir žemos raiškos miRNR sąrašas pateiktas S6 priedų lentelėje).

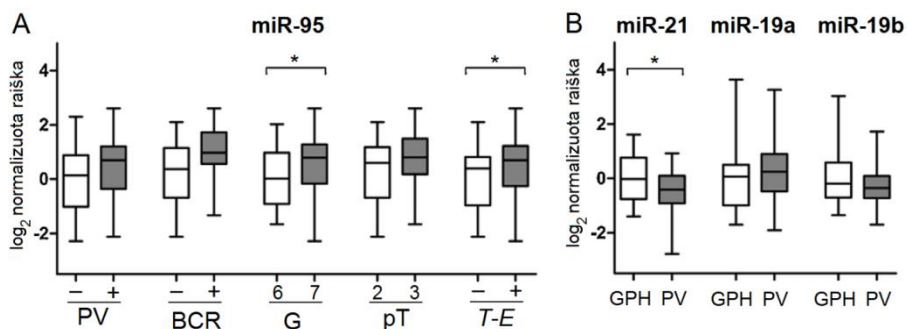
Palyginus navikus pagal klinikines-patologines charakteristikas, nustatyta keliasdešimt statistiškai reikšmingai besiskiriančių miRNR (S7 priedų lentelė):

- biocheminė ligos progresija (BCR+/-): nustatytos 26 pakitusios raiškos ($P < 0,050$; $FC > 1,5$ karto) miRNR: 23 – padidėjusios (miR-206, miR-623, miR-885-3p, miR-1180, miR-3692* ir kt.), 3 – sumažėjusios, o miR-95 – ribinis statistinis reikšmingumas ($P=0,054$);
- naviko stadija (pT3/2): 45 pakitusios raiškos miRNR, tarp kurių išaugusi raiška nustatyta anksčiau paminėtoms miR-206, miR-3692*, miR-885-3p ir miR-95 ($FC \geq 13,0$, $P \leq 0,050$);
- naviko diferenciacijos laipsnis (G6/7): 21 reikšmingai pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 12 raiška buvo padidėjusi ir 9 sumažėjusi.

Remiantis nustatytais pokyčiais, tyrimui didesnėje mėginių imtyje atrinktos 6 miRNR (miR-95, -206, -623, -885-3p, -1180 ir -3692*), iš kurių dauguma buvo susijusios su biochemine ligos progresija. Tyrimas vykdytas kiekybinės PGR metodu anksčiau aprašytoje 52 navikinių (13 iš jų tirti mikrogardelėmis) ir 12 nenavikinių mėginių imtyje. Kiekybinės PGR metodu buvo aptikta labai žema miR-206, -885-3p ir -3692* raiška, o miR-95, -623 ir -1180 raiška prostatos audiniuose buvo didesnė. miRNR raišką palyginus tarp navikinių ir nenavikinių prostatos audinių, reikšmingų skirtumų nebuvo nustatyta. Tačiau palyginus PV atvejus tarp anksčiau aprašytų klinikinių-patologinių PV grupių, išsiskyrė miR-95, kurios raiška buvo didesnė visais agresyvesnę ligą rodančiais atvejais: ribinė reikšmingumo vertė ($P = 0,054$) vėl nustatyta PV sergantiems ligoniams, kuriems vėliau pasireiškė biocheminė ligos progresija, o reikšmingas padidėjimas rastas aukštesnio diferenciacijos laipsnio ($P = 0,041$) ir sulietinį *TMPRSS2-ERG* transkriptą turinčiuose navikuose ($P = 0,026$) (3.7A pav.). Kitos miRNR reikšmingai nesiskyrė, bet 2,5 karto didesnė miR-206 ($P = 0,049$) raiška buvo nustatyta navikuose, kuriuose vyko *TMPRSS2-ERG* sulietino transkripto raiška.

miRNR analizė šlapime. Kadangi atrinktų miRNR raiška audiniuose buvo maža, o bandomojo miR-95 tyrimo šlapime metu buvo gauti nespecifiški rezultatai, dėl kurių miR-95 nėra tinkama tyrimui organizmo skysčiuose, iš mikrogardelių analizės ir remiantis publikuotais duomenimis tolimesniam tyrimui šlapime buvo atrinktos 3 didelės raiškos ir su PV vystymuisi siejamos miRNR: miR-19a, miR-19b ir miR-21.

Palyginus PV specifinių miR-19a/b ir -21 kiekį 143 PV1 ir 23 GPH ligonių šlapime, apie 1,5 karto didesnis miR-21 kiekis buvo rastas GPH šlapime ($P = 0,010$) (3.7B pav.). miR-19a ir miR-19b kiekis reikšmingai tarp PV ir GPH nesiskyrė, taip pat jokių reikšmingų sąsajų nebuvo rasta su klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis.

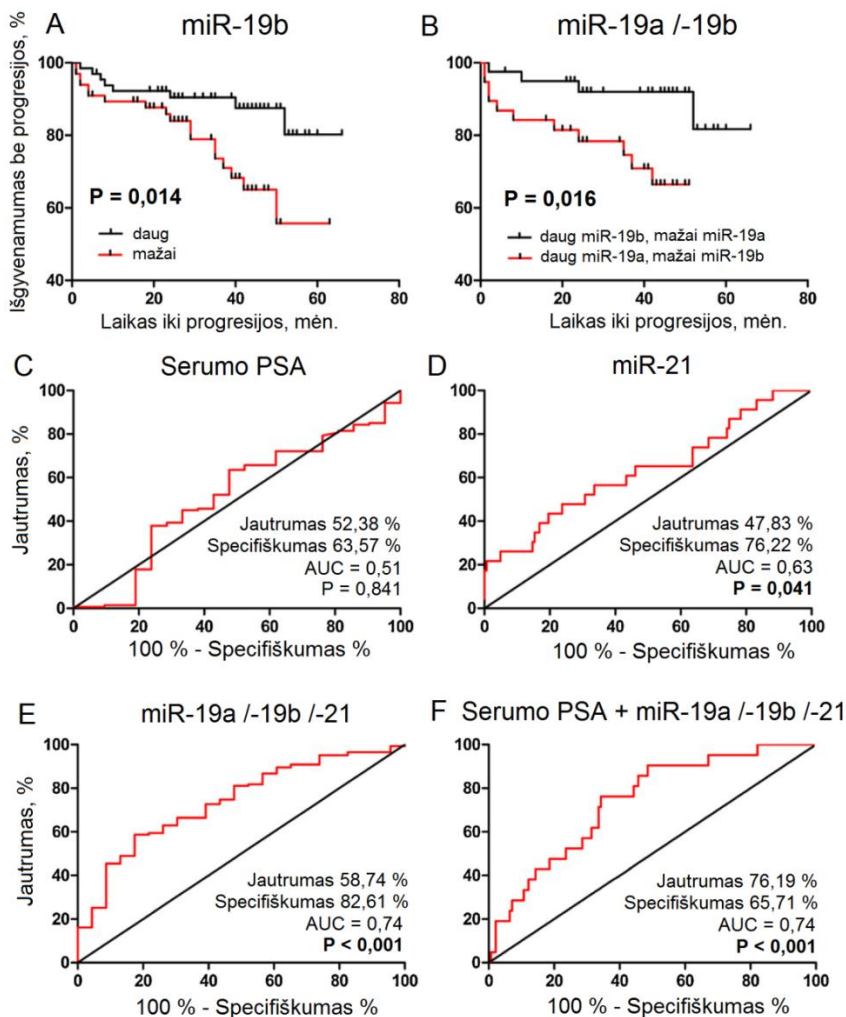


3.7 pav. miRNR analizė prostatos vėžiu (PV) sergančių ligonių prostatos audiniuose ir šlapime. (A) miR-95 raiškos skirtumai tarp navikinių (+) ir nenavikinių (-) PV audinių ir tarp PV navikų grupių, suskirstytų pagal klininius-patologinius parametrus: biocheminę ligos progresiją (BCR+/-), Gleason balą (G6/7), naviko stadiją (pT2/3) ir sulietinio transkripto *TMPRSS2-ERG* statusą (T-E+/-). (B) miRNR kiekio palyginimas šlapime, surinktame iš PV ir asmenų, kuriems buvo nustatyta gerybinė prostatos hiperplazija (GPH). Linijos dėžučių viduje žymi medianą, „ūšai“ – mažiausią ir didžiausią miRNR vertę, * – $P < 0,05$

3.2.2. Šlapimo miRNR prognostinio potencialo vertinimas

Pirmiausia aukščiau aprašytu metodu įvertinus diagnostinį miR-19a/b ir -21 potencialą, didžiausia diagnostinė vertė buvo būdinga visų miRNR deriniui ($AUC = 0,74$, 3.8E pav.). miRNR prijungus prie PSA, buvo pagerinta PSA testo diagnostinė vertė ($AUC = 0,74$ vs. $0,51$, 3.8F pav.). Siekiant įvertinti prognostinį šių miRNR potencialą buvo atlikta *Kaplan-Meier* išgyvenamumo analizė: miRNR kiekį šlapime pagal medianą suskirsčius į didelį ir mažą, ieškota sąsajų su biocheminiu ligos atkryčiu. Nustatyta, kad ligoniams, kurių šlapime, surinktame operacijos metu, esant mažesniai kiekiui miR-19b ($P = 0,014$, 3.8A pav.) arba mažesniai miR-19b ir

didesniam kiekiui miR-19a ($P = 0,016$, 3.8B pav.), biocheminė progresija pasireiškė statistiškai reikšmingai greičiau.



3.8 pav. Prognostinė ir diagnostinė šlapimo miRNR vertė. Išgyvenamumo be progresijos numatymas remiantis prostatos vėžiu sergančių ligonių šlapimo miR-19b (A) ir miR-19a/-19b deriniu (B); mažesnis miR-19b kiekis abiejose paveikslo dalyse vaizduojamas raudona kreive. Diagnostinio potencialo palyginimas tarp serumo PSA (C) ir šlapimo miR-21 (D) ir miR-19a/-19b/-21 derinio (E) bei visų šlapimo miRNR derinys su PSA (F). AUC – plotas po kreive (angl. *area under the ROC curve*).

Apibendrinant galima pasakyti, kad miRNR raiškos profilis PV audiniuose labai skiriasi tarp grupių, suskirstytų pagal klinikines-patologines

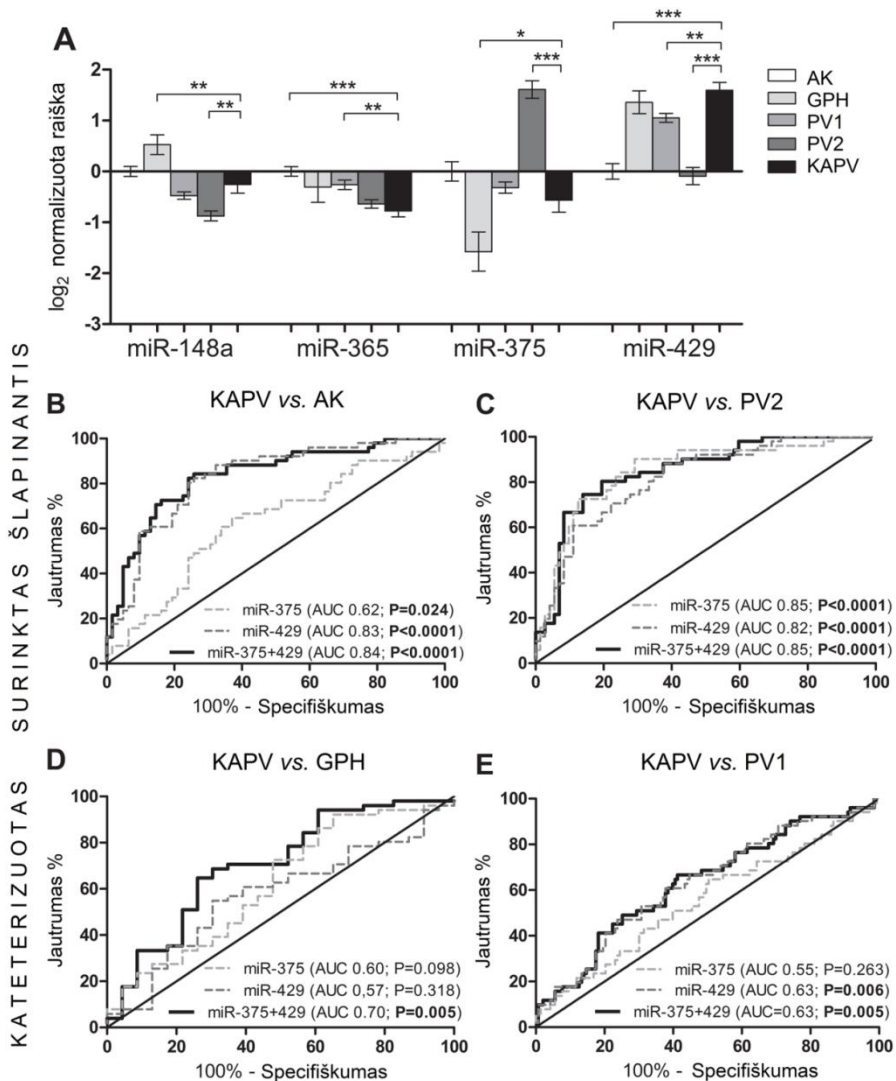
PV charakteristikas. PV audiniuose nustatytos padidėjusios raiškos miR-19a/b ir miR-21 gali būti nustatytos ir ligonių šlapime. Prieš radikalią prostatektomiją surinktame šlapime ištirtos miR-19b ir miR-19a galėtų būti naudojamos prognozuoti biocheminę ligos progresiją. Nors šių miRNR derinys gali pagerinti PSA tyrimo diagnostinę vertę, bendras testo specifiškumas išlieka gana žemas.

3.3. miRNR atsako į gydymą prognozei

Nustatę diagnostinį ir prognostinį miRNR potencialą [Stuopelyte ir kt., 2016a; Stuopelyte ir kt., 2016b], toliau siekėme išsiaiškinti, ar šios miRNR būtų tinkamos atsako į gydymą abiraterono acetatu prognozavimui kastracijai atspariu PV (KAPV) sergantiems ligoniams (klinikinės-patologinės į tyrimą įtrauktų ligonių charakteristikos pateiktos S8 priedų lentelėje). Pirmiausia buvo įvertintas miRNR atrankumas KAPV, palyginta, kaip miRNR šlapime kinta gydymo eigoje, ir apskaičiuotas išgyvenamumas be progresijos bei bendrasis išgyvenamumas (Stuopelyte ir kt., rankraštis).

3.3.1. miRNR tyrimas KAPV sergančių ligonių šlapime

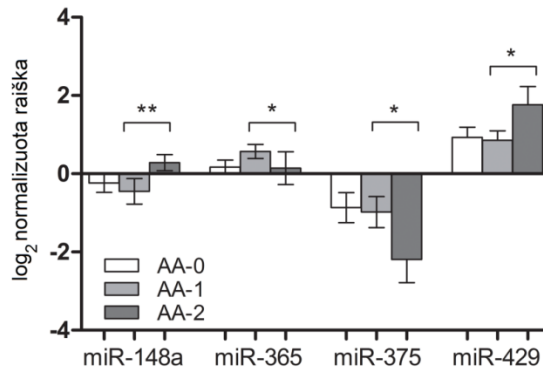
miR-148a, -365, -375 ir -429 buvo ištirtos 51 šlapimo mėginyje, surinktame iš 22 KAPV sergančių ligonių prieš gydymą abiraterono acetatu (AA-0) ir jo eigoje – ligai progresavus arba 2 kartus kas 6 mėn. (AA-1/2). miRNR kiekis KAPV buvo palygintas su anksčiau aprašytais neagresyvos eigos PV1 ir PV2 ir kontrolinių asmenų (GPH ir AK) imtimis. miR-429 kiekis KAPV šlapimo mėginiuose buvo didžiausias iš visų palygintų imčių ir reikšmingai skyrėsi nuo abiejų PV ir kontrolinių asmenų grupių (3.9A pav.), o kitų miRNR kiekis KAPV buvo santykinai mažesnis. Labiausiai KAPV šlapime išsiskyrė miR-375 ir miR-429, todėl su jomis bei jų deriniu atlikus ROC analizę paaiškėjo, kad šių miRNR derinys pralenkia atskirų miRNR diagnostinę vertę atskiriant KAPV nuo AK, GPH, PV1 ir prilygsta miR-429 vertei PV2 imtyje (3.9B-E pav.).



3.9 pav. miRNR ir miRNR diagnostinio potencialo palyginimas. Šlapimas surinktas iš kastracijai atsparių prostatos vėžių (KAPV) ir neagresyviu PV sergančių ligonių (paprastai šlapinantis PV1, kateterizuojant – PV2) ir kontrolinių asmenų imčių (asimptotiniai asmenys, AK, ir asmenys, kuriems nustatyta gerybinė prostatos hiperplazija, GPH) (A); miR-375 ir miR-429 derinio ROC kreivių analizė, lyginant KAPV ir visas išvardintas PV ligonių ir kontrolinių asmenų imtis (B-E). A dalyje stulpeliai vaizduoja vidurkį, „ūšai“ – standartinę vidurkio paklaidą, * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,0001$.

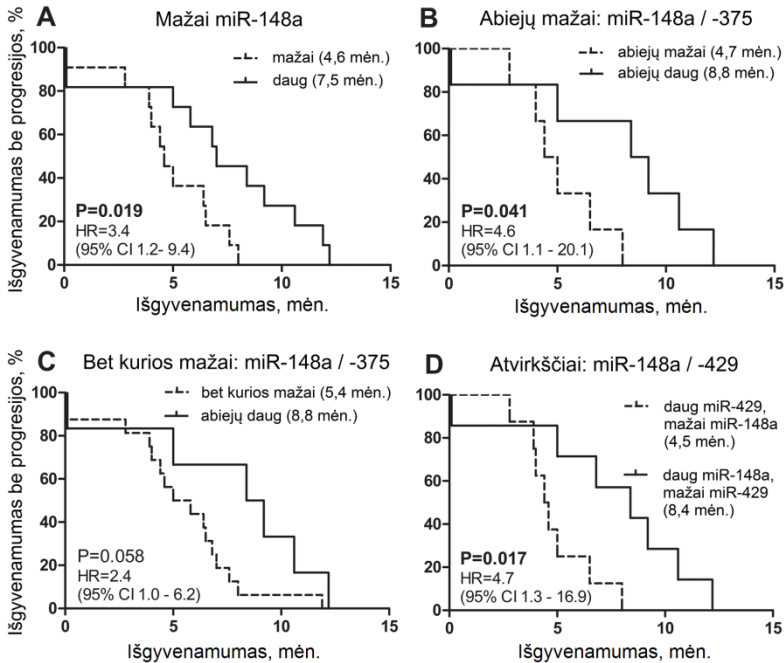
3.3.2. Šlapimo miRNR atsako į gydymą prognozavimui

miRNR analizė gydymo eigoje. Norint patikrinti, ar šios miRNR yra susijusios su AA gydymu, analizė buvo atlikta tik KAPV sergančiųjų šlapimo mėginiuose (N = 51). Palyginus miRNR kiekį serijiniuose prieš gydymą (AA-0, N = 22) ir gydymo metu surinktuose (AA-1/2, N = 29) mėginiuose, paaiškėjo, kad miR-429 kiekis gydymo metu didėjo, miR-375 – mažėjo, o miR-148a ir miR-365 kiekis buvo nepastovus (3.10 pav.). Tokie svyravimai, ypač nuoseklus miR-429 kiekio augimas ir miR-375 mažėjimas, galimai atspindi ligos progresiją.



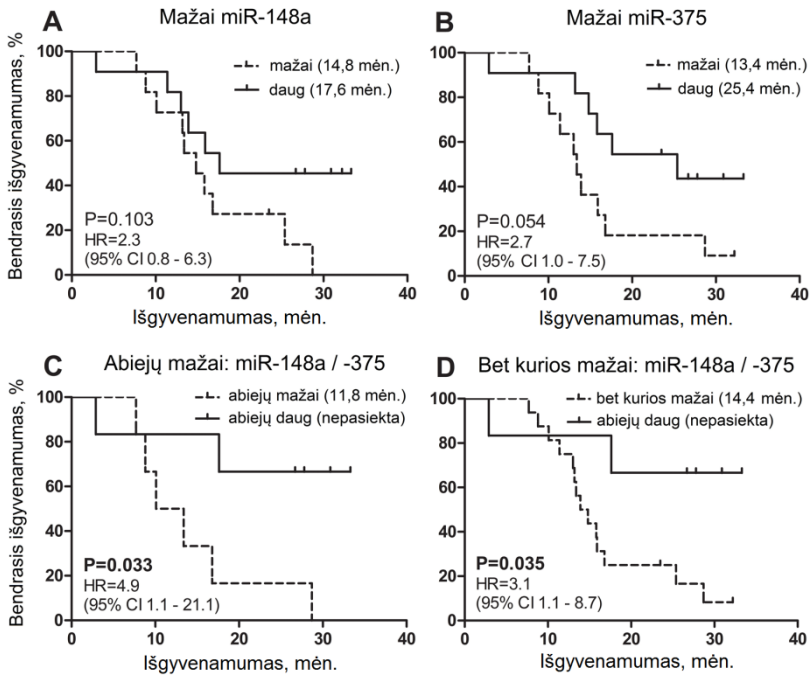
3.10 pav. Šlapimo miRNR kiekio kitimas gydymo eigoje. miRNR kiekis palygintas šlapime, surinktame iš kastracijai atsparių prostatos vėžiu sergančių ligonių prieš paskiriant gydymą abiraterono acetatu (AA) (AA-0) ir gydymo eigoje (AA-1/2). Stulpeliai vaizduoja medianą, „ūšai“ – standartinę vidurkio paklaidą, * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$.

Išgyvenamumo be progresijos (PFS) prognozavimas. Siekiant patikrinti, ar remiantis šių miRNR analize būtų galima nuspėti atsparumą AA gydymui ir jo baigtį, miRNR kiekis buvo vertintas tik AA-0 KAPV sergančiųjų šlapimo mėginiuose (N = 22). miRNR kiekis pagal medianą buvo suskirstytas į didelį ir mažą. Išgyvenamumo analizė atskleidė, kad ligonių, kurių AA-0 mėginiuose buvo nustatytas didesnis kiekis miR-365 ir miR-429 ir mažesnis kiekis miR-148a ir miR-375, išgyvenamumas be progresijos yra trumpesnis, tačiau statistiškai reikšmingai siejosi tik miR-148a (4,6 vs. 7,5 mėn., $P = 0,019$; 3.11A pav.). Atlikus miRNR derinių analizę, nustatyta, kad trumpesnis PFS būdingas ligoniams, kurių šlapime yra mažiau miR-148a ir miR-375 bei priešingas kiekis miR-148a ir miR-429 (3.11B-D pav.). Visų rodiklių Cox regresijos analizė patvirtino, kad remiantis miR-148a PFS galima nuspėti nepriklausomai nuo kitų kintamųjų (S9 priedų lentelė).



3.11 pav. Išgyvenamumo be progresijos prognozavimas pagal miRNR. Šlapimas surinktas iš kastracijai atspariu prostatos vėžiu sergančių ligonių prieš paskiriant abiraterono acetatą: miR-148a (A) ir įvairūs miRNR deriniai, kai abiejų (B) ar bet kurios iš dviejų (C) miRNR yra mažai arba jų kiekis yra priešingas (D). Skliaustuose nurodyta išgyvenamumo be progresijos mediana; HR – santykinė rizika; CI – pasikliautinis intervalas.

Bendrojo išgyvenamumo (OS) prognozavimas. Atlikus bendrojo išgyvenamumo analizę buvo gauta panaši sąsaja, kaip ir PFS analizės atveju. Nors jokia miRNR nebuvo statistiškai reikšmingai susijusi su OS, ligoniai, kurių prieš gydymą surinktame šlapime buvo santykinai mažesnis kiekis miR-148a ir miR-375, išgyveno trumpiau (3.12A ir B pav.). Tačiau ligoniai, kurių šlapime buvo nustatytas mažesnis kiekis abiejų ar bet kurios iš šių miRNR, OS buvo statistiškai reikšmingai trumpesnis (3.12C ir D pav., atitinkamai). Visų rodiklių *Cox* regresinė analizė taip pat patvirtino, kad remiantis miR-148a ir miR-375 deriniu OS galima nuspėti geriausiai, tačiau modelio statistinė reikšmė buvo ribinė ($P = 0,060$; S9 priedų lentelė).



3.12 pav. Bendrojo išgyvenamumo prognozavimas pagal miRNR. Šlapimas surinktas iš kastracijai atsparių prostatos vėžiu sergančių ligonių prieš paskiriant abiraterono acetatą: miR-148a (A), miR-375 (B) ir šių miRNR deriniai, kai abiejų (C) ar bet kurios iš dviejų (D) miRNR yra mažai. Skliaustuose nurodyta išgyvenamumo be progresijos mediana; HR – santykinė rizika; CI – pasikliautinis intervalas.

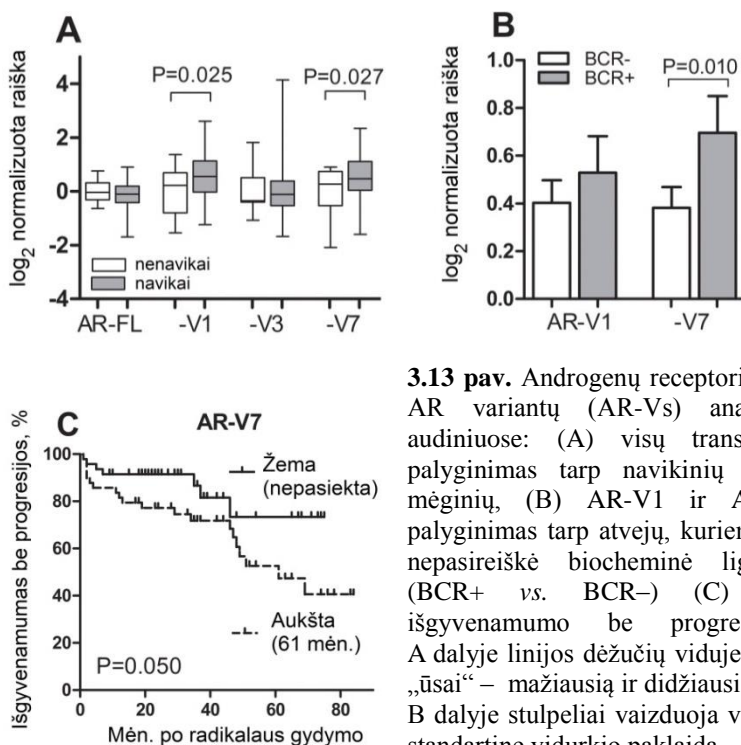
Apibendrinant, šis tyrimas atskleidė šlapime ištirtų miR-148a, -365, -375 ir -429 prognostinę vertę. Šlapimo miRNR deriniai gali būti panaudoti kaip įrankis išgyvenamumui be progresijos ir bendrajam išgyvenamumui AA gydytiems KAPV ligoniams prognozuoti. Siekiant patvirtinti atradimus reikalingi tolimesni tyrimai didesnėse ligonių imtyse.

3.4. AR-V transkriptai atsako į gydymą prognozei

Ne tik trumposios, bet ir ilgosios, baltymus koduojančios, RNR aptinkamos kraujyje cirkuliuojančiose vėžio ląstelėse (CVL) gali būti pritaikytos atsakui į gydymą vertinti. Atlikus androgenų receptoriaus (AR-FL, angl. *full length*) ir AR variantų (AR-V: AR-V1, -V3 ir -V7) raiškos analizę navikiniuose ir nenavikiniuose prostatos audiniuose, toliau AR transkriptai buvo tiriami AA-0 ir AA-1/2 kraujo mėginiuose, surinktuose iš KAPV sergančių ligonių ir ieškota sąsajų su atsaku į gydymą, PFS ir OS [Stuopelyte ir kt., 2020].

3.4.1. AR-V tyrimai prostatos audiniuose

Palyginus AR-FL ir AR variantų (AR-V1, -V3 ir -V7) raišką tarp 100 navikinių ir 12 nenavikinių prostatos audinių, statistiškai reikšmingi skirtumai buvo nustatyti AR-V1 ir AR-V7 atveju (3.13A pav.). Šių transkriptų raiška buvo didesnė ir ligonių mėginiuose, kuriems vėliau pasireiškė biocheminė ligos progresija (BCR) (3.13B pav.), o aukštesnė AR-V7 raiška patikimai siejosi su trumpesniu išgyvenamumu be BCR (3.13C pav.).

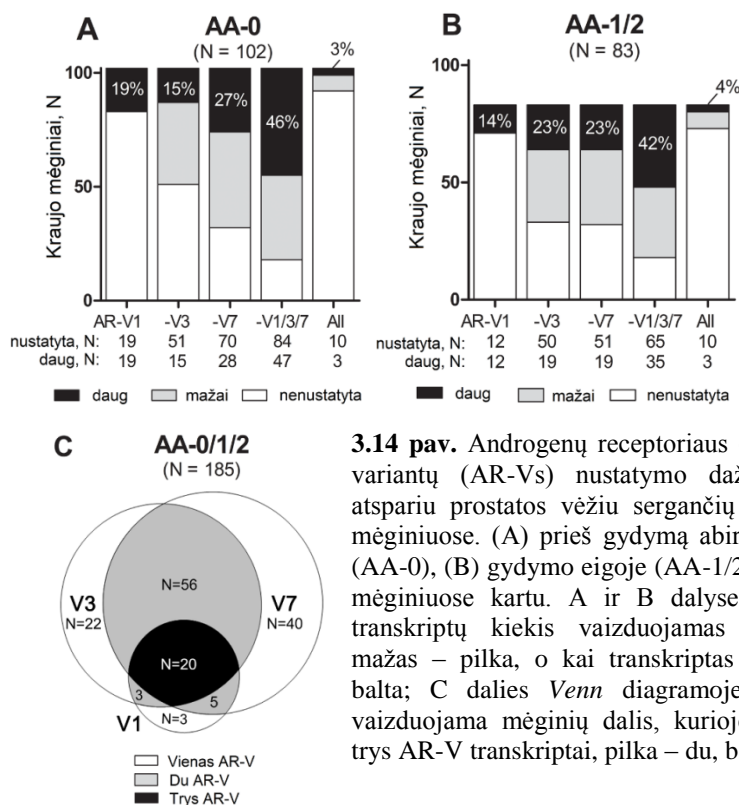


3.13 pav. Androgenų receptoriaus (AR-FL) ir AR variantų (AR-Vs) analizė prostatos audiniuose: (A) visų transkriptų raiškos palyginimas tarp navikinių ir nenavikinių mėginių, (B) AR-V1 ir AR-V7 raiškos palyginimas tarp atvejų, kuriems pasireiškė ir nepasireiškė biocheminė ligos progresija (BCR+ vs. BCR-) (C) bei AR-V7 išgyvenamumo be progresijos analizė. A dalyje linijos dėžučių viduje žymi medianą, „ūšai“ – mažiausią ir didžiausią miRNR vertę; B dalyje stulpeliai vaizduoja vidurkį, „ūšai“ – standartinę vidurkio paklaidą.

3.4.2. AR-V nustatymas kraujyje

AR-FL ir AR variantų transkriptų kiekis buvo įvertintas 199 kraujo mėginiuose, surinktuose iš 102 KAPV sergančių ligonių prieš pradėdant gydymą AA (AA-0, N = 102) ir jo metu (AA-1/2, N=83) bei iš atitinkancio amžiaus sveikų kontrolinių asmenų (N = 14). AR-FL buvo nustatytas visuose KAPV kraujo mėginiuose (N = 185), o AR-V1, -V3 ir -V7 buvo aptikti 17 % (N = 31), 55 % (N = 101) ir 65 % (N = 121), atitinkamai. Bent vienas AR-V nustatytas 81 % (149/185) KAPV kraujo mėginių.

Suskirsčius AR-V kieki į didelį ir mažą pagal didžiausią nustatytą kontrolinių asmenų mėginiuose, didelis bent vieno AR-V transkripto kiekis buvo būdingas 44 % (82/185) KAPV sergančių ligonių mėginių. AR-V pasiskirstymas prieš gydymą rinktuose (AA-0) ir gydymo eigoje rinktuose mėginiuose (AA-1/2) buvo gana panašus (3.14A ir B pav., atitinkamai). Atlikus koreliacinę analizę rasta, kad AR-FL reikšmingai koreliavo su visais AR-V: AR-V1 rho = 0,17, P = 0,019; AR-V3 rho = 0,23, P = 0,002; AR-V7 rho = 0,45, P < 0,001. Koreliacijos tarp AR-V pateiktos S10 priedų lentelėje ir pavaizduotos Venn diagrama 3.14C pav.

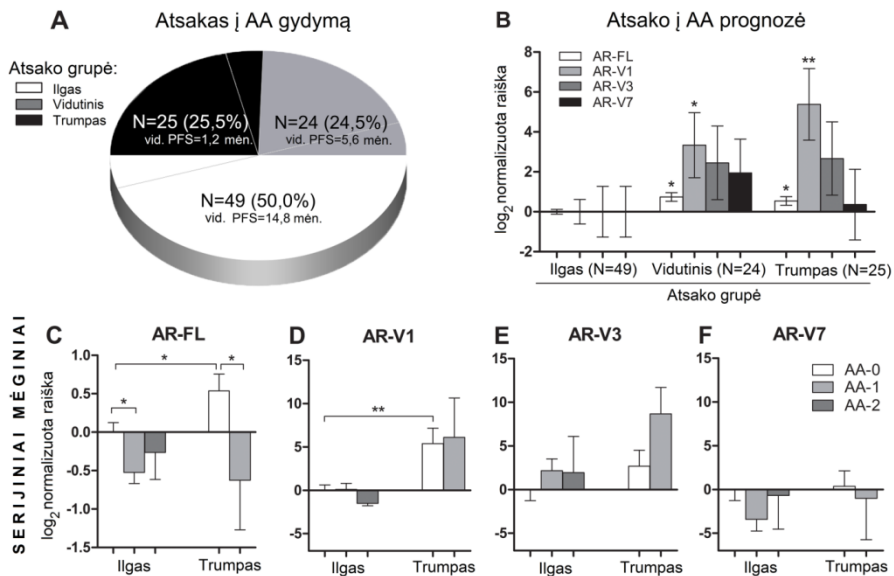


3.14 pav. Androgenų receptoriaus (AR-FL) ir AR variantų (AR-Vs) nustatymo dažnis kastracijai atspariu prostatos vėžiu sergančių ligonių kraujo mėginiuose. (A) prieš gydymą abiraterono acetatu (AA-0), (B) gydymo eigoje (AA-1/2) ir (C) visuose mėginiuose kartu. A ir B dalyse didelis AR-V transkriptų kiekis vaizduojamas juoda spalva, mažas – pilka, o kai transkriptas nenustatytas – balta; C dalies Venn diagramoje juoda spalva vaizduojama mėginių dalis, kurioje nustatyti visi trys AR-V transkriptai, pilka – du, balta – vienas.

3.4.3. AR-V atsako į gydymą prognozavimui

Atsako į gydymą numatymas. Iš 98 ligonių, kuriems atsakas į gydymą buvo žinomas, trumpas ir vidutinis atsakas buvo būdingas lygiai pusei atvejų (PFS < 8,0 mėn., 49/98, 50,0 %); detalus pasiskirstymas pateiktas 3.15A pav. Siekiant patikrinti, ar kraujo AR-V siejasi su atsaku į AA gydymą, AR transkriptų analizė buvo atlikta tik su mėginiais, paimtais prieš gydymo pradžią (N = 102). Palyginus AR-V kiekį tarp skirtingo atsako į gydymą ligonių, mažiausias AR-V transkriptų keikis buvo nustatytas atvejams su ilgiausiu atsaku (>8 mėn.), o AR-V1 kiekis buvo 10 kartų (P = 0,023) didesnis vidutinio ir >40 kartų (P < 0,001) – trumpo atsako ligoniams (3.15B pav.).

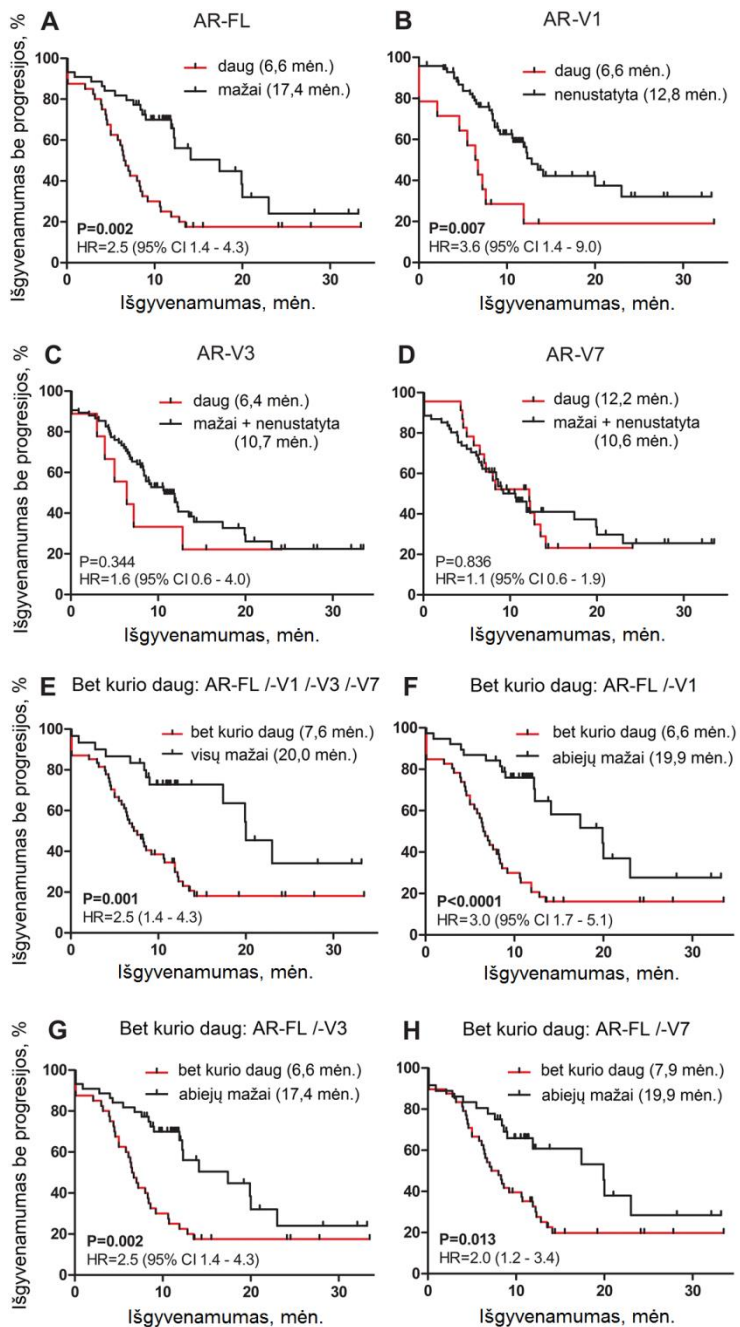
AR-V pokyčiai gydymo metu. Surinkus kraujo mėginius prieš gydymą (AA-0, N=102), 2 tolimesni kraujo ėmimai, jei įmanoma, buvo atliekami po 6 mėnesių arba ligai progresavus (AA-1, N=74; AA-2, N=9). Tokiu būdu galėjome sekti ligos progresiją ir stebėti individualią ligos eigą. Mažiausias AR-FL ir visų AR-V kiekis buvo nustatytas ilgo atsako grupėje, didžiausias – trumpo (3.15C-F pav.), o reikšmingi skirtumai buvo rasti AR-FL ir AR-V1 atveju.



3.15 pav. Kraujo androgenų receptoriaus (AR) ir AR variantų (AR-V) kiekis kastracijai atspariu prostatos vėžiu (KAPV) sergančių ligonių atsako į gydymą abiraterono acetatu (AA) prognozavimui ir vertinimui. (A) AA gydytų ligonių išgyvenamumas be progresijos (PFS), suskirstytas pagal atsako trukmę. 4-ių ligonių atsakas į gydymą nežinomas; 14-kai ligonių AA buvo išrašytas kaip II eilės vaistas po docetakselio, ši ligonių dalis grafike atskirta pilkomis linijomis. (B) Atsako į gydymą AA prognozė, remiantis AR transkriptų tyrimu surinktame prieš gydymą kraujyje. Stulpeliai vaizduoja vidurkius, „ūšai“ – standartines vidurkio paklaidas (SEM), * – $P \leq 0,050$, ** – $P < 0,001$. (C-F) Kraujo AR transkriptų kiekio palyginimas tarp KAPV sergančių ligonių, kuriems buvo būdingas ilgas ir trumpas atsakas į AA gydymą. Stulpeliai vaizduoja vidurkius, „ūšai“ – SEM, * – $P \leq 0,050$.

Išgyvenamumo be progresijos (PFS) prognozavimas. Norint patikrinti, ar AR transkriptų tyrimas kraujyje galėtų būti naudojamas gydymo baigčių numatymui (PFS ir OS), išgyvenamumo analizės (*Cox* regresinė ir *Kaplan-Meier* išgyvenamumo kreivių analizės) buvo atliktos tik su KAPV kraujo mėginiais, surinktais prieš gydymą AA (N=102). AR transkriptų kiekis buvo vertintas dviem būdais: kaip tolydus dydis ir suskirsčius į didelį ir mažą, pagal medianą (AR-FL), ar pagal didžiausią kiekį, nustatytą kontrolinių asmenų kraujyje (AR-V). Taip pat į analizę buvo įtraukti klinikiniai-patologiniai rodikliai (serumo PSA prieš gydymą, metastazių buvimas, ADT atsako trukmė ir kt; S11 priedų lentelė).

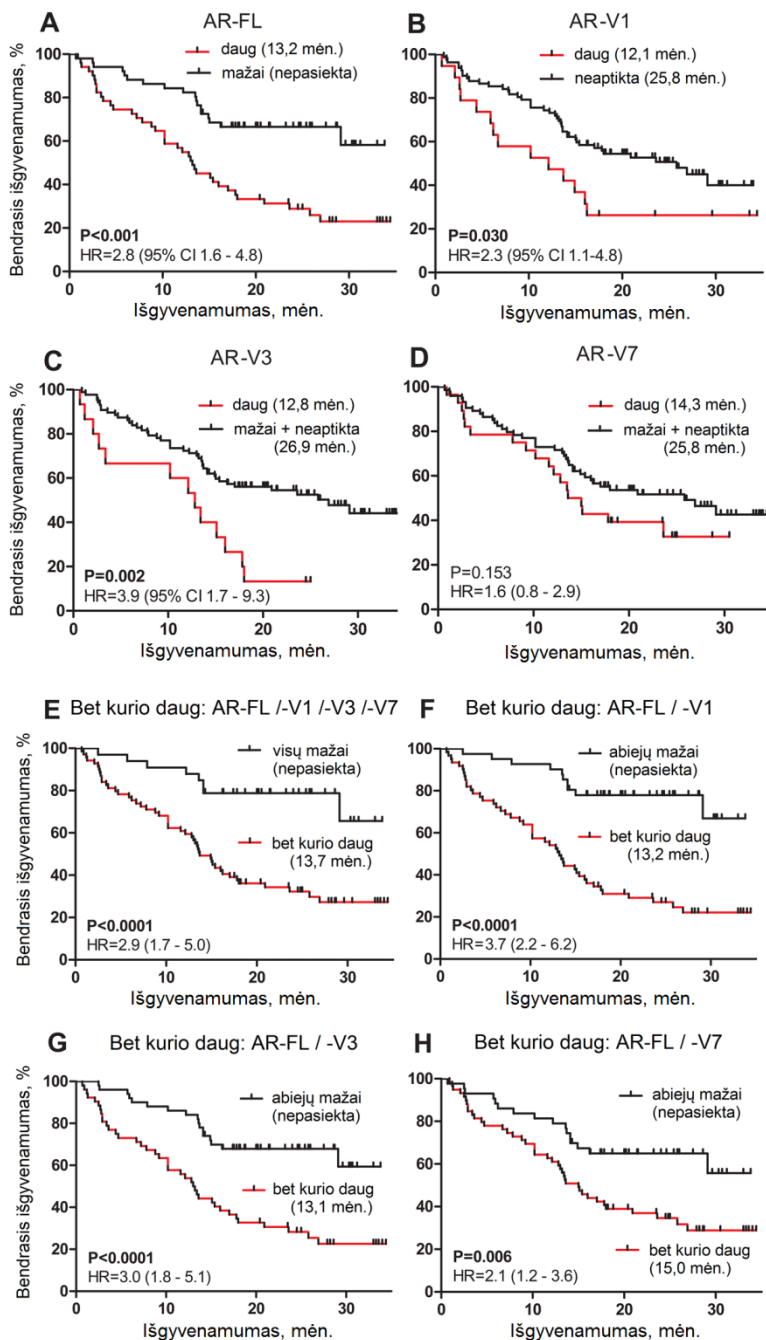
Pavienių kintamųjų analizė parodė, kad didesnis kiekis AR-FL reikšmingai siejasi su trumpesniu PFS ($P = 0,006$). Iš AR-V reikšmingiausia sąsaja buvo nustatyta AR-V1 (S11 priedų lentelė). *Kapan-Meier* išgyvenamumo kreivių analizė patvirtintino didesnio kiekio AR-FL (3.16A pav.) ir AR-V1 (3.16B pav.) kiekio sąsają su trumpesniu PFS. Taip pat trumpesnis išgyvenamumas be progresijos buvo būdingas ir tiems ligoniams, kurių kraujyje buvo nustatytas didesnis bet kurio transkripto kiekis (3.16E pav.) arba daugiau AR-FL ir bet kurio iš AR-V transkripto derinys (3.16F-H pav.). Visgi didžiausią prognostinę reikšmę turėjo AR-FL ir AR-V1 derinys (6,6 vs. 19,9 mėn.; $P < 0,0001$; HR 3,0, 95 % CI 1,7-5,1) (3.16F pav.).



3.16 pav. Išgyvenamumo be progresijos įvertinimas, analizuojant (A) viso ilgio androgenų receptorių (AR-FL), AR variantus AR-V1 (B), -V3 (C), -V7 (D) ir jų derinius (E-H) kraujo mėginiuose, surinktuose iš kastracijai atsparių prostatos vėžiu sergančių ligonių prieš pradėdant gydymą abiraterono acetatu. Skliaustuose nurodyta išgyvenamumo be progresijos mediana; HR – santykinė rizika; CI – pasikliautinis intervalas.

Bendrojo išgyvenamumo (OS) prognozavimas. Atlikus pavienių kintamųjų analizę, visi AR transkriptai, išskyrus AR-V7, statistiškai reikšmingai siejosi su trumpesniu OS (S11 priedų lentelė). Analizuojant visus kintamuosius kartu, AR-FL ir AR-V1 išliko nepriklausomi kintamieji OS prognozavimui. *Kaplan-Meier* išgyvenamumo kreivių analizė patvirtino atskirai analizuojamų AR-FL (3.17A pav.), AR-V1 (3.17B pav.) ir AR-V3 (3.17C pav.) prognostinę OS vertę, tačiau stipresnė sąsaja buvo nustatyta AR transkriptų deriniams (3.17E-H pav.), iš kurių didžiausią prognostinę reikšmę turėjo, kaip ir PFS atveju, AR-FL ir AR-V1 kombinacija (13,2 mėn. vs. nepasiekta; $P < 0,0001$; HR 3,7, 95 % CI 2,2–6,2) (3.17F pav.).

Tai pirmas platesnės apimties AR-FL, -V1, -V3 ir -V7 tyrimas prostatos audiniuose ir kraujyje, surinktame iš kastracijai atsparių PV-iu sergančių ligonių prieš gydymą abiraterono acetatu. Gauti rezultatai rodo, kad remiantis AR transkriptų analize ligoniams gali būti parenkamas gydymas, – kraujyje nustačius didelį bet kurio transkripto kiekį išgyvenamumas be progresijos ir bendrasis išgyvenamumas yra trumpesnis. Atlikus tolimesnius tyrimus nepriklausomose imtyse, viso kraujo AR transkriptų tyrimas galėtų būti pritaikytas klinikose.



3.17 pav. Bendrojo išgyvenamumo įvertinimas, analizuojant (A) androgenų receptorių (AR-FL), AR variantus AR-V1 (B), -V3 (C), -V7 (D) ir jų derinius (E-H) kraujo mėginiuose, surinktuose iš kastracijos atsparių prostatos vėžiu sergančių ligonių prieš pradedant gydymą abiraterono acetatu. Skliaustuose nurodyta bendrojo išgyvenamumo mediana; HR – santykinė rizika; CI – pasikliautinis intervalas.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. miRNR prostatos vėžio diagnostikai

PV audinyje nustatyta padidėjusi miR-148a ir miR-375 raiška yra gana plačiai tyrinėta kitų tyrėjų. miR-148a laikoma onkogenine miRNR, kuri yra susijusi su gydymui ir/ar kastracijai atspariu PV (KAPV) [Fujita ir kt., 2010; Jalava ir kt., 2012], ji skatina PV ląstelių dauginimąsi [Jalava et al, 2012] ir taip prisideda prie PV progresijos [Murata ir kt., 2010]. Be to, ši miRNR dalyvauja androgenų receptoriaus (AR) atsako kelyje [Murata et al, 2010] ir jos raiška yra išaugusi AR-teigiamose PV ląstelių linijose [Fujita et al, 2010]. O įvairių lokalizacijų vėžio atvejais miR-375 raiška randama sumažėjusi, dėl to ši miRNR laikoma naviko augimą slopinančia. Įdomu tai, kad PV [Brase ir kt., 2011; Nguyen ir kt., 2013] ir krūties vėžio [Chen ir kt., 2015]) atveju miR-375 raiška randama išaugusi. Kaip ir mūsų tyrime, taip ir kitų tyrėjų darbuose, kuriuose miRNR raiška palyginta navikiniame ir nenavikiniame prostatos audinyje, miR-375 raiška rasta reikšmingai padidėjusi PV atveju [Ambs ir kt., 2008; Schaefer ir kt., 2010; Szczyrba ir kt., 2010; Wach ir kt., 2012].

Šiame tyrime miR-148a raiška buvo rasta reikšmingai padidėjusi PV audiniuose, tačiau PV ligonių šlapime jos kiekis buvo reikšmingai mažesnis, palyginus su GPH ir AK šlapime esančiu kiekiu, ir atitinka kitų tyrėjų publikuotą medžiagą. C. Corcoran su kolegomis [Corcoran ir kt., 2014] nustatė sumažėjusį miR-148a kiekį KAPV egzozomose, o išanalizavę atvirose duomenų bazėse patalpintus duomenis nustatė, kad palyginus su GPH, miR-148a kiekis PV sergančiųjų šlapime yra sumažėjęs. Vienintelio miR-148a tyrimo kraujyje metu nustatytas miR-148a padidėjimas PV sergančių ligonių serume, palyginus su sveikais ligoniais [Al-Qatati ir kt., 2017]. miR-148a tyrimų organizmo skysčiuose nėra daug tikriausiai dėl to, kad mažesnis miR-148a kiekis PV sergančiųjų šlapime neatitinka klasikinio biožymens apibrėžimo – siekiant ateityje pritaikyti klinikiniams tyrimams, jis gausiau turi būti nustatomas ligos atveju, o ne kontrolinių asmenų mėginiuose.

Kito biožymens, miR-375, kaip ir kitos tyrėjų grupės, taip ir mes daugiau nustatėme ir PV audiniuose, ir PV sergančių ligonių šlapimo mėginiuose. Prieš pasirodant mūsų tyrimui [Stuopelyte ir kt., 2016a], nors miR-375 buvo gana plačiai tyrinėjama kraujyje ir siejama su agresyviu PV [Cheng et al, 2013; Nguyen et al, 2013; Huang et al, 2015], šlapime buvo analizuota tik vieną kartą ir reikšmingų skirtumų nebuvo nustatyta [Bryant ir kt., 2012].

Pastaraisiais metais tyrimų šlapime skaičius ženkliai išaugo [Koppers-Lalic ir kt., 2016; Foj ir kt., 2017; Lekchnov ir kt., 2018], ir miR-375 kartu su miR-21 ir miR-141 yra dažniausiai tiriamos PV miRNR [Porzycki ir kt., 2018].

Taigi mūsų tyrime miR-148a ir miR-375 derinys geriausiai atskyrė abi nepriklausomas PV imtis nuo atitinkamų kontrolinių asmenų grupių. Pastarųjų metų tyrimai patvirtina tokius rezultatus – biožymenų rinkiniai turi didesnę diagnostinę vertę nei pavieniai genetiniai/molekuliniai ar klinikiniai žymenys, pvz., PSA. Panašiai kaip ir mūsų tyrime, šlapimo miR-1825 ir -484 sėkmingai atskyrė PV nuo GPH [Haj-Ahmad et al, 2014], o iš prostatos išskyrų atrinktas miRNR derinys (miR-361-3p, -133b, -221 ir -203) viršijo pavienių miRNR vertę, ir atskiriant PV nuo GPH siekė $AUC = 0,95$ [Guzel et al, 2015]. Taip pat miRNR (tarp kurių buvo ir miR-375), išgrynintos iš sėklinio skysčio [Selth et al, 2014] ir ejakulato [Roberts et al, 2015] viršijo diagnostinę PSA vertę. Tyrimų, vertinančių miRNR biožymenų diagnostinę vertę „pilkajoje zonoje“ yra vos keletas. S. Yun su kolegomis [Yun ir kt., 2015] parodė, kad dvi šlapimo virusinės miRNR „pilkajoje zonoje“ PV ligonius nuo GPH atskiria geriau nei PSA. Mūsų tyrime „pilkajoje zonoje“ nustatyta aukščiausia miRNR derinio diagnostinė vertė parodo, kad šlapimo miRNR gali būti jautrūs ir specifiški PV žymenys.

Nors šlapimo miRNR tyrimai neinvazinei PV diagnostikai ir yra daug žadantys, klinikiniams tyrimams vis dar nėra pritaikyti dėl keleto priežasčių. **Visų pirma**, miRNR kiekis organizmo skysčiuose yra mažesnis ir labiau kintantis nei audiniuose, dėl to miRNR nustatymui reikalingi itin jautrūs metodai. **Antra**, organizmo skysčiuose tiriant net validuotas PV audiniui specifines miRNR gali ne tik kad nelikti reikšmingų skirtumų tarp PV ligonių ir kontrolinių asmenų, bet gautis ir priešingų korelacijų (mūsų tyrimo atveju – miR-148a). Skirtingas miRNR kiekis to paties organizmo audiniuose ir skysčiuose parodytas seniai [Weber ir kt., 2010], o panašius rezultatus gavę tyrėjai tai grindžia atrankia miRNR sekrecija į tam tikrus organizmo skysčius [Erbes ir kt., 2015]. **Trečia**, miRNR kiekis šlapime labai priklauso nuo fiziologinės būklės ir mėginio paruošimo būdo. Šiame tyrime parodėme, kad toks pat miRNR kiekis ir tos pačios sąsajos randamos tiriant ir kateterizuotą šlapimą, ir šlapimą, surinktą tiesiog pasišlapinus. Šlapimas yra tinkamesnė medžiaga PV tyrimams, o jo neinvazinis surinkimas ir tyrimų gausa įrodo galimybę šlapimo miRNR tyrimus pritaikyti klinikoje, bet reikalinga suvienodinti mėginių rinkimo, apdorojimo, miRNR detekcijos ir statistinės analizės metodus.

4.2. miRNR biocheminio atkryčio prognozei

Nepaisant daugybės mikrogardelių tyrimo metu nustatytų pakitusios raiškos miRNR (miR-95, -206, -623, -885-3p, -1180, -3692* ir kt.), skirtingu metodu ištyrus daugiau mėginių, tik miR-95 atveju buvo gauta sąsaja su agresyvesniu PV fenotipu. Didesnė miR-95 raiška reikšmingai siejosi su navikais, kuriems buvo nustatytas aukštesnis *Gleason* balas, aukštesnė stadija ir kuriuose vyko *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkripto raiška bei ligoniais, kuriems vėliau buvo nustatyta biocheminė ligos progresija. Panašūs rezultatai paskelbti ir kitų tyrėjų darbuose: miR-95 raiška yra išaugusi pirminiuose PV navikuose, o veikdama per fosfatazę SGPP1 yra susijusi su atsparumu jonizuojančiajai spinduliutei ir prisideda prie agresyvesnio PV vystymosi [Huang ir kt., 2013]. Verta paminėti, kad šiame tyrime mes pirmąkart nustatėme išaugusią miR-95 raišką navikuose, kuriuose vyksta sulietinio transkripto *TMPRSS2-ERG* raiška. Šis sulietinis transkriptas yra pats dažniausias chromosominis persitvarkymas, nustatomas maždaug pusei visų PV atvejų. Būdamas PV specifinis, T-E dalyvauja vėžio vystymesi [Culig, 2014], lemdamas pakitusią daugumos kitų transkriptų, įskaitant ir miRNR, raišką [Fayyaz ir kt., 2013]. Naujais bioinformatinių tyrimų duomenimis ši miRNR dalyvauja ir kituose PV reguliaciniuose keliuose, pvz., transformuojančio augimo veiksnio beta (TGF-beta) ir navikų nekrozės veiksnio (TNF). Taigi su PV reguliaciniais keliais susijusi miR-95 galėtų būti tinkamas agresyvaus fenotipo biožymuo, tačiau šių duomenų patvirtinimui reikalingi tolimesni tyrimai.

Mikrogardelės yra vienas labiausiai paplitusių visuminės genų raiškos analizės, o kiekybinė PGR – pats populiariausias rastų raiškos skirtumų validavimo metodas. Mikrogardelėmis nustatėme dešimtis miRNR, kurių raiška skyrėsi tarp įvairių lyginamųjų grupių, tačiau dalies iš jų nepavyko aptikti kiekybinės PGR metodu, ir tik keletą iš rastų skirtumų pavyko validuoti. Šių dviejų metodų skirtumai gerai žinomi ir plačiai aptariami [Morey ir kt., 2006; Git ir kt., 2010].

miR-19 šeimai priklausančios miRNR, lokalizuotos miR-17~92 klasteryje, yra gerai žinoma onkogeninių miRNR šeima [Hühn ir kt., 2015]. Nors mikrogardelėmis nustatėme labai aukštą ir miR-19a, ir miR-19b raišką PV audiniuose, šlapime jų kiekis buvo skirtingas: daugiau miR-19a buvo PV ligonių šlapime, o miR-19b – GPH sergančiųjų šlapime. Subrendusių miR-19a ir miR-19b sekos skiriasi tik vienu nukleotidu, tačiau to pakanka, kad skirtusi šių miRNR taikiniai. Pavyzdžiui, būtent miR-19b, bet ne miR-19a, tiesiogiai slopina tokių gerai žinomų naviko augimą slopinančių genų kaip

PTEN ir TP53 raišką, dėl to vėliau sumažėja ir kitų naviko augimą slopinančių baltymų (Bax, p21 ir kt.) [Tian ir kt., 2013; Fan ir kt., 2014]. miR-19a reguliuojama AR [Mo ir kt., 2013], o miR-19b turi du homologus, kurie yra išsidėstę skirtingose chromosomose, todėl jos reguliacija sudėtingesnė. Ir nors yra tyrimų, kuriais demonstruojamas naviko augimą slopinantis miR-17~92 vaidmuo PV [Ottman ir kt., 2016], tačiau dauguma tyrimų išaugusią šiam klasteriui priklausančių miRNR raišką sieja su PV progresija [Liu ir kt., 2019] ir atsparumu chemoterapijai [Zhou ir kt., 2016].

Pastaraisiais metais atsirado daugiau ir miR-17~92 klasterio miRNR tyrimų organizmo skysčiuose, tačiau didžioji dauguma atlikta tiriant kraują. Be mūsų tyrimo, miR-19b PV šlapime tyrinėta tik kartą ir, palyginus su sveikų asmenų šlapimo tyrimų rezultatais, PV atveju nustatytas reikšmingai mažesnis miR-19b kiekis [Bryzgunova ir kt., 2016]. Taigi, nepriklausomai nuo to, kuri šlapimo frakcija tiriama (mūsų tyrimas atiktas su šlapimo nuosėdomis, o O. Bryzgunova su kolegomis tyrinėjo supernatanto mikrovezikules), ar su kokia kontrolinių asmenų grupe palyginama (GPH ar sveikais asmenimis, atitinkamai), miR-19b PV atveju randama mažiau. Daugiau tyrimų atlikta su kraujo miR-19a/b, kur kaip ir šiame su šlapimu atliktame tyrime vertintas ne tik diagnostinis, bet ir prognostinis miRNR potencialas. Mažesnis kiekis abiejų miRNR, miR-19a ir miR-19b, buvo rastas PV serume, ir abi miRNR buvo pavadintos nepriklausomais prognostiniais didelės rizikos PV žymenimis. Kaip ir mūsų tyrime, miRNR derinio diagnostinė vertė buvo didesnė nei pavienių miRNR ar PSA [Wang ir kt., 2014]. Kitame tyrime, nors didžiausią diagnostinę reikšmę vėl turėjo miRNR deriniai, bet miR-19a/b kiekis PV sergančiųjų serume buvo reikšmingai didesnis nei GPH, o didesnis viso miR-17~92 klasterio miRNR kiekis serume prognozavo trumpesnę išgyvenamumą be progresijos [Feng ir kt., 2017].

Nustatėme, kad miR-21 raiška buvo padidėjusi PV audiniuose, ir tai atitinka kitų tyrėjų gautus duomenis [Ribas ir kt., 2010]. miR-21 yra viena plačiausiai tyrinėjamų onkogeninių miRNR daugelio lokalizacijų vėžio atvejais, įskaitant ir PV, o išaugusi jos raiška laikoma nepriklausomu biožymeniu biocheminei PV progresijai numatyti [Li ir kt., 2012]. Jau seniai nustatyta, kad miR-21 skatina PV ląstelių dauginimąsi, invazyvumą, metastazavimą, slopina apoptozę [Krichevsky ir Gabriely. 2009], tačiau vieningų miR-21 tyrimų ligonių šlapime kol kas nėra. Šiame tyrime miR-21 PV sergančiųjų šlapime buvo reikšmingai mažiau nei šlapime, surinktame iš GPH sergančiųjų ligonių. Mažesnis kiekis šlapime esančios miR-21 buvo

aptiktas ir didelės rizikos PV atvejus palyginus su mažos rizikos atvejais [Sapre ir kt., 2014], taip pat mažiau, palyginus ir su GPH, ir su sveikų asmenų šlapimo tyrimų rezultatais [Ghorbanmehr ir kt., 2019]. Tačiau L. Foj tyrėjų grupės atliktame tyrime didesnis miR-21 kiekis buvo nustatytas ir šlapimo nuosėdose, ir egzosomose [Foj ir kt., 2017]. Įdomu tai, kad serume nustatomas reikšmingai didesnis miR-21 kiekis nei kontrolinėse grupėse ankstyvojo PV diagnostikai [Gao ir kt., 2016], yra susijęs su trumpesniu išgyvenamumu PV ligoniams, kuriems taikoma ADT terapija [Guan ir kt., 2016], ir siejamas su agresyvesne ligos eiga [Yaman Agaoglu ir kt., 2011; Shen ir kt., 2012].

Šiame tyrime tik miR-95 atveju buvo rasta sąsaja su ligos progresija, tačiau miR-95 pasirodė esanti netinkamas taikynys tyrimui organizmo skysčiuose. Dėl šios priežasties šlapimo tyrimui iš mikrogardelių analizės buvo pasirinktos tos miRNR, kurių raiška buvo reikšmingai išaugusi PV audinyje ir kurių PV specifiskumas buvo įrodytas kituose tyrimuose. Tačiau atlikus tyrimą šlapime paaiškėjo, kad PV ligoniams buvo būdingas mažesnis miR-21 kiekis šlapime, o su trumpesniu išgyvenamumu iki biocheminės ligos progresijos siejosi mažesnis kiekis miR-19b. Cirkuliuojančių miRNR tyrimuose nustatomos labai reikšmingos asociacijos, tačiau prieštaringi tyrimai ir skirtingas miRNR kiekis organizmo skysčiuose lėtina šių biožymenų pritaikymą klinikiniams tyrimams. Prieš tai jau buvo aptarta savita miRNR reguliacija ir atrankus patekimas į tam tikrus kūno skysčius. Visgi, nepaisant neatitikimų, miR-19a/b ir miR-21 savitumas PV buvo įrodytas daugybe tyrimų, ir tyrimai neinvaziniu būdu surinktoje biologinėje medžiagoje turėtų būti tęsiami klinikinei reikšmei patvirtinti.

4.3. miRNR atsako į gydymą prognozei

Kol kas nėra publikuotų duomenų apie miRNR tyrimus KAPV šlapime, todėl bus aptartos prieš tai aprašytų miR-148a, -365, -375 ir -429 funkcijos, kurios galimai yra susijusios su KAPV vystymusi.

G. Lin su kolegomis pirmos ir antros fazės klinikinių tyrimų metu (2014 ir 2017 m.) tyrė miR-375 ir miR-429 kraujo serume, surinktame iš KAPV ligonių prieš pradėdant gydymą chemoterapiniu vaistu docetakseliu [Lin et al., 2014; 2017]. Abiejų tyrimų metu buvo nustatyta, kad didesnis abiejų miRNR kiekis prieš pradėdant gydymą yra susijęs su bendroju išgyvenamumu, bet ne su atsparumu docetakseliui. Įdomu tai, kad antros fazės tyrime miR-429 buvo pašalinta iš rizikos grupės įvertinimo [Lin et al., 2017], nes daugumoje serumo mėginių jos nepavyko aptikti. Naujausių

tyrimų duomenimis, miR-429 dalyvauja keliuose nuo androgenų nepriklausomo PV reguliaciniuose keliuose [Wang ir kt., 2018], skatina vėžinių ląstelių dauginimąsi [Ouyang ir kt., 2015] ir gali būti susijusi su EMT ir metastazėmis [Abisoye-Ogunniyan ir kt., 2018]. Mūsų tyrime miR-429 kiekis KAPV sergančiųjų šlapime buvo didžiausias iš visų analizuotų imčių, todėl šlapimo miR-429 analizė galėtų būti specifiskesnė už tyrimą kraujyje.

Nors miR-375 labai dažnai tiriama, tačiau jos veikimo mechanizmai išlieka neaiškūs. Daugumos lokalizacijų vėžio atvejų miR-375 laikoma naviko augimą slopinančia, tačiau išskirtinai PV atveju jos raiška yra išaugusi ir didėja ligai progresuojant [Nguyen ir kt., 2013]. Naujausi tyrimai rodo, kad šios miRNR raiška atvirkščiai koreliuoja su epitelinio-mezenchiminio virsmo (EMT) žymenimis ir gali dalyvauti priešingo virsmo, MET, valdyme [Selth ir kt., 2017]. Taip pat nustatyta, kad miR-375 tiesiogiai koreliuoja su cirkuliuojančių vėžio ląstelių (CVL) skaičiumi ne tik PV, bet ir krūties vėžio atveju [Madhavan ir kt., 2012], kas rodo galimą sąsają su hormonų reguliuojamais signaliniais keliais. Nustatytas mažesnis miR-375 kiekis KAPV sergančiųjų šlapime, mažėjimas gydymo eigoje ir reikšmingos sąsajos su išgyvenamumu galėtų prisidėti prie gilesnio KAPV vystomosi mechanizmų suvokimo, tačiau reikalingi tolimesni tyrimai.

miR-148a PV laikoma ir onkogenine [Al-Qatati ir kt., 2017], ir naviko augimą slopinančia miRNR. Sumažėjusi miR-148a raiška buvo nustatyta kastracijai atsparaus (angl. hormone-resistant, hormone-refractory) ir paklitakseliui (chemoterapinis vaistas) atsparioje vėžio ląstelių linijoje [Fujita ir kt., 2010]. Dėl to miR-148a tyrimas gali būti pritaikytas ir KAPV sergančių ligonių atrankai, prieš paskiriant AA gydymą, ir jau gydomų ligonių stebėjimui.

4.4. AR-V transkriptai atsako į gydymą prognozei

Apie 20 kartų didesnė AR-V1 ir AR-V7 raiška buvo nustatyta KAPV audinius palyginus su atvejais, kuriems hormonų terapija dar nebuvo taikyta [Hu ir kt., 2009]. Taip pat tame pačiame tyrime didesnė AR-V7 raiška buvo tais atvejais, kai vėliau pasireiškė BCR, ir tai atitinka mūsų tyrimo rezultatus. Tokiose ankstyvose vėžio stadijose nustatyta išaugusi AR-V7 raiška galimai siejasi ne tik su BCR, bet ir besivystančiu atsparumu hormonų terapijai [Luo ir kt., 2018], todėl atsižvelgiant į AR-V7 ar kitų AR-V raišką būtų galima parinkti tinkamiausią gydymą.

Ištyrus 185 KAPV sergančiųjų kraujo mėginius, bent vienas AR-V buvo nustatytas 81 %, o didelis bent vieno AR-V kiekis – 44 % mėginių. Iš visų tirtų AR transkriptų reikšmingiausia sąsaja su atsaku į gydymą buvo rasta AR-FL ir AR-V1 atvejais: prieš gydymą paimtame kraujo mėginyje nustačius didesnę AR-FL ir/arba AR-V1 kiekį, ligoniui pasireiškė pirminis atsparumas AA arba trumpesnis išgyvenamumas be progresijos ir bendrasis išgyvenamumas. AR-FL yra vienas pagrindinių AR signalinio kelio blokados taikinių, o išaugusi AR raiška parodyta daugybėje PV ląstelių linijų ir klinikinių tyrimų, iš kurių aktualiausi KAPV [Tilki ir kt., 2016]. Padidėjusi AR-V1 raiška buvo nustatyta KAPV audinius palyginus su atvejais, kuriems dar nebuvo taikyta ADT [Hu ir kt., 2009], bet šis mūsų tyrimas yra pirmasis, kuriuo parodyta kraujo AR-V1 ir jo derinio su AR-FL klinikinė vertė.

Nors AR-V7 mūsų ir kitų tyrėjų tirtose klinikinėje medžiagoje nustatomas dažniausiai ir labiausiai siejamas su atsparumu gydymui, bet klinikinė reikšmė išlieka prieštaringa [Sprenger ir kt., 2014; Antonarakis ir kt., 2016; Bryce ir kt., 2016; Seitz ir kt., 2017]. Daugybėje tyrimų AR-V7 buvo silpnai susijęs arba visai nesisiejo su PSA sumažėjimu [Takeuchi ir kt., 2016; Todenhöfer ir kt., 2017; To ir kt., 2018] išgyvenamumu be PSA progresijos [To ir kt., 2018] ar bendroju išgyvenamumu enzalutamidu gydytoje imtyje [Qu ir kt., 2017]. Šiame tyrime prognostinė AR-V7 vertė taip buvo maža ir pagerėjo tik sujungus su kitų AR transkriptų duomenimis. AR transkriptų tyrimų visame kraujyje (angl. whole blood) nėra daug: be AR-V7 vertinti tik AR-V12 [Liu ir kt., 2016] ir AR-V9 [To ir kt., 2018], o gauti rezultatai yra prieštaringi. H. Liu tyrėjų grupės [Liu ir kt., 2016] atliktoje analizėje AR-V12 ir AR-V7 buvo susieti su atsparumu gydymui, o S.Q. To tyrėjų grupės [To ir kt., 2018] analizuoti kraujo AR-V7 ir AR-V9 transkriptai nebuvo reikšmingai susiję su gydymu, nes ligoniams, kurių kraujyje buvo nustatyti šie AR-V, atsparumas gydymui nepasireiškė. AR-V9 ir AR-V12 buvo vertinti ir mūsų atlikto tyrimo bandomojoje dalyje, tačiau aptikimo dažnis buvo per mažas, todėl į pagrindinį tyrimą buvo įtraukti tik AR-V1, AR-V3 ir AR-V7. Visuose tirtuose kraujo mėginiuose nustatytas AR-FL teigiamai koreliavo su visais AR-V, ir tai atitinka kitų tyrėjų gautus rezultatus [Kallio ir kt., 2018]. Neseniai parodyta, kad į androgenų signalinį kelią nukreiptas gydymas (pvz., ADT) skatina AR transkripcinį aktyvumą ir alternatyvų splaisingą, dėl to išauga ne tik AR-FL transkriptų kiekis, bet ir AR-V susidarymo dažnis [Liu ir kt., 2014]. Taigi, kelių AR variantų, o ne tik AR-V7, tyrimas gali atnešti didesnę klinikinę naudą.

IŠVADOS

1. miR-375 ir miR-148a raiška yra statistiškai reikšmingai didesnė PV audiniuose ($P = 0,015$ ir $P = 0,027$, atitinkamai), o miR-429 – *TMPRSS2-ERG* teigiamuose navikuose ($P = 0,008$). Geresnės diferenciacijos navikuose ($G \leq (3+4)$ ir $G \leq 6$) nustatyta didesnė miR-429 ir miR-365 raiška ($P < 0,001$ ir $P = 0,007$, atitinkamai).
2. PV ligonių šlapime miR-375 kiekis yra reikšmingai didesnis, o miR-148a mažesnis nei kontrolinių asmenų ($P < 0,001$). miR-148a ir miR-375 derinio diagnostinė vertė yra didesnė nei analizuojant pavienes miRNR ir viršija PSA testo diagnostinę vertę ($AUC = 0,85$ vs. $0,51$) net PSA koncentracijai esant 4-10 ng/mL ($AUC = 0,90$).
3. miR-19a/19b ir miR-21 derinio diagnostinė vertė yra didesnė nei analizuojant pavienes miRNR ir viršija PSA testo diagnostinę vertę ($AUC = 0,74$ vs. $0,51$). Mažesnis miR-19b kiekis ir mažesnis miR-19b bei didesnis miR-19a kiekis PV ligonių šlapime prognozuoja greitesnę biocheminę progresiją ($P = 0,014$ ir $P = 0,016$, atitinkamai).
4. miR-148a, -365, -375 ir -429 kiekis reikšmingai skiriasi KAPV, lokalaus PV ir kontrolinių asmenų grupių šlapime ($P < 0,05$), o miR-375 ir miR-429 derinys specifiškiau atskiria KAPV ligonius nei tiriant pavienes miRNR ($P < 0,01$). Trumpesnę išgyvenamumą be progresijos AA gydomiems ligoniams prognozuoja šlapime nustatytas mažesnis kiekis miR-148a, o bendrąją išgyvenamumą – mažesnis kiekis abiejų arba bet kurios iš miR-148a ir miR-375 ($P = 0,033$ ir $P = 0,035$, atitinkamai).
5. AR-V1 ir AR-V7 raiška yra reikšmingai didesnė navikiniuose nei nenavikiniuose prostatos audiniuose ($P = 0,025$ ir $P = 0,027$, atitinkamai), o aukštesnė AR-V7 raiška progresavusiuose atvejuose ($P = 0,010$) siejasi su trumpesniu išgyvenamumu be biocheminės ligos progresijos (61 mėn. vs. nepasiekta mediana, $P = 0,050$).
6. AR-FL buvo nustatytas visuose 185 kraujo mėginiuose, o bent vienas AR-V – 81 % KAPV kraujo mėginių. Didesnis AR-FL ir AR-V1 transkriptų kiekis KAPV ligonių kraujyje yra nepriklausomas kintamasis, prognozuojantis trumpesnę išgyvenamumą be progresijos (HR 3,0, 95 % CI 1,7–5,1) ir bendrąją išgyvenamumą (HR 3,7, 95 % CI 2,2–6,2), gydant AA.

REZULTATŲ VIEŠINIMAS

Pranešimai konferencijose

Žodiniai pranešimai

- **Stuopelyte K.**, Daniunaite K, Jankevicius F, Jarmalaite S. *The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer*. 1st COST-Epigenetic Chemical Biology Meeting; Budapeštas (Vengrija), 2015 rugsėjo 28-29 d.
- **Stuopelyte K.**, Stankevicius V, Daniunaite K, Jankevicius F, Jarmalaite S. MiRNR tyrimai šlapimo nuosėdose priešinės liaukos vėžiui nustatyti. 7-oji Jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“; Vilnius (Lietuva), 2014 gruodžio 10 d.

Stendiniai pranešimai:

- **Stuopelyte K.**, Sabaliauskaite R, Bakavicius A, Hafliadóttir BS, Visakorpi T, Väänänen RM, Patel C, Danila DC, Lilja H, Lazutka JR, Ulys A, Jankevicius F, Jarmalaite S. Analysis of AR-FL and AR-V1 in whole blood of patients with castration resistant prostate cancer as a tool for predicting response to abiraterone acetate. The 26th Meeting of the EAU Section of Urological Research (ESUR); Porto (Portugalija), 2019 spalio 10-12 d. *Tezės publikuotos: European Urology Supplements 2019;18(8):e3107. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(19\)33352-4](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(19)33352-4)*.
- **Stuopelyte K.**, Bakavicius A., Sabaliauskaite R., Hafliadóttir B.S., Visakorpi T., Väänänen R.M., Patel C., Danila D.C., Lilja H., Lazutka J.R., Ulys A., Jankevicius F., Jarmalaite S. Predicting abiraterone acetate treatment resistance from blood-circulating androgen receptor variants in castration-resistant prostate cancer. 6th Baltic Meeting in conjunction with the EAU (Baltic19); Talinas (Estija), 2019 gegužės 24-25 d. *Tezės publikuotos: European Urology Supplements 2019;18(3):e2429. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(19\)32143-8](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(19)32143-8)*.
- **Stuopelyte K.**, Sestokaite A., Hafliadottir B.S., Visakorpi T., Ulys A., Jankevicius F., Jarmalaite S. Detection of Blood Circulating Androgen Receptor Variants in Castration Resistant Prostate Cancer. The 43rd FEBS 2018 Congress; Praha (Čekijos Respublika), 2018 liepos 7-12 d. *Tezės publikuotos: FEBS Open Bio, 8: P.10-036-Wed. doi:10.1002/2211-5463.12453.*

- **Stuopelyte K.**, Sestokaite A., Hafliadottir B.S., Visakorpi T., Ulys A., Jankevicius F., Jarmalaite S. Clinical utility of blood-circulating androgen receptor variants in castration-resistant prostate cancer patients. XVth International Conference of the Lithuanian Biochemical Society conference; Dubingiai (Lietuva) 2018 birželio 26-29 d.
- **Stuopelyte K.**, Sestokaite A., Hafliadottir B.S., Visakorpi T., Ulys A., Jankevicius F., Jarmalaite S. Blood-circulating Androgen Receptor Variants as Markers for Progression and Response to Treatment in Prostate Cancer Patients. 5th Baltic Meeting in conjunction with the EAU (Baltic18); Ryga (Latvija) 2018 gegužės 25-26 d. *Tezės publikuotos: European Urology Supplements 2018;17(5):e2223. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(18\)32630-7](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(18)32630-7).*
- **Stuopelyte K.**, Sestokaite A., Hafliadottir B.S., Visakorpi T., Ulys A., Jankevicius F., Jarmalaite S. Blood-circulating Androgen Receptor Variants as Markers for Progression and Response to Treatment in Prostate Cancer Patients. COINS2018; Vilnius (Lietuva), 2018 vasario 28-kovo 2 d. *Laimėta pirmoji vieta Medicinos sekcijoje.*
- Jarmalaite S, Daniunaite K, **Stuopelyte K.**, Stankevicius V, Laurinavicius A, Jankevicius F, Lazutka J. MiRNA profile of prostate tumors. 8-toji Gamtos mokslų fakulteto mokslinė konferencija „Mokslas Gamtos Mokslų Fakultete“; Kairėnai (Lietuva), 2014 spalio 3 d.

Rezultatai taip pat pristatyti:

- Šeštokaite A., **Stuopelytė K.**, Bakavičius A., Ulys A., Jankevičius F., Jarmalaitė S. Urinary miRNA analysis in castration-resistant prostate cancer patients. COINS 2019 – 14th international conference of life sciences; Vilnius (Lietuva), 2019 vasario 26–28 d.
- Hafliadóttir B, **Stuopelyte K.**, Lilja H, Visakorpi T. Prostate cancer biomarkers in blood samples. BMT & MED RESEARCH DAY; Tampere (Suomija), 2017 spalio 26 d.
- **Stuopelyte K.**, Daniunaite K, Jankevicius F, Lazutka J, Jarmalaite S. Urinary miRNAs for early detection of prostate cancer. Clinical Epigenetics International Meeting (CLEPSO); Duseldorfas (Vokietija), 2015 kovo 5–6 d.

Apdovanojimai

- Laimėtas pirmos vietos prizas už geriausius stendinius pranešimus Baltic18 (2018 Ryga) ir Baltic19 (2019 Talinas) konferencijose.
- Laimėtas pirmos vietos prizas už geriausią stendinį pranešimą Medicinos sekcijoje COINS2018 konferencijoje Vilniuje.
- Autorė tapo laureate 7-ojoje Jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“ (2014).

CURRICULUM VITAE

Kontaktinė informacija:

Tel. Nr.: +370 603 88060

El. p.: kristina.stuopelyte@gmc.vu.lt

Tyrimų sritis: Biomedicina (biologija, genetika)

Dabartinės pozicijos:

- Jaunesnioji mokslo darbuotoja Nacionaliniame vėžio instituto (NVI) Mokslinių tyrimų centre (MTC), Vilnius, Lietuva;
- Jaunesnioji asistentė Žmogaus genomo tyrimų centre, Biomokslų institute, Gyvybės mokslų centre, Vilniaus universitete (VU), Vilnius, Lietuva.

Išsilavinimas:

2014–2018 – doktorantūra (Biologija) VU

2012–2014 – magistrantūra (Genetika) VU

2008–2012 – bakalauras (Molekulinė biologija) VU

Darbo patirtis:

2018 – dabar. Jaunesnioji asistentė VU

2019 – dabar. Jaunesnioji mokslo darbuotoja NVI MTC

2016–2019. Biologė NVI MTC

2012–2018. Vyresnioji specialistė VU

Publikacijos: 6 moksliniai straipsniai žurnaluose, turinčiuose cituojamumo rodiklį *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėse.

Dalyvavimas projektinėje veikloje: 4 projektai (vykdytoja), finansuojami nacionalinių ir tarptautinių fondų.

Stažuotės: 3 stažuotės Suomijos institutuose: Suomijos profesinės sveikatos institute Helsinkyje 2015 m. (prof. Kirsti Husgafvel-Pursiainen); 2016 ir 2017 m. Prostatos vėžio tyrimų centre Tampereje (prof. Tapio Visakorpi).

Akademinė veikla: Nuo 2018 m. Funkcinės ląstelės biologijos paskaitos ir seminarai, 2014–2018 m. Onkogenetikos laboratoriniai darbai (VU). Vadovavimas vienam bakalauro ir dviem magistro baigiamiesiems darbams.

Konferencijos: Tyrimų rezultatai žodiniais ir stendiniais pranešimais pristatyti 12 tarptautinių ir vietinių konferencijų.

Narystė: Dalyvauta COST veikloje CM1406; Lietuvos biochemikų draugijos narė.

PADĖKA

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo mokslinei vadovei prof. Sonatai Jarmalaitei už galimybę atlikti tyrimus jos vadovaujamoje mokslinėje grupėje, už vertingas pastabas ir paskatinimą, – visa tai augino mane ne tik kaip mokslininkę, bet ir kaip žmogų. Taip pat dėkoju prof. habil. dr. Juozui Rimantui Lazutkai už mokslines ir gyvenimiškas diskusijas. Ačiū Suomijos instituteose dirbantiems mokslininkams, prof. Kirsti Husgafvel-Pursiainen ir dr. Eevai Kettunen iš Suomijos profesinės sveikatos instituto Helsinkyje ir prof. Tapio Visakorpi bei dr. Benediktai Haflidadóttir iš Prostatos vėžio tyrimų centro Tampereje, kad priėmė stažuotėms ir suteikė vertingų žinių ir praktinių įgūdžių.

Dėkoju Justinai Tverkuvieni ir dr. Kristinai Daniūnaitei už globą pradedant tyrimus Žmogaus genomo tyrimų centre. Atskiras ačiū dr. Rasai Sabaliauskaitei ir Ritai Bandariavičiūtei už mokslines diskusijas, nusidriekiančias už laboratorinių stalų ribų. Dėkoju kolegėms: Raimondai, Agnei, Ievai, Kristinai, Benitai, kurios, kurdamos draugišką atmosferą laboratorijoje, nejučia tapo draugėmis ir realiame gyvenime. Ačiū visam Botanikos ir genetikos katedros kolektyvui už draugišką darbo aplinką ir visapusišką palaikymą.

Norėčiau padėkoti visiems NVI ir VULSK gydytojams, medicinos ir aptarnaujančiam personalui, kurie prisidėjo prie vertingų mėginių rinkimo projektinėms veikloms. Ypatingai norėčiau padėkoti prof. dr. Feliksui Jankevičiui už vertingus komentarus ir pastabas, o Arnui Bakavičiui už kruopštų klinikinių duomenų rinkimą. Nuoširdus ačiū projektuose sutikusiems dalyvauti ligoniams ir jų šeimų nariams.

Ačiū Lietuvos mokslo tarybai ir ES struktūrinės paramos fondams už projektų finansavimą, LMT ir VU – už stipendijas, ačiū draugiškoms firmoms, kurios kantriai tiekė netikėtai greitai pasibaigusius reagentus.

Dėkoju mamai, močiutei, draugo šeimai ir draugams, kurie visada mane palaikė ir skatino eiti tolyn. Ir, žinoma, dėkoju būsimam vyrui Simui, kuris jau matė, ką reiškia pasakymas „ir vargė“.

LITERATŪROS ŠARŠAS

Internetiniai šaltiniai:

1. Lietuvos vėžio registras [elektroninis išteklius]. Nacionalinis vėžio institutas, Vilnius, Lietuva, 2019. Prieiga per internetą: <https://www.nvi.lt/naujausiuomenys/> [Žiūrėta 2019-11-26].
2. *Prostate Cancer Stages and Other Ways to Assess Risk* [elektroninis išteklius]. American Cancer Society, Inc., Atlanta, JAV, 2019. Prieiga per internetą: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html> [Žiūrėta 2019-11-26].
3. *miRBase Release 22.1* [elektroninis išteklius]. Mančesteris, JK, 2018. Prieiga per internetą: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa> [Žiūrėta 2019-12-03].
4. *Prostate Cancer Stages* [elektroninis išteklius]. *Dotdash, Inc.*, Niujorkas, JAV, 2019. Prieiga per internetą: <https://www.verywellhealth.com/prostate-cancer-stages-2782237> [Žiūrėta 2019-11-28].

Literatūriniai šaltiniai:

1. Abisoye-Ogunniyan A, Lin H, Ghebremedhin A, Salam AB, Karanam B, Theodore S, et al. Transcriptional repressor Kaiso promotes epithelial to mesenchymal transition and metastasis in prostate cancer through direct regulation of miR-200c. *Cancer Lett.* 2018 Sep 1;431:1–10.
2. Adhyam M, Gupta AK. A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. *Indian J Surg Oncol.* 2012 Jun;3(2):120–9.
3. Ajiboye AS, Esopi D, Yegnasubramanian S, et al. Androgen Receptor Splice Variants Are Not Substrates of Nonsense-Mediated Decay. *Prostate.* 2017 Jun;77(8):829–37.
4. Al-Qatati A, Akrong C, Stevic I, Pantel K, Awe J, Saranchuk J, et al. Plasma microRNA signature is associated with risk stratification in prostate cancer patients. *Int J Cancer.* 2017 Sep 15;141(6):1231–9.
5. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6162–70.
6. Andersen RJ, Mawji NR, Wang J, Wang G, Haile S, Myung JK, et al. Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small-molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. *Cancer Cell.* 2010;17:535–46.
7. Antonarakis ES, Armstrong AJ, Dehm SM, Luo J. Androgen receptor variant-driven prostate cancer: clinical implications and therapeutic targeting. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2016 Sep;19(3):231–41.
8. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Wang H, Chen Y, Zhu Y, et al. Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate

- Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *J Clin Oncol*. 2017 Jul 1;35(19):2149–56.
9. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*. 2014 Sep 11;371(11):1028–38.
 10. Armstrong CM, Gao AC. Current strategies for targeting the activity of androgen receptor variants. *Asian J Urol*. 2019 Jan;6(1):42–49.
 11. Ather MH, Siddiqui T. The genetics of neuroendocrine prostate cancers: a review of current and emerging candidates. *Appl Clin Genet*. 2012 Nov 8;5:105–10.
 12. Balacescu O, Petrut B, Tudoran O, Feflea D, Balacescu L, Anghel A, et al. Urinary microRNAs for prostate cancer diagnosis, prognosis, and treatment response: are we there yet? *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2017 Nov;8(6).
 13. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215–33.
 14. Berg KD, Thomsen FB, Mikkelsen MK, Ingimarsdóttir IJ, Hansen RB, Kejs AM, et al. Improved survival for patients with de novo metastatic prostate cancer in the last 20 years. *Eur J Cancer*. 2017 Feb;72:20–27.
 15. Boudadi K, Suzman DL, Anagnostou V, Fu W, Luber B, Wang HK, et al. Ipilimumab plus nivolumab and DNA-repair defects in AR-V7-expressing metastatic prostate cancer. *Oncotarget*. 2018 Jun 19;9(47):28561–71.
 16. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Fälth M, Haese A, Steuber T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2011 Feb 1;128(3):608–16.
 17. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
 18. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer*. 2012 Feb 14;106(4):768–74.
 19. Bryce AH, Antonarakis ES. Androgen receptor splice variant 7 in castration-resistant prostate cancer: Clinical considerations. *Int J Urol*. 2016 Aug;23(8):646–53.
 20. Bryzgunova OE, Zaripov MM, Skvortsova TE, Lekchnov EA, Grigor'eva AE, Zaporozhchenko IA, et al. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients. *PLoS One*. 2016 Jun 15;11(6):e0157566.
 21. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 10;101(32):11755–60.

22. Cao B, Qi Y, Zhang G, Xu D, Zhan Y, Alvarez X, et al. Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget*. 2014 Mar 30;5(6):1646–56.
23. Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, De Vere White R, Evans CP, Fussell S, et al. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur Urol*. 2011 May;59(5):671–81.
24. Chen J, Zhang X, Wang Y, Ye Y, Huang Z. Formononetin promotes proliferation that involves a feedback loop of microRNA-375 and estrogen receptor alpha in estrogen receptor-positive cells. *Mol Carcinog*. 2016 Mar;55(3):312–9.
25. Cheng HH, Mitchell PS, Kroh EM, Dowell AE, Che'ry L, Siddiqui J, et al. Circulating microRNA profiling identifies a subset of metastatic prostate cancer patients with evidence of cancer-associated hypoxia. *PLoS One*. 2013 Jul 30;8(7):e69239.
26. Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):87–117.
27. Corcoran C, Rani S, O'Driscoll L. miR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression. *Prostate*. 2014 Sep;74(13):1320–34.
28. Cozar JM, Robles-Fernandez I, Rodriguez-Martinez A, Puche-Sanz I, Vazquez-Alonso F, Lorente JA, et al. The role of miRNAs as biomarkers in prostate cancer. *Mutat Res*. 2019 Jul - Sep;781:165–74.
29. Culig Z. Distinguishing indolent from aggressive prostate cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2014;202:141-7.
30. Czubak K, Lewandowska MA, Klonowska K, Roszkowski K, Kowalewski J, Figlerowicz M, et al. High copy number variation of cancer-related microRNA genes and frequent amplification of DICER1 and DROSHA in lung cancer. *Oncotarget*. 2015 Sep 15;6(27):23399–416.
31. Daniunaite K, Jarmalaite S, Kalinauskaite N, Petroska D, Laurinavicius A, Lazutka JR, et al. Prognostic value of RASSF1 promoter methylation in prostate cancer. *J Urol*. 2014 Dec;192(6):1849-55.
32. Darshan MS, Loftus MS, Thadani-Mulero M, Levy BP, Escuin D, Zhou XK, et al. Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer. *Cancer Res*. 2011;71:6019–29.
33. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2011 May 26;364(21):1995–2005.
34. De Laere B, van Dam PJ, Whittington T, Mayrhofer M, Diaz EH, Van den Eynden G, et al. Comprehensive profiling of the androgen receptor in liquid biopsies from castration-resistant prostate cancer reveals novel intra-AR structural variation and splice variant expression patterns. *Eur Urol*. 2017 Aug;72(2):192-200.

35. De Marzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet*. 2003 Mar 15;361(9361):955–64.
36. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):256–69.
37. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ.. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res*. 2008 Jul 1;68(13):5469-77.
38. Demidenko R, Razanauskas D, Daniunaite K, Lazutka JR, Jankevicius F, Jarmalaite S. Frequent down-regulation of ABC transporter genes in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2015 Oct 12;15:683. doi: 10.1186/s12885-015-1689-8.
39. Di Leva G, Croce CM. miRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2013 Feb;23(1):3–11.
40. Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL; ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005 Sep;29(9):1228–42.
41. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016 Feb;40(2):244–52.
42. Erbes T, Hirschfeld M, Rucker G, Jaeger M, Boas J, Iborra S, et al. Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker. *BMC Cancer*. 2015 Mar 28;15:193.
43. Fan Y, Yin S, Hao Y, Yang J, Zhang H, Sun C, et al. miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53. *RNA*. 2014 Jun;20(6):765–72.
44. Fayyaz S, Farooqi AA. miRNA and TMPRSS2-ERG do not mind their own business in prostate cancer cells. *Immunogenetics* 2013 May;65(5):315–32.
45. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001 Oct;1(1):34–45.
46. Feng Q, He B. Androgen Receptor Signaling in the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol*. 2019 Sep 4;9:858.
47. Feng S, Qian X, Li H, Zhang X. Combinations of elevated tissue miRNA-17-92 cluster expression and serum prostate-specific antigen as potential diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Oncol Lett*. 2017 Dec;14(6):6943–9.
48. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1941–53.
49. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.

50. Foj L, Ferrer F, Serra M, Arévalo A, Gavagnach M, Giménez N, et al. Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. *Prostate*. 2017 May;77(6):573–83.
51. Fujita Y, Kojima K, Ohhashi R, Hamada N, Nozawa Y, Kitamoto A, et al. MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. *J Biol Chem*. 2010 Jun 18;285(25):19076–84.
52. Gambari R, Brognara E, Spandidos DA, Fabbri E. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: New trends in the development of miRNA therapeutic strategies in oncology (Review). *Int J Oncol*. 2016 Jul;49(1):5-32.
53. Gao Y, Guo Y, Wang Z, Dai Z, Xu Y, Zhang W, et al. Analysis of circulating miRNAs 21 and 375 as potential biomarkers for early diagnosis of prostate cancer. *Neoplasma*. 2016;63(4):623–8.
54. Ghorbanmehr N, Gharbi S, Korsching E, Tavallaei M, Einollahi B, Mowla SJ. miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine-promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. *Prostate*. 2019 Jan;79(1):88–95.
55. Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, et al. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA*. 2010 May;16(5):991–1006.
56. Goodall EF, Heath PR, Bandmann O, Kirby J, Shaw PJ. Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2013 Oct 10;7:178.
57. Gregory CW, He B, Wilson EM. The putative androgen receptor-A form results from in vitro proteolysis. *J Mol Endocrinol*. 2001 Dec;27(3):309–19.
58. Guan Y, Wu Y, Liu Y, Ni J, Nong S. Association of microRNA-21 expression with clinicopathological characteristics and the risk of progression in advanced prostate cancer patients receiving androgen deprivation therapy. *Prostate*. 2016 Aug;76(11):986–93.
59. Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res*. 2009 Mar 15;69(6):2305–13.
60. Guzel E, Karatas OF, Semercioz A, Ekici S, Aykan S, Yentur S, et al. Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer. *Int J Cancer*. 2015 Feb 15;136(4):875–9.
61. Haile S, Sadar MD. Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Dec;68(24):3971–81.
62. Haj-Ahmad TA, Abdalla MA, Haj-Ahmad Y. Potential urinary miRNA biomarker candidates for the accurate detection of prostate cancer among benign prostatic hyperplasia patients. *J Cancer*. 2014 Jan 29;5(3):182-91.

63. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2009 Jan 1;69(1):16–22.
64. Hu R, Isaacs WB, Luo J. A snapshot of the expression signature of androgen receptor splicing variants and their distinctive transcriptional activities. *Prostate.* 2011 Nov;71(15):1656–67.
65. Huang X, Taeb S, Jahangiri S, Emmenegger U, Tran E, Bruce J, et al. miRNA-95 mediates radioresistance in tumors by targeting the sphingolipid phosphatase SGPP1. *Cancer Res.* 2013 Dec 1;73(23):6972–86.
66. Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 2015 Jan;67(1):33–41.
67. Huang Y, Jiang X, Liang X, Jiang G. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer. *Oncol Lett.* 2018 May;15(5):6063–6076.
68. Hühn D, Kousholt AN, Sørensen CS, Sartori AA. miR-19, a component of the oncogenic miR-17~92 cluster, targets the DNA-end resection factor CtIP. *Oncogene.* 2015 Jul 23;34(30):3977–84.
69. Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science.* 2007 Jan 5;315(5808):97–100.
70. Jahn JL, Giovannucci EL, Stampfer MJ. The high prevalence of undiagnosed prostate cancer at autopsy: implications for epidemiology and treatment of prostate cancer in the Prostate-specific Antigen-era. *Int J Cancer.* 2015 Dec 15;137(12):2795–802.
71. Jalava SE, Urbanucci A, Latonen L, Waltering KK, Sahu B, Jänne OA et al. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene.* 2012 Oct 11;31(41):4460–71.
72. Kahokehr A, Gilling PJ. Landmarks in BPH—from aetiology to medical and surgical management. *Nat Rev Urol.* 2014 Feb;11(2):118–22.
73. Kallio HML, Hieta R, Latonen L, Brofeldt A, Annala M, Kivinummi K, et al. Constitutively active androgen receptor splice variants AR-V3, AR-V7 and AR-V9 are co-expressed in castration-resistant prostate cancer metastases. *Br J Cancer.* 2018 Aug;119(3):347–56.
74. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 2005 Feb;96(2):111–5.
75. Kohli M, Ho Y, Hillman DW, Van Etten JL, Henzler C, Yang R, et al. Androgen receptor variant AR-V9 is coexpressed with AR-V7 in prostate cancer metastases and predicts abiraterone resistance. *Clin Cancer Res.* 2017 Aug 15;23(16):4704–15.
76. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, de Menezes R, Misovic B, Wachalska M, Geldof A, et al. Non-invasive prostate cancer detection by measuring miRNA

- variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles. *Oncotarget*. 2016 Apr 19;7(16):22566–78.
77. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med*. 2009 Jan;13(1):39-53.
 78. Lee H. J. Exceptional stories of microRNAs. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Apr;238(4):339-43.
 79. Lekchnov EA, Amelina EV, Bryzgunova OE, Zaporozhchenko IA, Konoshenko MY, Yarmoschuk SV, et al. Searching for the Novel Specific Predictors of Prostate Cancer in Urine: The Analysis of 84 miRNA Expression. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 17;19(12). pii: E4088.
 80. Li D, Hao X, Song Y. Identification of the Key MicroRNAs and the miRNA-mRNA Regulatory Pathways in Prostate Cancer by Bioinformatics Methods. *Biomed Res Int*. 2018 Jun 20;2018:6204128.
 81. Li T, Li R-S, Li Y-H, Zhong S, Chen Y-Y, Zhang C-M, et al. miR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. *J Urol*. 2012 Apr;187(4):1466–72.
 82. Lin HM, Castillo L, Mahon KL, Chiam K, Lee BY, Nguyen Q, et al. Circulating microRNAs are associated with docetaxel chemotherapy outcome in castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer*. 2014 May 13;110(10):2462–71.
 83. Lin HM, Mahon KL, Spielman C, Gurney H, Mallesara G, Stockler MR, et al. Phase 2 study of circulating microRNA biomarkers in castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer*. 2017 Apr 11;116(8):1002-11.
 84. Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Nov;12(11):847-65.
 85. Liu G, Sprenger C, Sun S, Epilepsia KS, Haugk K, Zhang X, et al. AR variant ARv567es induces carcinogenesis in a novel transgenic mouse model of prostate cancer. *Neoplasia*. 2013 Sep;15(9):1009–17.
 86. Liu H, Wu Z, Zhou H, Cai W, Li X, Hu J, et al. The SOX4/miR-17-92/RB1 Axis Promotes Prostate Cancer Progression. *Neoplasia*. 2019 Aug;21(8):765–76.
 87. Liu LL, Xie N, Sun S, Plymate S, Mostaghel E, Dong X. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2014 Jun 12;33(24):3140–50.
 88. Liu X, Ledet E, Li D, Dotiwala A, Steinberger A, Feibus A, et al. A Whole Blood Assay for AR-V7 and ARv567es in Patients with Prostate Cancer. *J Urol*. 2016 Dec;196(6):1758–63.
 89. Lonergan PE, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog*. 2011;10:20.
 90. Lovat F, Fassan M, Sacchi D, Ranganathan P, Palamarchuk A, Bill M, et al. Knockout of both miR-15/16 loci induces acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Dec 18;115(51):13069–74.

91. Lu C., J. Luo. Decoding the androgen receptor splice variants. *Transl Androl Urol.* 2013 Sep;2(3):178-86.
92. Luo J, Attard G, Balk SP, Bevan C, Burnstein K, Cato L et al. Role of Androgen Receptor Variants in Prostate Cancer: Report from the 2017 Mission Androgen Receptor Variants Meeting. *Eur Urol.* 2018 May;73(5):715–23.
93. Madhavan D, Zucknick M, Wallwiener M, Cuk K, Modugno C, Scharpf M, et al. Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2012 Nov 1;18(21):5972–82.
94. Maughan BL, Antonarakis ES. Androgen pathway resistance in prostate cancer and therapeutic implications. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16(10):1521–37.
95. Mo W, Zhang J, Li X, Meng D, Gao Y, Yang S, et al. Identification of novel AR-targeted microRNAs mediating androgen signalling through critical pathways to regulate cell viability in prostate cancer. *PLoS ONE* 2013;8(2):e56592.
96. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online.* 2006;8:175–93.
97. Murata T, Takayama K, Katayama S, Urano T, Horie-Inoue K, Ikeda K, et al. miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2010 Dec;13(4):356–61.
98. Naeini MM, Ardekani AM. Noncoding RNAs and Cancer. *Avicenna J Med Biotech.* 2009 Jul;1(2):55–70
99. Nelson PS. Targeting the androgen receptor in prostate cancer--a resilient foe. *N Engl J Med.* 2014 Sep 11;371(11):1067–9.
100. Nguyen HC, Xie W, Yang M, Hsieh CL, Drouin S, Lee GS, et al. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate.* 2013 Mar;73(4):346–54.
101. Nuhn P, De Bono JS, Fizazi K, Freedland SJ, Grilli M, Kantoff PW et al. Update on Systemic Prostate Cancer Therapies: Management of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer in the Era of Precision Oncology. *Eur Urol.* 2019 Jan;75(1):88-99.
102. Nurmi J, Lilja H, Ylikoski A. Time-resolved fluorometry in end-point and real-time PCR quantification of nucleic acids. *Luminescence.* 2000 Nov-Dec;15(6):381–8.
103. Ottman R, Levy J, Grizzle WE, Chakrabarti R. The other face of miR-17-92a cluster, exhibiting tumor suppressor effects in prostate cancer. *Oncotarget.* 2016 Nov 8;7(45):73739–53.

104. Ouyang Y, Gao P, Zhu B, Chen X, Lin F, Wang X, et al. Downregulation of microRNA-429 inhibits cell proliferation by targeting p27Kip1 in human prostate cancer cells. *Mol Med Rep*. 2015 Feb;11(2):1435-41.
105. Paliouras M, Alvarado C, Trifiro M. Redefining Androgen Receptor Function: Clinical Implications in Understanding Prostate Cancer Progression and Therapeutic Resistance. In: Mohan R (ed). *Prostate cancer – Leading-edge Diagnostic Procedures and Treatments*. IntechOpen: London, UK, 2016; pp 93–124.
106. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 5;105(5):1608-13.
107. Porzycki P, Ciszkowicz E, Semik M, Tyrka M. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. *Int Urol Nephrol*. 2018 Sep;50(9):1619–26.
108. Qu F, Xie W, Nakabayashi M, Zhang H, Jeong SH, Wang X, et al. Association of AR-V7 and Prostate-Specific Antigen RNA Levels in Blood with Efficacy of Abiraterone Acetate and Enzalutamide Treatment in Men with Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017 Feb 1;23(3):726–34.
109. Ribas J, Lupold SE. The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer. *Cell Cycle*. 2010 Mar 1;9(5):923–9.
110. Roberts MJ, Chow CWK, Schirra HJ, Richards R, Buck M, Selth LA, et al. Diagnostic performance of expression of PCA3, Hepsin and miR biomarkers in ejaculate in combination with serum PSA for the detection of prostate cancer. *Prostate*. 2015 Apr 1;75(5):539–49.
111. Ryan C, Shore ND, Concepcion R. A urologic oncology roundtable discussion: how to choose among the available therapies for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Postgrad Med*. 2013 Nov;125(6):114–6.
112. Sabaliauskaite R, Jarmalaite S, Petroska D, Dasevicius D, Laurinavicius A, Jankevicius F, et al. Combined analysis of TMPRSS2-ERG and TERT for improved prognosis of biochemical recurrence in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Aug;51(8):781–91.
113. Saetrom P, Snøve O Jr, Rossi JJ. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*. 2007 May;61(5 Pt 2):17R–23R.
114. Sapre N, Hong MKH, Macintyre G, Lewis H, Kowalczyk A, Costello AJ, et al. Curated microRNAs in urine and blood fail to validate as predictive biomarkers for high-risk prostate cancer. *PLOS ONE* 2014;9(4):e91729.
115. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer*. 2010 Mar 1;126(5):1166–76.
116. Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, McLaughlin B, Lu D, Louw J et al. Nuclear-specific AR-V7 Protein Localization is Necessary to Guide Treatment

- Selection in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2017 Jun;71(6):874–82.
- 117.Schmidt LJ, Tindall DJ. Steroid 5 alpha-reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;125:32–8.
- 118.Seitz AK, Thoene S, Bietenbeck A, Nawroth R, Tauber R, Thalgott M et al. AR-V7 in Peripheral Whole Blood of Patients with Castration-resistant Prostate Cancer: Association with Treatment-specific Outcome Under Abiraterone and Enzalutamide. *Eur Urol.* 2017 Nov;72(5):828–34.
- 119.Selth LA, Das R, Townley SL, Coutinho I, Hanson AR, Centenera MM, et al. A ZEB1-miR-375-YAP1 pathway regulates epithelial plasticity in prostate cancer. *Oncogene.* 2017 Jan 5;36(1):24–34.
- 120.Selth LA, Roberts MJ, Chow CWK, Marshall VR, Doi SAR, Vincent AD, et al. Human seminal fluid as a source of prostate cancer-specific microRNA biomarkers. *Endocr Relat Cancer.* 2014 Aug;21(4):L17–21.
- 121.Selth LA, Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ, et al. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *Int J Cancer.* 2012 Aug 1;131(3):652–61.
- 122.Serenaite I, Daniunaite K, Jankevicius F, Laurinavicius A, Petroska D, Lazutka JR, et al. Heterogeneity of DNA methylation in multifocal prostate cancer. *Virchows Arch.* 2015 Jan;466(1):53–9.
- 123.Shen J, Hraby GW, McKiernan JM, Gurvich I, Lipsky MJ, Benson MC, et al. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *Prostate.* 2012 Sep 15;72(13):1469–77.
- 124.Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 2010 Sep 15;24(18):1967–2000.
- 125.Silva-Santos RM, Costa-Pinheiro P, Luis A, Antunes L, Lobo F, Oliveira J, et al. MicroRNA profile: a promising ancillary tool for accurate renal cell tumour diagnosis. *Br J Cancer.* 2013 Nov 12;109(10):2646–53.
- 126.Souza AF, Brum IS, Neto BS, Berger M, Branchini G. Reference gene for primary culture of prostate cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2013 Apr;40(4):2955–62.
- 127.Spans L, Clinckemalie L, Helsen C, Vanderschueren D, Boonen S, Lerut E, et al. The genomic landscape of prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2013 May 24;14(6):10822–51.
- 128.Sprenger CC, Plymate SR. The link between androgen receptor splice variants and castration-resistant prostate cancer. *Horm Cancer.* 2014 Aug;5(4):207–17.
- 129.Stähler CF, Keller A, Leidinger P, Backes C, Chandran A, Wischhusen J, et al. Whole miRNome-wide differential co-expression of microRNAs. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2012 Oct;10(5):285–94.
- 130.Steinestel J, Luedeke M, Arndt A, Schnoeller TJ, Lennerz JK, Wurm C, et al. Detecting predictive androgen receptor modifications in circulating prostate cancer cells. *Oncotarget.* 2015 Apr 23;10(41):4213–23.

131. Stuopelyte K, Daniunaite K, Bakavicius A, Lazutka JR, Jankevicius F, Jarmalaite S: The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *Br J Cancer*. 2016a Sep 6;115(6):707–15.
132. Stuopelytė K, Daniūnaitė K, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Kaunas)*. 2016b;52(2):116–24.
133. Stuopelyte K, Sabaliauskaite R, Bakavicius A, Haflidadóttir BS, Visakorpi T, Väänänen RM, et al. Analysis of AR-FL and AR-V1 in Whole Blood of Patients with Castration Resistant Prostate Cancer as a Tool for Predicting Response to Abiraterone Acetate. *J Urol*. 2020 Feb 18:101097JU00000000000000803.
134. Sun S, Sprenger CC, Vessella RL, Haugk K, Soriano K, Mostaghel EA, et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest*. 2010 Aug;120(8):2715–30.
135. Szczyrba J, Löprich E, Wach S, Jung V, Unteregger G, Barth S, et al. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Mol Cancer Res*. 2010 Apr;8(4):529–38.
136. Takeuchi T, Okuno Y, Hattori-Kato M, Zaitso M, Mikami K. Detection of AR-V7 mRNA in whole blood may not predict the effectiveness of novel endocrine drugs for castration-resistant prostate cancer. *Res Rep Urol*. 2016 Jan 28;8:21–5.
137. Tepper CG, Boucher DL, Ryan PE, Ma AH, Xia L, Lee LF, et al. Characterization of a novel androgen receptor mutation in a relapsed CWR22 prostate cancer xenograft and cell line. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6606–14.
138. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*. 2006 Aug 15;20(16):2202–7.
139. Tian L, Fang Y, Xue J, Chen J. Four microRNAs promote prostate cell proliferation with regulation of PTEN and its downstream signals in vitro. *PLoS ONE* 2013;8:e75885.
140. Tilki D, Schaeffer EM, Evans CP. Understanding Mechanisms of Resistance in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: The Role of the Androgen Receptor. *Eur Urol Focus*. 2016 Dec;2(5):499–505.
141. Timms BG. 2008. Prostate development: A historical perspective. *Differentiation*. 2008 Jul;76(6):565–77.
142. To SQ, Kwan EM, Fettke HC, Mant A, Docanto MM, Martelotto L et al. Expression of Androgen Receptor Splice Variant 7 or 9 in Whole Blood Does Not Predict Response to Androgen-Axis-targeting Agents in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2018 Jun;73(6):818–821.
143. Todenhöfer T, Azad A, Stewart C, Gao J, Eigl BJ, Gleave ME et al. AR-V7 Transcripts in Whole Blood RNA of Patients with Metastatic Castration

- Resistant Prostate Cancer Correlate with Response to Abiraterone Acetate. *J Urol*. 2017 Jan;197(1):135–142.
144. Tong AW, Nemunaitis J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Ther*. 2008 Jun;15(6):341-55.
145. Velonas VM, Woo HH, dos Remedios CG, Assinder SJ. Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013 May 24;14(6):11034–60.
146. Vral A, Magri V, Montanari E, Gazzano G, Gourvas V, Marras E, et al. Topographic and quantitative relationship between prostate inflammation, proliferative inflammatory atrophy and low-grade prostate intraepithelial neoplasia: a biopsy study in chronic prostatitis patients. *Int J Oncol*. 2012 Dec;41(6):1950–8.
147. Wach S, Nolte E, Szczyrba J, Stöhr R, Hartmann A, Ørntoft T, et al. MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening. *Int J Cancer*. 2012 Feb 1;130(3):611–21.
148. Walter BA, Valera VA, Pinto PA, Merino MJ. Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. *J Cancer*. 2013 May 9;4(5):350–7.
149. Wang S-Y, Shiboski S, Belair CD, Cooperberg MR, Simko JP, Stoppler H, et al. miR-19, miR-345, miR-519c-5p serum levels predict adverse pathology in prostate cancer patients eligible for active surveillance. *PLOS ONE* 2014;9(6):e98597.
150. Wang Y, Qin T, Hu W, Chen B, Dai M, Xu G. Genome-Wide Methylation Patterns in Androgen-Independent Prostate Cancer Cells: A Comprehensive Analysis Combining MeDIP-Bisulfite, RNA, and microRNA Sequencing Data. *Genes (Basel)*. 2018 Jan 11;9(1).
151. Watahiki A, Macfarlane RJ, Gleave ME, Crea F, Wang Y, Helgason CD, Chi KN. Plasma miRNAs as biomarkers to identify patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013 Apr 10;14(4):7757–70.
152. Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, et al. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 28;107(39):16759–65.
153. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010 Nov;56(11):1733–41.
154. Willard SS, Koochekpour S. Regulators of gene expression as biomarkers for prostate cancer. *Am J Cancer Res*. 2012;2(6):620–57.
155. Xiao YF, Yong X, Fan YH, Lü MH, Yang SM, Hu CJ. microRNA detection in feces, sputum, pleural effusion and urine: novel tools for cancer screening (Review). *Oncol Rep*. 2013 Aug;30(2):535–44.
156. Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol*. 2011 Jun;32(3):583–8.

157. Yun SJ, Jeong P, Kang HW, Kim Y-H, Kim E-A, Yan C, et al. Urinary MicroRNAs of Prostate Cancer: Virus-Encoded hsv1-miRH18 and hsv2-miR-H9-5p Could Be Valuable Diagnostic Markers. *Int Neurourol J.* 2015 Jun;19(2):74–84.
158. Zhan Y, Zhang G, Wang X, Qi Y, Bai S, Li D, et al. Interplay between cytoplasmic and nuclear androgen receptor splice variants mediates castration resistance. *Mol Cancer Res.* 2017 Jan;15(1):59–68.
159. Zhang X, Morrissey C, Sun S, Ketchandji M, Nelson PS, True LD, et al. Androgen receptor variants occur frequently in castration resistant prostate cancer metastases. *PLoS One.* 2011;6(11):e27970.
160. Zhou P, Ma L, Zhou J, Jiang M, Rao E, Zhao Y, et al. miR-17-92 plays an oncogenic role and conveys chemo-resistance to cisplatin in human prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2016 Apr;48(4):1737–48.
161. Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis.* 2011 Jul 30;1(2):138–149.

PRIEDAI

S1 lentelė. Klinikinės-patologinės prostatos vėžiu sergančių ligonių charakteristikos androgenų receptoriaus (AR-FL) ir AR variantų (AR-V) raiškos tyrime prostatos audiniuose

Rodikliai	PV+	PV–
Ligoniai, N	100	12
Amžiaus mediana PV diagnozės metu, m. (IQR)	61 (12,5)	58,5 (9,3)
PSA		
Mediana (IQR) (ng/mL)	6,9 (5,4)	6,3 (7,3)
Nežinoma; N (%)	3 (3,0)	-
ISUP grupė		-
1; N (%)	41 (41,0)	
2; N (%)	44 (44,0)	
3; N (%)	15 (15,0)	
Naviko stadija, pT		-
≤ pT2; N (%)	66 (66,0)	
≥ pT3; N (%)	34 (34,0)	
Duomenų apie ligos eigą mediana, mėn. (IQR)	30,5 (29,5)	-
Biocheminė ligos progresija, BCR		-
Taip; N (%)	27 (27,0)	
Ne; N (%)	71 (71,0)	
Nežinoma; N (%)	2 (2,0)	
Išgyvenamumo be BCR progresijos mediana, mėn. (IQR)	13,0 (43,5)	-

Santrumpos: Navikiniai (PV+) ir nenavikiniai (PV–) prostatos audiniai; IQR – kvartilinis plotis; ISUP – angl. International Society of Urological Pathology; PSA – prostatos specifinis antigenas.

S2 lentelė. Pradmenų ir hidrolizės zondų sekos, pasirinktos iš publikacijų ir/ar sukurtos šiam androgenų receptoriaus (AR-FL) ir AR variantų (AR-V) tyrimui prostatos vėžiu (PV) sergančių ligonių audiniuose ir kastracijai atspariu PV sergančių ligonių kraujyje

Prostatos audinių tyrimas					
Genas	Prasminis 5'-3'	Antiprasminis 5'-3'	Ampl. ilgis, bp	Ref.	
<i>AR-FL</i>	CCATCTTGTTCGT CTTCGGAAATGT TATGAAGC	AGCTTCTGGGTTG TCTCCTCAGTGG	143	[Hu ir kt., 2011]	
<i>AR-V1</i>	<u>CCATCTTGTTCGT</u> <u>CTTCGGAAATGT</u> <u>TATGAAGC</u>	CTGTTGTGGATGA GCAGCTGAGAGT CT	149	[Hu ir kt., 2011]	
<i>AR-V3*</i>	<u>ATGTGGAAGCT</u> <u>GCAAGGTCTT</u>	TTCTGTCAGTCCC ATTGGTG	127	[Ajiboye ir kt., 2017]	
<i>AR-V7</i>	<u>CCATCTTGTTCGT</u> <u>CTTCGGAAATGT</u> <u>TATGAAGC</u>	TTTGAATGAGGC AAGTCAGCCTTTC T	125	[Hu ir kt., 2011]	
<i>HPRT1</i>	AGATGGTCAAG GTCGCAAG	GTATTCATTATAG TCAAGGGCATAT CC	128	[Souza ir kt., 2013]	
Kraujo tyrimas					
Genas	Prasminis 5'-3'	Antiprasminis 5'-3'	Zondas 5'-3'	Ampl. ilgis, bp	Ref.
<i>AR-V1</i>	<u>CCATCTTG</u> <u>TCGTCTTC</u> <u>GGAAATG</u> <u>TT</u>	TCCAAACAC CCTCAAGAT TCTTTCA	GACTC TGGGA GCAGC TG	90	Šis tyrimas
<i>AR-V3</i>	<u>ATGTGGA</u> <u>AGCTGCA</u> <u>AGGTCTT</u>	GGGTTAGTG TCTGATTATG ATTCTTTTAA TTTG	CCGCT GAAGG ATTTT	90	Šis tyrimas
<i>AR-V7</i>	<u>TGTCGTCT</u> <u>TCGGAAA</u> <u>TGTTATG</u> <u>A</u>	TCATTTTGAG ATGCTTGCA ATTG	TCTGG GAGAA AAATT	82	[Liu ir kt., 2014]
<i>AR-V9</i>	GGAAATG TTATGAA GCAGGGA TGAC	CTGCATCCTC TCTCACAAG TACATG	CAGGT GTGAT CTCCC	72	Šis tyrimas

S2 lentelė. Tęsinys.

Kraujo tyrimas					
Genas	Prasminis 5'-3'	Antiprasminis 5'-3'	Zondas 5'-3'	Ampl. ilgis, bp	Ref.
<i>AR-V12</i>	ACAGCTT GTACACG TGGTCAA	ACAGCTTGT ACACGTGGT CAA	CTCTCT CGCAA TCAGG C	74	Šis tyrimas
<i>KLK3- IC</i>	CATCAGG AACAAAA GCGTGA	ATATCGTAG AGCGGGTGT GG	CTCTC CGGTA GCTGC GAAAA	111	Šis tyrimas

* – prasminis pradmuo buvo sukurtas šiam tyrimui, o antiprasminis buvo parinktas iš A.S. Ajiboye ir kolegų publikacijos [Ajiboye ir kt., 2017]; tarp audinio ir kraujo tyrimų atitinkančios pradmenų sekos yra pabrauktos.

S3 lentelė. Statistiškai reikšmingos sąsajos, nustatytos tarp miRNR raiškos ir klinikinių-patologinių prostatos vėžio charakteristikų, gautos 54 prostatos audinius ištyrus naudojant *TaqMan Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0 (ABI, TFS)*

Navikiniai vs. nenavikiniai prostatos audiniai					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-183*	4,0	<0,000001	miR-204	-2,3	<0,0001
miR-340	1,8	<0,0001	miR-152	-1,6	<0,0001
miR-19a	1,9	<0,0001	miR-222*	-4,3	<0,0001
miR-375	2,2	0,0002	miR-139-5p	-1,8	<0,0001
miR-339-5p	4,8	0,0002	miR-24	-1,5	0,0001
mmu-miR-93	1,8	0,0003	miR-886-5p	-3,0	0,0001
miR-148a	2,2	0,0003	miR-370	-4,0	0,0002
miR-19b	1,7	0,0004	miR-452	-1,7	0,0004
miR-106b	1,6	0,0004	miR-222	-1,9	0,0006
miR-425-5p	1,6	0,0007	miR-1271	-2,0	0,0007
miR-183	2,8	0,0011	mmu-miR-134	-3,1	0,0007
miR-200c	1,6	0,0012	miR-433	-4,2	0,0008
mmu-miR-140	1,4	0,0012	miR-133b	-2,2	0,0009
miR-200b*	3,5	0,0015	miR-657	-19,9	0,0009
miR-1267	5,7	0,0025	miR-205	-2,4	0,0009
miR-92a	1,5	0,0026	miR-886-3p	-2,4	0,0010
miR-636	2,4	0,0032	miR-320	-1,7	0,0010
miR-182	2,3	0,0036	miR-130a	-1,6	0,0011
miR-542-5p	11,8	0,0039	miR-34a*	-1,8	0,0013
mmu-miR-96	3,2	0,0039	miR-220	-2,4	0,0017
miR-93*	1,4	0,0040	miR-133a	-1,9	0,0023
miR-17	1,4	0,0046	miR-376c	-1,5	0,0035
miR-191	1,5	0,0048	miR-1285	-3,0	0,0044
let-7g	1,2	0,0048	miR-138	-2,4	0,0050
rno-miR-7*	1,7	0,0064	miR-31	-1,9	0,0058
miR-142-3p	1,6	0,0081	miR-455	-1,7	0,0065
miR-1208	2,2	0,0088	miR-31*	-1,8	0,0066
miR-92a-1*	5,3	0,0096	miR-339-3p	-1,4	0,0067
miR-520f	4,0	0,0103	let-7b	-1,7	0,0074
miR-643	3,8	0,0108	miR-143	-1,5	0,0088
miR-519a	4,3	0,0110	let-7c	-1,7	0,0089
miR-151-3p	2,0	0,0112	miR-214	-1,5	0,0095

S3 lentelė. Tęsinys.

Navikiniai vs. nenavikiniai prostatos audiniai					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-432*	3,3	0,0119	miR-193b	-1,4	0,0097
miR-618	2,4	0,0151	miR-410	-2,0	0,0100
miR-146b	1,5	0,0153	miR-214*	-1,8	0,0111
miR-20a*	1,8	0,0173	miR-502-3p	-1,7	0,0111
miR-627	9,0	0,0181	miR-454*	-1,8	0,0128
miR-628-5p	2,3	0,0195	miR-324-3p	-1,8	0,0138
miR-30b	1,2	0,0202	miR-23b	-1,9	0,0144
miR-374	1,4	0,0210	miR-145	-1,6	0,0150
miR-20a	1,6	0,0224	miR-323-3p	-2,2	0,0156
miR-1255B	2,7	0,0298	miR-181c*	-2,1	0,0173
miR-522	5,8	0,0299	miR-15a	-1,9	0,0173
miR-573	2,4	0,0322	miR-889	-2,6	0,0179
miR-1275	2,8	0,0332	miR-99a	-1,5	0,0189
miR-592	3,1	0,0362	miR-1247	-1,7	0,0239
miR-1233	1,7	0,0404	miR-330	-1,9	0,0261
miR-449	4,0	0,0405	miR-125b	-1,3	0,0282
miR-1305	33,6	0,0415	miR-218	-1,3	0,0309
miR-25	1,5	0,0418	miR-1	-1,5	0,0332
miR-26b	1,2	0,0445	miR-151-5P	-1,8	0,0342
miR-597	2,8	0,0458	miR-224	-1,7	0,0363
miR-141	1,3	0,0470	miR-193a-5p	-1,5	0,0364
miR-106a	1,3	0,0473	miR-27b	-1,7	0,0368
miR-1227	1,8	0,0492	miR-16	-1,2	0,0422
			miR-184	-3,3	0,0428
			miR-99a*	-1,4	0,0444
			miR-539	-1,6	0,0487
Biocheminė ligos progresija, Taip vs. Ne					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-505*	3,2	0,0009	miR-193b	-1,6	0,0016
miR-941	5,3	0,0013	miR-1208	-2,3	0,0078
miR-200b*	2,5	0,0080	miR-1225-3P	-1,8	0,0089
let-7d	1,4	0,0084	miR-1825	-3,0	0,0094
miR-183*	2,0	0,0084	miR-220	-1,8	0,0109
miR-139-3p	6,9	0,0101	miR-636	-2,0	0,0164
miR-449b	5,3	0,0199	miR-218	-1,3	0,0200
miR-449	4,8	0,0255	miR-655	-2,1	0,0216
let-7a	1,4	0,0305	miR-638	-2,1	0,0229

S3 lentelė. Tęsinys.

Biocheminė ligos progresija, Taip vs. Ne					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-766	1,8	0,0332	miR-365	-1,2	0,0246
miR-95	1,5	0,0355	miR-1233	-1,7	0,0250
miR-27b*	1,6	0,0391	miR-1227	-1,8	0,0282
			miR-339-3p	-1,4	0,0305
			miR-224	-1,7	0,0322
			miR-144*	-2,2	0,0326
			miR-579	-5,3	0,0349
			miR-518f	-4,0	0,0419
			miR-203	-1,3	0,0434
			miR-133a	-1,6	0,0456
TMPRSS2-ERG statusas, Teigiami vs. Neigiami navikai					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-195	1,5	0,0002	miR-99b	-1,8	0,0003
miR-19a	1,6	0,0003	miR-331	-1,4	0,0004
miR-19b	1,6	0,0006	miR-184	-10,3	0,0005
miR-429	2,9	0,0006	miR-320	-1,6	0,0005
miR-21	2,0	0,0007	miR-30a-3p	-1,5	0,0014
miR-200b	2,7	0,0013	let-7b	-1,7	0,0014
miR-95	1,7	0,0020	miR-193b*	-7,5	0,0022
miR-20a	1,7	0,0020	miR-30e-3p	-1,4	0,0033
mmu-miR-140	1,3	0,0021	miR-193b	-1,4	0,0044
miR-9	2,2	0,0021	miR-26a-1*	-2,0	0,0049
miR-708	2,0	0,0031	mmu-miR-574-3p	-1,3	0,0049
miR-92a	1,4	0,0045	let-7c	-1,6	0,0100
miR-34a	1,8	0,0048	miR-766	-1,8	0,0112
miR-200a	2,4	0,0052	miR-516-3p	-3,4	0,0145
miR-181a-2*	1,9	0,0073	miR-210	-1,5	0,0150
miR-148a	1,7	0,0089	miR-342-3p	-1,4	0,0171
miR-10b	2,9	0,0091	miR-628-3p	-2,1	0,0196
miR-194	1,5	0,0097	miR-155	-1,6	0,0218
miR-106b	1,4	0,0110	miR-139-5p	-1,4	0,0233
miR-132	1,3	0,0119	miR-425*	-1,6	0,0243
miR-335*	1,9	0,0124	mmu-miR-134	-1,8	0,0287
miR-1275	2,6	0,0134	miR-99b*	-1,8	0,0314
miR-598	1,4	0,0207	miR-150	-1,5	0,0317

S3 lentelė. Tęsinys.

TMPRSS2-ERG statusas, Teigiami vs. Neigiami navikai					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-200a*	1,8	0,0217	miR-1276	-2,5	0,0327
miR-512-3p	2,6	0,0218	miR-1260	-1,5	0,0336
mmu-miR-93	1,4	0,0252	miR-16	-1,2	0,0369
miR-26a	1,2	0,0255	miR-374-5p	-1,2	0,0391
miR-17	1,3	0,0301	miR-432*	-2,0	0,0410
miR-27a	1,4	0,0320	miR-517b	-1,4	0,0425
miR-25	1,5	0,0353	miR-1285	-2,2	0,0429
miR-98	1,7	0,0389	miR-197	-1,3	0,0488
miR-19b-1*	2,8	0,0413			
Gleason balas, G\geq7 vs. G=6					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-200a*	2,3	0,0020	miR-423-5p	-9,8	0,0081
miR-1233	1,8	0,0072	miR-222	-1,6	0,0148
miR-374b*	4,3	0,0079	miR-493	-3,2	0,0224
miR-192*	3,5	0,0080	miR-663B	-2,7	0,0409
miR-335*	2,0	0,0085	miR-130b	-1,6	0,0423
miR-296	1,7	0,0125	mmu-miR-495	-1,7	0,0428
miR-636	1,9	0,0200	mmu-miR-124a	-6,6	0,0451
miR-1227	1,8	0,0216	miR-221	-1,8	0,0472
miR-1225-3P	1,7	0,0219			
miR-422a	1,5	0,0228			
miR-499-3p	4,8	0,0244			
miR-628-5p	2,1	0,0301			
miR-339-5p	2,3	0,0375			
miR-223*	2,7	0,0480			
Iškirstytas Gleason balas, G\geq(4+3) vs. G\leq(3+4)					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-15b*	4,5	0,0029	miR-133a	-3,7	<0,00001
miR-183*	3,2	0,0035	miR-143	-2,4	<0,0001
miR-10b*	2,2	0,0042	miR-205	-3,9	0,0002
miR-664	1,7	0,0044	miR-31	-3,4	0,0003
miR-1274A	3,0	0,0045	miR-200a	-5,6	0,0003
rno-miR-7*	2,1	0,0049	miR-1	-2,6	0,0003
miR-449	13,8	0,0050	miR-204	-2,6	0,0003
miR-15b	1,6	0,0055	miR-200b	-5,0	0,0010
miR-1274B	2,5	0,0083	miR-133b	-2,6	0,0014

S3 lentelė. Tęsinys.

Iškirstytas Gleason balas, $G \geq (4+3)$ vs. $G \leq (3+4)$					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-106b*	4,4	0,0093	miR-145	-2,4	0,0019
miR-340*	2,2	0,0114	miR-222	-2,2	0,0020
miR-23a	7,6	0,0116	miR-193b	-1,8	0,0049
miR-149*	5,2	0,0133	miR-539	-2,6	0,0082
miR-30a-5p	1,7	0,0139	miR-220	-2,2	0,0114
miR-340	1,5	0,0152	miR-363	-2,3	0,0175
miR-625*	1,5	0,0161	miR-221	-2,7	0,0183
miR-601	6,1	0,0168	miR-523	-5,3	0,0206
miR-125b-2*	2,8	0,0192	miR-139-5p	-1,6	0,0300
miR-93*	1,4	0,0246	miR-31*	-2,1	0,0313
miR-374b*	8,4	0,0270	miR-455	-1,8	0,0336
miR-15a*	2,7	0,0309			
miR-320B	3,2	0,0315			
miR-505*	4,3	0,0345			
miR-183	2,5	0,0351			
miR-182	2,0	0,0381			
miR-95	1,8	0,0406			
miR-22*	2,7	0,0426			
miR-449b	7,3	0,0433			
miR-1300	5,5	0,0493			
Naviko stadija, pT3 vs. pT2					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-142-3p	1,6	0,0048	miR-331-5p	-3,6	0,0038
miR-642	2,0	0,0125	miR-220	-1,7	0,0226
miR-34b	2,0	0,0126	miR-484	-1,3	0,0240
miR-10a	1,7	0,0189	miR-886-3p	-1,8	0,0259
miR-301	1,5	0,0273	miR-370	-2,3	0,0266
miR-342-5p	3,9	0,0313	miR-223*	-3,0	0,0324
miR-199b	2,1	0,0476	miR-193b	-1,3	0,0362
miR-23a	2,6	0,0493	miR-133a	-1,5	0,0421
			miR-125a-3p	-2,0	0,0452
Operacinis kraštas, Teigiami vs. Neigiami navikai					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-508-5p	7,5	0,0034	miR-1269	-10,5	0,0014
miR-573	2,4	0,0056	miR-338-3p	-2,9	0,0131
miR-141*	2,3	0,0292	miR-518d	-3,2	0,0235
miR-1227	1,7	0,0306	miR-15a*	-1,9	0,0276

S3 lentelė. Tęsinys.

Operacinis kraštas, Teigiami vs. Neigiami navikai					
Padidėjusi	FC	P vertė	Sumažėjusi	FC	P vertė
miR-1225-3P	1,6	0,0354	miR-375	-1,5	0,0302
miR-1233	1,6	0,0364	miR-15a	-1,7	0,0443
miR-1208	1,8	0,0444			
miR-409-3p	1,3	0,0494			
miR-1271	1,5	0,0497			
Koreliacija su PSA					
Teigiama	r	P vertė	Neigiama	r	P vertė
miR-214*	0,4	0,0066	miR-200b	-0,5	<0,0001
miR-769-5p	0,4	0,0068	miR-200a	-0,5	0,0001
miR-138	0,4	0,0075	miR-31	-0,4	0,0107
miR-34b	0,4	0,0076	miR-422a	-0,3	0,0124
miR-130b	0,4	0,0078	miR-21	-0,3	0,0211
miR-200b*	0,3	0,0154	miR-545*	-0,3	0,0399
miR-672	0,3	0,0178			
miR-517c	0,3	0,0182			
miR-429	0,3	0,0191			
let-7g*	0,3	0,0192			
miR-1179	0,3	0,0210			
miR-20a*	0,3	0,0257			
miR-224	0,3	0,0260			
miR-522	0,3	0,0274			
miR-517a	0,3	0,0282			
miR-944	0,3	0,0360			
miR-18a	0,3	0,0461			
miR-148b	0,3	0,0478			

Santrumpos: FC – raiškos skirtumas kartais; r – *Pearson* koreliacijos koeficientas.

S4 lentelė. Validavimui atrinktos miRNR ir nustatytos sąsajos su klinikiniais-patologiniais prostatos vėžio rodikliais

Navikiniai vs. nenavikiniai prostatos audiniai					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
miR-375	1,4	0,0146	miR-31	-1,9	0,0079
miR-19a	1,5	0,0236	miR-365	-1,2	0,0775
miR-148a	1,4	0,0270	miR-505*	-1,2	0,5371
miR-183*	1,4	0,0949	miR-429	-1,2	0,5443
miR-21	1,7	0,1298	miR-17	-1,1	0,4192
miR-106b	1,1	0,1616	let-7b	-1,1	0,7514
miR-93*	1,1	0,2488	miR-19b	-1,1	0,5885
miR-20a	1,1	0,2924			
miR-92a	1,1	0,3526			
miR-340	1,1	0,3933			
miR-195	1,1	0,7014			
Biocheminė ligos progresija, Taip vs. Ne					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
miR-505*	1,7	0,0480	miR-21	-1,5	0,1664
miR-106b	1,2	0,0772	miR-19a	-1,2	0,1857
miR-148a	1,2	0,1907	miR-365	-1,1	0,2722
miR-183*	1,3	0,2034	let-7b	-1,3	0,3248
miR-340	1,2	0,2246	miR-195	-1,2	0,3876
miR-93*	1,1	0,3927	miR-31	-1,2	0,3946
miR-17	1,1	0,4671	miR-92a	-1,0	0,6677
miR-375	1,1	0,5396			
miR-19b	1,1	0,5530			
miR-20a	1,1	0,5638			
miR-429	1,1	0,6574			
TMPRSS2-ERG statusas, Teigiami vs. Neigiami navikai					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
miR-429	2,0	0,0077	miR-21	-1,7	0,0476
miR-92a	1,2	0,0594	miR-365	-1,2	0,0895
miR-20a	1,2	0,1200	miR-19a	-1,3	0,1273
miR-17	1,1	0,3542	let-7b	-1,4	0,1508
miR-93*	1,1	0,4228	miR-505*	-1,4	0,2343
miR-106b	1,1	0,4372	miR-195	-1,1	0,4165
miR-375	1,1	0,4622	miR-340	-1,0	0,7999
miR-148a	1,1	0,4925			

S4 lentelė. Tęsinys.

<i>TMPRSS2-ERG</i> statusas, Teigiami vs. Neigiami navikai					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
miR-31	1,1	0,5662			
miR-183*	1,1	0,5724			
miR-19b	1,0	0,9225			
<i>Gleason</i> balas, $G \geq 7$ vs. $G=6$					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
miR-106b	1,2	0,0187	miR-365	-1,3	0,0072
miR-375	1,3	0,0582	let-7b	-1,6	0,0219
miR-93*	1,1	0,0793	miR-21	-1,7	0,0531
miR-17	1,1	0,2858	miR-19a	-1,3	0,0597
miR-19b	1,1	0,4007	miR-195	-1,2	0,2956
miR-183*	1,2	0,4580	miR-505*	-1,0	0,8868
miR-340	1,1	0,5205	miR-92a	-1,0	0,9376
miR-31	1,1	0,6846			
miR-429	1,1	0,8067			
miR-148a	1,0	0,8600			
miR-20a	1,0	0,9879			
Iškirstytas <i>Gleason</i> balas, $G \geq (4+3)$ vs. $G \leq (3+4)$					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
miR-340	1,4	0,0394	miR-429	-3,3	0,0006
miR-375	1,4	0,0871	miR-31	-2,1	0,0045
miR-183*	1,4	0,2065	miR-20a	-1,2	0,2027
let-7b	1,5	0,2174	miR-148a	-1,2	0,2692
miR-195	1,3	0,2465	miR-17	-1,1	0,4174
miR-19a	1,3	0,2796	miR-92a	-1,1	0,5066
miR-93*	1,1	0,3092	miR-365	-1,1	0,6287
miR-106b	1,1	0,3582	miR-19b	-1,0	0,9554
miR-21	1,4	0,4201			
miR-505*	1,1	0,9114			
Naviko stadija, pT3 vs. pT2					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
miR-340	1,4	0,0051	miR-19b	-1,2	0,0987
miR-195	1,3	0,1168	miR-31	-1,3	0,1589
miR-21	1,5	0,1659	miR-92a	-1,1	0,2335

S4 lentelė. Tęsinys.

Naviko stadija, pT3 vs. pT2					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
miR-19a	1,2	0,3281	miR-429	-1,3	0,2641
let-7b	1,1	0,6295	miR-20a	-1,1	0,3491
miR-183*	1,0	0,9455	miR-148a	-1,1	0,4253
			miR-505*	-1,2	0,4761
			miR-93*	-1,0	0,5948
			miR-365	-1,0	0,7675
			miR-106b	-1,0	0,8510
			miR-375	-1,0	0,9384
Operacinis kraštas, Teigiami vs. Neigiami navikai					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
miR-28	1,2	0,0678	miR-19a	-1,4	0,0459
miR-148a	1,2	0,1202	let-7b	-1,3	0,1817
miR-106b	1,1	0,1846	miR-21	-1,3	0,3536
miR-20a	1,2	0,1885	miR-195	-1,2	0,2851
miR-505*	1,4	0,1910	miR-183*	-1,2	0,4125
miR-19b	1,1	0,3557	miR-375	-1,1	0,5893
miR-92a	1,1	0,6143			
miR-365	1,0	0,6487			
miR-31	1,1	0,7913			
miR-429	1,0	0,9249			
miR-340	1,0	0,9543			
miR-93*	1,0	0,9303			
Koreliacija su PSA					
Teigiama	r	P vertė	Neigiama	r	P vertė
miR-365	0,3	0,0553	miR-429	-0,6	< 0,0001
miR-340	0,2	0,1442	miR-31	-0,2	0,1002
miR-19a	0,2	0,2569	miR-505*	-0,2	0,1821
miR-28	0,2	0,2983	miR-93*	-0,1	0,5309
miR-21	0,1	0,3082	miR-195	0,0	0,7631
miR-19b	0,1	0,3883	miR-20a	0,0	0,8263
let-7b	0,1	0,4085	miR-148a	0,0	0,9400
miR-375	0,0	0,7607	miR-106b	0,0	0,9666
miR-92a	0,0	0,9488			
miR-183*	0,0	0,9682			

Santrumpos: FC – raiškos skirtumas kartais; r – Pearson koreliacijos koeficientas.

S5 lentelė. Sąsajos, nustatytos tarp klinikinių-patologinių charakteristikų ir santykinio miRNR kiekio šlapime, surinktame iš dviejų nepriklausomų, prostatos vėžiu (PV1 ir PV2), gerybine prostatos hiperplazija (GPH), sergančių ligonių ir asimptomatinių asmenų (AK)

PV	PV1	PV2	PV1 + PV2
Kontrolės	GPH	AK	BPH + AK
(P vertė; FC)			
miR-148a	<0,000001; -2,0	<0,000001; -1,8	<0,000001; -1,7
miR-365	0,8616; 1,0	<0,00001; -1,6	0,0188; -1,2
miR-375	0,0001; 2,4	<0,0000001; 3,1	0,0005; 1,7
miR-429	0,1971; -1,2	0,6865; -1,1	0,0708; 1,2
BCR Taip vs. Ne			
miR-148a	0,9121; 1,0	0,6348; -1,1	>0,99; 1,0
miR-365	0,4472; -1,1	0,1456; 1,3	0,9313; -1,0
miR-375	0,7625; 1,1	0,9866; -1,0	0,9585; -1,0
miR-429	0,7359; 1,1	0,6382; -1,2	0,8956; 1,0
TMPRSS2-ERG statusas Teigiami vs. Neigiami navikai			
miR-148a	0,2682; -1,1	0,5957; -1,1	0,2021; -1,1
miR-365	0,2184; 1,2	0,2733; -1,2	0,4233; 1,1
miR-375	0,6429; 1,1	0,0373; 2,4	0,1542; 1,3
miR-429	0,2928; -1,2	0,1907; -1,8	0,0928; -1,3
Naviko stadija pT3 vs. pT2			
miR-148a	0,8291; 1,0	0,2177; 1,2	0,4259; 1,1
miR-365	0,1779; 1,2	0,8718; -1,0	0,2871; 1,1
miR-375	0,0027; -1,7	0,6415; -1,1	0,0451; -1,5
miR-429	0,0290; 1,4	0,8678; -1,0	0,2477; 1,2
Gleason balas G≥7 vs. G=6			
miR-148a	0,3456; 1,1	0,9645; -1,0	0,8729; -1,0
miR-365	0,4818; 1,1	0,5495; 1,1	0,9342; 1,0
miR-375	0,2246; -1,2	0,5962; -1,2	0,1887; 1,2
miR-429	0,9889; 1,0	0,7901; 1,1	0,1034; -1,2
Iškirstytas Gleason balas G≥(4+3) vs. G≤(3+4)			
miR-148a	0,9425; -1,0	0,9802; -1,0	0,4318; -1,1
miR-365	0,7545; 1,1	0,5752; -1,1	0,4810; -1,1
miR-375	0,3613; -1,3	0,2851; -1,3	0,4628; 1,2
miR-429	0,3797; 1,2	0,1620; 1,5	0,8796; 1,0

Santrumpos: BCR – biocheminė ligos progresija; FC – raiškos skirtumas kartais

S6 lentelė. miRNR, nustatytos navikiniuose prostatos audiniuose visuminio miRNR raiškos tyrimo mikrogardelėmis metu, ir pagal raišką suskirstytos į aukštą, vidutinę ir žemą. Pateiktos tik tos miRNR, kurios buvo nustatytos $\geq 30\%$ mėginių (N = 450)

Aukšta raiška (N = 118)	Vidutiniška raiška (N = 93)	Žema raiška (N = 239)	
let-7a	miR-3149	let-7a*	miR-3621
let-7b	miR-98	let-7b*	miR-362-3p
let-7c	miR-128	let-7d*	miR-362-5p
let-7d	miR-132	let-7f-1*	miR-3646
let-7e	miR-134	miR-106a*	miR-3647-5p
let-7f	miR-149	miR-1180	miR-3648
let-7g	miR-152	miR-1181	miR-3652
let-7i	miR-155	miR-1183	miR-3654
miR-1	miR-183	miR-1224-3p	miR-3675-3
miR-100	miR-185	miR-1224-5p	miR-3676
miR-101	miR-186	miR-1225-3p	miR-3679-3
miR-103	miR-204	miR-1227	miR-3692*
miR-106b	miR-210	miR-1228*	miR-371-5p
miR-107	miR-218	miR-1229	miR-374c
miR-10b	miR-222	miR-1234	miR-377
miR-1202	miR-328	miR-1237	miR-378c
miR-1207-5p	miR-340	miR-1238	miR-381
miR-1225-5p	miR-378	miR-125a-3p	miR-382
miR-125a-5p	miR-424	miR-125b-2*	miR-3907
miR-125b	miR-425	miR-126*	miR-3911
miR-126	miR-572	miR-1271	miR-3917
miR-1260	miR-575	miR-1273e	miR-3926
miR-1260b	miR-630	miR-127-3p	miR-3934
miR-1268	miR-660	miR-1287	miR-3935
miR-1274a	miR-663	miR-129*	miR-3940
miR-1274b	miR-762	miR-1290	miR-409-3p
miR-1280	miR-766	miR-129-3p	miR-424*
miR-130a	miR-939	miR-1296	miR-425*
miR-133b	miR-940	miR-1305	miR-4257
miR-141	miR-1228	miR-1306	miR-4261
miR-142-3p	miR-1246	miR-130b	miR-4274
miR-143	miR-1249	miR-132*	miR-4310
miR-145	miR-1275	miR-135a*	miR-4312
miR-148a	miR-1281	miR-135a*	miR-4313

S6 lentelė. Tęsinys.

Aukšta raiška (N = 118)	Vidutiniška raiška (N = 93)	Žema raiška (N = 239)	
miR-150	miR-1825	miR-135b	miR-4317
miR-151-5p	miR-1973	miR-136	miR-432
miR-15a	miR-3141	miR-136*	miR-4323
miR-15b	miR-3195	miR-139-5p	miR-4327
miR-16	miR-3198	miR-141*	miR-4328
miR-17	miR-4254	miR-144	miR-449b*
miR-1915	miR-4270	miR-1471	miR-449c*
miR-193a-3p	miR-4271	miR-148a*	miR-454
miR-195	miR-4290	miR-150*	miR-454*
miR-196b	miR-4291	miR-153	miR-455-5p
miR-197	miR-4298	miR-1539	miR-466
miR-199a-3p	miR-4306	miR-154	miR-484
miR-199a-5p	miR-4324	miR-16-2*	miR-487b
miR-199b-5p	miR-10a	miR-17*	miR-491-3p
miR-19a	miR-133a	miR-181b	miR-495
miR-19b	miR-140-3p	miR-181c	miR-500a*
miR-200a	miR-140-5p	miR-181c*	miR-501-3p
miR-200b	miR-142-5p	miR-181d	miR-502-3p
miR-200c	miR-143*	miR-182	miR-505
miR-205	miR-145*	miR-18a	miR-512-3p
miR-20a	miR-146a	miR-18b	miR-513a-5
miR-20b	miR-146b-5p	miR-1909*	miR-514b-3
miR-21	miR-148b	miR-191*	miR-514b-5
miR-21*	miR-151-3p	miR-1914*	miR-532-3p
miR-214	miR-181a	miR-192	miR-539
miR-22	miR-188-5p	miR-193a-5p	miR-550a
miR-221	miR-193b	miR-194	miR-557
miR-223	miR-28-5p	miR-195*	miR-563
miR-23a	miR-29c*	miR-1972	miR-564
miR-23b	miR-30a*	miR-19b-1*	miR-595
miR-24	miR-30e*	miR-200a*	miR-598
miR-25	miR-32*	miR-200b*	miR-602
miR-26a	miR-324-5p	miR-202	miR-605
miR-26b	miR-338-3p	miR-203	miR-609
miR-27a	miR-34b*	miR-205*	miR-615-3p
miR-27b	miR-3663-3p	miR-206	miR-622
miR-2861	miR-3679-5p	miR-20a*	miR-623

S6 lentelė. Tęsinys.

Aukšta raiška (N = 118)	Vidutiniška raiška (N = 93)	Žema raiška (N = 239)	
miR-29a	miR-376a	miR-2116*	miR-629*
miR-29b	miR-376c	miR-212	miR-631
miR-29c	miR-423-5p	miR-214*	miR-634
miR-30a	miR-455-3p	miR-215	miR-647
miR-30b	miR-483-3p	miR-219-5p	miR-650
miR-30c	miR-483-5p	miR-22*	miR-652
miR-30d	miR-485-3p	miR-221*	miR-654-3p
miR-30e	miR-532-5p	miR-224	miR-663b
miR-3162	miR-582-5p	miR-224*	miR-664
miR-3196	miR-590-5p	miR-2276	miR-664*
miR-320a	miR-642b	miR-2278	miR-665
miR-320b	miR-885-5p	miR-23b*	miR-670
miR-320c	miR-99b	miR-23c	miR-671-5p
miR-320d	ebv-miR-BART12	miR-24-1*	miR-7
miR-320e	ebv-miR-BART13	miR-28-3p	miR-7-1*
miR-324-3p	hsv1-miR-H1*	miR-296-5p	miR-718
miR-331-3p	hsv1-miR-H18	miR-299-5p	miR-744
miR-342-3p	hsv1-miR-H6-3p	miR-29b-1*	miR-744*
miR-34a	hsv2-miR-H24	miR-300	miR-760
miR-361-5p	hsv2-miR-H25	miR-301a	miR-764
miR-363	hsv2-miR-H6	miR-30b*	miR-765
miR-365	hsv2-miR-H6*	miR-30c-2*	miR-769-5p
miR-3651		miR-31	miR-874
miR-3653		miR-3125	miR-877*
miR-3656		miR-3127	miR-885-3p
miR-3665		miR-3137	miR-887
miR-374a		miR-3138	miR-92b
miR-374b		miR-3148	miR-933
miR-375		miR-3154	miR-937
miR-4281		miR-3156	miR-95
miR-4284		miR-3180-5	miR-99a*
miR-4286		miR-3188	hsv1-miR-H1
miR-429		miR-3194	hsv1-miR-H15
miR-4299		miR-32	hsv1-miR-H17
miR-451		miR-335	hsv1-miR-H6-5p
miR-494		miR-335*	hsv1-miR-H7*
miR-497		miR-337-5p	hsv1-miR-H8

S6 lentelė. Tęsinys.

Aukšta raiška (N = 118)	Vidutiniška raiška (N = 93)	Žema raiška (N = 239)	
miR-574-3p		miR-339-3p	hsv2-miR-H22
miR-574-5p		miR-33a	hsv2-miR-H7-3p
miR-638		miR-33b*	hsv2-miR-H9-3p
miR-720		miR-340*	kshv-miR-K12-1
miR-92a		miR-342-5p	kshv-miR-K12-10a*
miR-93		miR-34a*	kshv-miR-K12-12*
miR-96		miR-34b	kshv-miR-K12-8*
miR-99a		miR-3607-3p	ebv-miR-BART16
hsv2-miR-H10		miR-3613-3p	ebv-miR-BART20-5p
kshv-miR-K12-3		miR-361-3p	hcmv-miR-UL70-3p
		miR-3614-5p	hiv1-miR-H1
		miR-3620	

S7 lentelė. Visuminės miRNR analizės metu nustatytos statistškai reikšmingos sąsajos tarp miRNR raiškos ir klinikinių-patologinių prostatos vėžio rodiklių

Biocheminė ligos progresija (Taip vs. Ne)					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
hsa-miR-650	17,1	1,00E-03	hsa-miR-149	1,7	0,002
hsa-miR-3692*	40,8	0,004	hsa-miR-4312	1,6	0,013
hsv1-miR-H1	21,8	0,006	hsa-miR-451	1,7	0,040
hsa-miR-885-3p	17,6	0,006			
hiv1-miR-H1	1,6	0,007			
hsa-miR-623	13,2	0,009			
hsa-miR-1180	15,1	0,009			
hsa-miR-29b-1*	8,7	0,010			
hsv2-miR-H6	1,6	0,020			
hsa-miR-206	15,7	0,021			
hsa-miR-3926	17,2	0,029			
hsa-miR-3127	10,7	0,032			
hsa-miR-514b-3p	12,8	0,035			
hsa-miR-378c	10,6	0,036			
hsa-miR-382	7,8	0,039			
hsa-miR-3917	12,0	0,040			
hsa-miR-3934	11,4	0,041			
hsa-miR-760	7,5	0,041			
hsa-miR-3154	9,4	0,042			
hsa-miR-3137	10,3	0,042			
hsa-miR-622	9,3	0,043			
hsa-miR-2276	11,5	0,043			
hsa-miR-215	10,5	0,048			
Gleason balas G7 vs. G6					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
hsa-miR-3647-5p	59,4	0,001	hsa-miR-1275	1,6	0,003
hsa-miR-491-3p	17,6	0,007	hsa-miR-130b	2,6	0,010
kshv-miR-K12-12*	15,7	0,021	hsa-miR-3198	1,6	0,018
hsv2-miR-H6*	3,5	0,024	hsa-miR-3653	1,5	0,031
hsa-let-7d*	7,3	0,027	hsa-miR-512-3p	27,0	0,038
hsa-miR-3940	43,0	0,031	hsa-miR-92b	12,4	0,039
hsv2-miR-H9-3p	9,8	0,035	hsa-miR-129-3p	15,4	0,041
hsa-miR-466	11,0	0,043	hsa-miR-575	1,8	0,042
hsa-miR-483-3p	1,9	0,044	hsa-miR-744	15,1	0,046

S7 lentelė. Tęsinys.

Gleason balas G7 vs. G6					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
hsa-miR-485-3p	1,9	0,045			
hsa-miR-4290	1,8	0,045			
hsa-miR-3935	9,2	0,047			
Naviko stadija pT3 vs. pT2					
Padidėjusi raiška	FC	P vertė	Sumažėjusi raiška	FC	P vertė
hsa-miR-16-2*	15,5	<0,001	hsa-miR-451	1,8	0,016
hsa-miR-215	36,3	<0,001	hsv2-miR-H22	1,5	0,024
hsa-miR-409-3p	34,4	1,00E-03	hsa-miR-1825	1,6	0,03
hsa-miR-340*	22,5	1,00E-03	hsa-miR-1296	12,1	0,031
hsa-miR-185	1,6	0,003	hsa-miR-449b*	13,2	0,034
hsa-miR-539	15,2	0,003	hsv1-miR-H1*	1,9	0,038
hsa-miR-181c*	26,8	0,004	hsa-miR-1281	1,6	0,04
hsa-miR-21	1,5	0,004	hsa-miR-609	8,7	0,041
hsa-miR-432	17,2	0,006	hsa-miR-205	1,7	0,042
hsa-miR-3692*	39,8	0,006	hsa-miR-4254	2	0,043
hsa-miR-206	20,4	0,012	hsa-miR-3647-5p	12,6	0,044
hsa-miR-484	1,6	0,013	hsa-miR-483-3p	1,8	0,044
hsa-miR-4317	15	0,013	hsa-miR-885-5p	2	0,045
hsa-miR-337-5p	18,8	0,014	hsa-miR-764	16,3	0,046
hsa-miR-342-5p	13,3	0,016	hsa-miR-328	1,8	0,047
hsa-miR-1306	18,3	0,018	hsa-miR-485-3p	1,7	0,048
hsa-miR-885-3p	13,4	0,02			
hsv1-miR-H1	15,1	0,025			
hsa-miR-1271	10,2	0,025			
hsa-miR-142-5p	1,8	0,028			
hsa-miR-142-3p	1,7	0,032			
hsa-miR-301a	1,5	0,032			
hsa-miR-95	14	0,033			
hsa-miR-501-3p	7,4	0,035			
hsa-let-7a*	6,6	0,037			
hsa-miR-28-3p	6,5	0,038			
hsa-miR-146a	1,7	0,038			
hsa-miR-514b-5p	12,7	0,042			
hsa-miR-513a-5p	11,5	0,049			

Santrumpos: FC – raiškos skirtumas kartais

S8 lentelė. Kastracijai atspariu prostatos vėžiu sergančių ligonių klinikinės-patologinės charakteristikos miRNR tiriant šlapime

Rodiklis	Vertė
KAPV ligoniai, N	22
Amžiaus mediana PV diagnozės metu, m. (IQR)	66,5 (12,3)
Amžiaus mediana KAPV diagnozės metu, m. (IQR)	71,3 (9,1)
ISUP grupė (biopsijos medžiaga)	
≤2; N (%)	13 (59,1)
3; N (%)	0 (0,0)
≥4; N (%)	8 (36,4)
Nežinoma; N (%)	1 (4,5)
Naviko stadija (biopsijos medžiaga, cT)	
≤2; N (%)	9 (40,9)
≥3; N (%)	13 (59,1)
Nežinoma; N (%)	-
Radikalus gydymas	
Taip; N (%)	11 (50,0)
Ne; N (%)	11 (50,0)
Teigiamo atsako į ADT mediana, mėn. (IQR)	40,5 (58,0)
Kaulų metastazės prieš AA	
Taip; N (%)	20 (90,9)
Ne; N (%)	1 (4,5)
Nežinoma; N (%)	1 (4,5)
Metastazės organuose prieš AA	
Taip; N (%)	8 (36,4)
Ne; N (%)	14 (63,6)
PSA prieš AA mediana, ng/mL (IQR)	48,5 (166,2)
Gydymas AA	
I eilė; N (%)	19 (86,4)
II eilė (po DTX); N (%)	3 (13,6)
PFS mediana, mėn (IQR)	6,1 (3,8)
OS mediana, mėn. (IQR)	15,9 (13,4)

Santrumpos: AA – abiraterono acetatas; ADT – androgenų deprivacijos terapija; DTX – docetakselis; IQR – kvartilinis plotis; ISUP – angl. International Society of Urological Pathology; KAPV – kastracijai atsparus prostatos vėžys; OS – bendrasis išgyvenamumas; PFS – išgyvenamumas be progresijos; PSA – prostatai specifinis antigenas

S9 lentelė. Išgyvenamumui be progresijos ir bendrajam išgyvenamumui įtaką darančių pavienių (angl. univariate) ir visų rodiklių (angl. multivariate) santykinės rizikos įvertinimas Cox regresijos metodu

Pavienių rodiklių analizė					
Rodiklis		PFS		OS	
		HR (95% CI)	P vertė	HR (95% CI)	P vertė
Tolyd.	miR-148a	0,96 (0,58–1,57)	0,859	1,04 (0,57–1,88)	0,900
	miR-365	1,17 (0,59–2,33)	0,654	1,11 (0,61–2,04)	0,730
	miR-375	0,99 (0,73–1,34)	0,935	0,75 (0,56–1,02)	0,068
	miR-429	1,00 (0,61–1,64)	0,997	1,67 (1,07–2,61)	0,024
Skirst.	miR-148a	0,45 (0,13–1,54)	0,206	0,44 (0,16–1,21)	0,113
	miR-365	1,23 (0,38–4,01)	0,735	1,32 (0,49–3,56)	0,590
	miR-375	0,84 (0,26–2,74)	0,774	0,38 (0,14–1,05)	0,063
	miR-429	2,23 (0,65–7,64)	0,206	1,75 (0,65–4,71)	0,273
Visų rodiklių analizė					
Modelis		Rodiklis	HR (95% CI)	Rodiklio P vertė	Mod. P vertė
Skirst.	PFS	miR-148a	0,10 (0,01–0,83)	0,034	0,142
		miR-365	0,32 (0,09–1,20)	0,093	
		miR-429	0,19 (0,03–1,40)	0,106	
	OS	miR-375	0,41 (0,15–1,14)	0,090	0,060
		miR-148a	0,48 (0,17–1,34)	0,164	

Santrumpos: CI – pasikliautinis intervalas; HR – santykinė rizika; mod. – modelis; OS – bendrasis išgyvenamumas; PFS – išgyvenamumas be progresijos; skirst. – suskirstytas dydis; tolyd. – tolydus dydis. Paryškintos P vertės yra statistiškai reikšmingos ($P \leq 0,050$).

S10 lentelė. Koreliacijos tarp androgenų receptoriaus (AR-FL) ir AR variantų (AR-V)

rho; P vertė	AR-FL	AR-V1	AR-V3	AR-V7
AR-FL	-			
AR-V1	0,17; 0,019	-		
AR-V3	0,23; 0,002	0,18; 0,015	-	
AR-V7	0,17; < 0,001	0,18; 0,019	0,31; < 0,001	-

Santrumpos: rho – *Spearman* koreliacijos koeficientas.

S11 lentelė. Išgyvenamumui be progresijos ir bendrajam išgyvenamumui įtaką darančių pavienių (angl. univariate) ir visų rodiklių (angl. multivariate) santykinės rizikos įvertinimas Cox regresijos metodu

IŠGYVENAMUMAS BE PROGRESIJOS									
Veiksny		Pavienių rodiklių analizė		Visų rodiklių analizė (atgalinė atranka)					
		HR (95% CI)	P vertė	Atskirai grupėje		Visi kartu			
				HR (95% CI)	P vertė	HR (95% CI)	P vertė		
Tolyd.	AR–FL	1,46 (1,12–1,90)	0,006	1,41 (1,08–1,86)	0,012	1,55 (1,07–2,23)	0,020		
	AR–V1	1,05 (1,01–1,08)	0,022	1,04 (1,00–1,08)	0,053				
	AR–V3	1,00 (0,97–1,03)	0,950						
	AR–V7	1,01 (0,97–1,04)	0,752						
Skirst.	AR–FL	2,37 (1,37–4,09)	0,002	2,37 (1,37–4,09)	0,002				
	AR–V1	1,37 (0,99–1,92)	0,062						
	AR–V3	1,46 (0,66–3,23)	0,351						
	AR–V7	1,06 (0,59–1,91)	0,838						
Klinikiniai-patologiniai	PSA prieš AA (ng/mL)	1,00 (1,00–1,00)	0,033			1,83 (0,95–3,53)	0,072		
	ISUP grupė (≤3 vs. ≥4)	2,05 (1,11–3,77)	0,022						
	Metastazės prieš AA (taip/ne):								
	Kaulinės	1,90 (0,86–4,19)	0,115						
	Visceralinės	1,76 (0,75–4,12)	0,194						
	Sritiniuose limfmazgiuose	0,83 (0,46–1,51)	0,553						
	Ne sritiniuose limfmazgiuose	0,72 (0,36–1,43)	0,355						
	Metastatinės ligos apimtis (did./maž.)	1,39 (0,80–2,41)	0,244						
	Radikalus gydymas (taip/ne)	0,81 (0,47–1,38)	0,437						
	Teigiamas atsakas į ADT (mėn.)	0,99 (0,99–1,00)	0,121	1,00 (1,00–1,00)	0,012				
	AA II eilės gydymui po DXT (taip/ne)	1,80 (0,93–3,50)	0,083	2,94 (1,48–5,84)	0,002			2,88 (1,41–5,86)	0,004

S11 lentelė. Tęsinys.

BENDRASIS IŠGYVENAMUMAS							
Veiksny		Pavienių rodiklių analizė		Visų rodiklių analizė (atgalinė atranka)			
		HR (95% CI)	P vertė	Atskirai grupėje		Visi kartu	
				HR (95% CI)	P vertė	HR (95% CI)	P vertė
Tolyd.	AR-FL	1,58 (1,22–2,04)	<0,001	1,58 (1,22–2,05)	<0,001	2,27 (1,21–4,24)	0,011
	AR-V1	1,04 (1,01–1,08)	0,016	1,04 (1,00–1,08)	0,016		
	AR-V3	1,04 (1,01–1,07)	0,011				
	AR-V	1,02 (0,99–1,05)	0,256				
Skirst.	AR-FL	2,82 (1,61–4,94)	<0,001	2,74 (1,56–4,80)	<0,001		
	AR-V1	1,40 (1,04–1,90)	0,028	1,35 (1,00–1,83)	0,053		
	AR-V3	2,61 (1,40–4,88)	0,003				
	AR-V7	1,50 (0,86–2,63)	0,157				
Klinikiniai-patologiniai	PSA prieš AA (ng/mL)	1,00 (1,00–1,00)	<0,001	1,00 (1,00–1,00)	<0,0001	1,00 (1,00–1,00)	0,004
	ISUP grupė (≤3 vs. ≥4)	1,89 (1,08–3,31)	0,027				
	Metastazės prieš AA (taip/ne):						
	Kaulinės	2,27 (0,91–5,68)	0,080				
	Visceralinės	1,43 (0,65–3,14)	0,381				
	Sritiniuose limfmazgiuose	1,20 (0,68–2,09)	0,531				
	Ne sritiniuose limfmazgiuose	0,74 (0,37–1,46)	0,389				
	Metastatinės ligos apimtis (did./maž.)	1,57 (0,89–2,77)	0,125				
	Radikalus gydymas (taip/ne)	0,48 (0,27–0,85)	0,013				
	Teigiamas atsakas į ADT (mėn.)	1,00 (0,99–1,00)	0,210				
AA II eilės gydymui po DXT (taip/ne)	1,00 (0,47–2,12)	0,996			0,56 (0,30–1,05)	0,074	

Santrumpos: AA – abiraterono acetatas; ADT – androgenų deprivacijos terapija; AR-FL – androgenų receptoriaus variantas; DTX – docetakselis; HR – santykinė rizika; ISUP – angl. *International Society of Urological Pathology*; mod. – modelis; OS – bendrasis išgyvenamumas; PFS – išgyvenamumas be progresijos; skirst. – suskirstytas dydis; tolyd. – tolydus dydis. Paryškintos P vertės yra statistiškai reikšmingos ($P \leq 0,050$).

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Ši disertacija buvo parengta remiantis sąraše pateiktomis autentiškomis publikacijomis (4 straipsniai). Autorės indėlis: autorė parašė 1-4 publikacijas, atliko visus pagrindinius epigenetinius tyrimus.

Publikacijos, išspausdintos žurnaluose, turinčiuose cituojamumo rodiklį (IF) ir priklausančiuose *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėms:

1. **Stuopelyte K**, Daniunaite K, Bakavicius A, Lazutka JR, Jankevicius F, Jarmalaite S. The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *Br J Cancer*. 2016a;115(6):707-15.
2. **Stuopelytė K**, Daniūnaitė K, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Kaunas)*. 2016b;52(2):116-24.
3. **Stuopelyte K**, Sabaliauskaite R, Bakavicius A, Haflidadóttir BS, Visakorpi T, Väänänen RM, Patel C, Danila DC, Lilja H, Lazutka JR, Ulys A, Jankevicius F, Jarmalaite S. Analysis of AR-FL and AR-V1 in whole blood of patients with castration resistant prostate cancer as a tool for predicting response to abiraterone acetate. *J Urol*. 2020:101097JU00000000000000803. [Epub ahead of print].

Parengta publikacija bus išsiųsta į žurnalą, turintį IF ir priklausančią *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėms:

4. **Stuopelyte K**, Sestokaite A, Bakavicius A, Lazutka JR, Ulys A, Jankevicius F, Jarmalaite S. A pilot study of urinary miRNAs as predictors of response to AA treatment. *Parengtas rankraštis*.

Kitos publikacijos, tiesiogiai nesisiejančios su doktorantūros tema, tačiau išspausdintos žurnaluose, turinčiuose IF ir priklausančiuose *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėms:

1. Kettunen E, Hernandez-Vargas H, Cros MP, Durand G, Le Calvez-Kelm F, **Stuopelyte K**, Jarmalaite S, Salmenkivi K, Anttila S, Wolff H, Herceg Z, Husgafvel-Pursiainen K. Asbestos-associated genome-wide DNA methylation changes in lung cancer. *Int J Cancer*. 2017;141(10):2014–29.
2. Gyvyte U, Juzenas S, Salteniene V, Kupcinskas J, Poskiene L, Kucinskas L, Jarmalaite S, **Stuopelyte K**, Steponaitiene R, Hemmrich-Stanisak G,

Hübenthal M, Link A, Franke S, Franke A, Pangonyte D, Lesauskaite V, Kupcinskas L, Skieceviciene J. MiRNA profiling of gastrointestinal stromal tumors by next-generation sequencing. *Oncotarget*. 2017;8(23):37225–38.

3. **Stuopelytė K**, Daniūnaitė K, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Jarmalaitė S. High-resolution melting-based quantitative analysis of RASSF1 methylation in breast cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2013;49(2):78–83.

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 10 egz.