

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Arnas
BAKAVIČIUS

Klinikinių ir molekulinų žymenų
reikšmė priešoperacinėje
prostato vėžio diagnostikoje

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai,
Medicina (M 001)

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2015–2019 m. Vilniaus universitete.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba, Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas.

Mokslinis vadovas

Prof. dr. **Feliksas Jankevičius** (Vilniaus universitetas,
Medicinos ir sveikatos mokslai, Medicina – M 001)

Mokslinė konsultantė

Prof. dr. **Sonata Jarmalaitė** (Vilniaus universitetas,
Gamtos mokslai, Biologija – N 010)

VILNIUS UNIVERSITY

Arnas
BAKAVIČIUS

The Value of Clinical and Molecular Markers in Preoperative Diagnosis of Prostate Cancer

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health Sciences,
Medicine (M 001)

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2015 and 2019 at Vilnius University. The research was supported by Research Council of Lithuania, Lithuanian State Science and Studies Foundation, Vilnius University Faculty of Medicine.

Academic supervisor

Prof. **Feliksas Jankevičius**, PhD (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001)

Academic consultant

Prof. **Sonata Jarmalaitė**, PhD (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010)

TURINYS

1. SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	7
2. ĮVADAS	8
2.1. Darbo aktualumas	8
2.2. Darbo tikslas	9
2.3. Darbo uždaviniai	9
2.4. Darbo naujumas ir praktinė reikšmė	10
2.5. Disertacijos ginamieji teiginiai	10
3. LITERATŪROS APŽVALGA	11
3.1. Prostatos vėžys	11
3.1.1. Prostatos vėžio epidemiologija	11
3.1.2. Prostatos vėžio etiopatogenezė	12
3.1.3. Prostatos vėžio agresyvumo vertinimas	13
3.1.4. Prostatos vėžio išplitimo vertinimas	15
3.1.5. Prostatos vėžio rizikos vertinimas	16
3.2. Epigenetiniai prostatos vėžio žymenys	17
3.2.1. Glutationo S-transferazės pi 1 klasės genas (<i>GSTP1</i>)	19
3.2.2. Ras sąveikos domeną turinčių baltymų 1 šeimos genas (<i>RASSF1</i>)	25
3.2.3. Retinoinės rūgšties receptoriaus β genas (<i>RARβ</i>)	28
4. DARBO METODOLOGIJA	31
4.1. Įtraukimo kriterijai	31
4.2. Atmetimo kriterijai	31
4.3. Klinikiniai ir pataloginiai duomenys	31
4.3.1. Klinikinių ir pataloginių duomenų rinkimas	31
4.3.2. Agresyvumo, stadijos ir rizikos grupės pasikeitimas	32
4.3.3. Teigiamas chirurginis kraštas ir biocheminis ligos atkrytis	33
4.3.4. Laikas iki metastazių, bendrasis ir prostatos vėžio specifinis išgyvenamumas	33
4.4. Biologiniai mėginiai ir jų molekulinė analizė	33
4.4.1. Biologinių mėginių rinkimas ir paruošimas	33
4.4.2. Biologinių mėginių molekulinė analizė	34
4.5. Rezultatų vertinimas matematinės statistikos metodais	35
4.6. Doktoranto ir kitų tyrėjų indėlis	36

5.	TYRIMO REZULTATAI	38
5.1.	Tiriamųjų bendrosios charakteristikos	38
5.2.	Prostatos vėžio agresyvumo, stadijos ir rizikos pasikeitimas. . .	40
5.3.	Teigiamas chirurginis kraštas	42
5.4.	Biocheminis ligos atkrytis	42
5.5.	Tolimosios metastazės ir laikas iki metastazių atsiradimo.	46
5.6.	Bendrasis ir prostatos vėžio specifinis išgyvenamumas.	48
5.7.	DNR metilimas prostatos audiniuose	51
5.8.	DNR metilimas šlapimo mėginiuose.	52
5.9.	DNR metilimas šlapime ir prostatos vėžio agresyvumas	53
5.10.	DNR metilimas šlapime ir prostatos vėžio išplitimas.	60
5.11.	DNR metilimas šlapime ir prostatos vėžio rizika	65
6.	REZULTATŲ APTARIMAS	69
7.	IŠVADOS	74
8.	REKOMENDACIJOS	75
9.	PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS	76
9.1.	Straipsniai disertacijos tema.	76
9.2.	Pranešimai disertacijos tema	76
10.	FINANSINĖ PARAMA.	78
11.	<i>CURRICULUM VITAE</i>	79
12.	PADĖKA	82
13.	LITERATŪROS SĄRAŠAS	83
14.	PRIEDAI	100

1. SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

CI	– pasikliautinis intervalas, angl. <i>confidence interval</i>
cISUP	– klinikinis ISUP balas
cTNM	– klinikinė TNM stadija
DNR	– deoksiribonukleorūgštis
EAU	– Europos urologų asociacija, angl. <i>European Association of Urology</i>
<i>GSTP1</i>	– glutationo S-transferazės pi 1 klasės genas, angl. <i>glutathione S-transferase pi 1</i>
iRNR	– baltymą koduojanti informacinė ribonukleorūgštis
ISUP	– Tarptautinė urologinės patologijos draugija, angl. <i>International Society of Urological Pathology</i>
NCCN	– Jungtinių Amerikos Valstijų vėžio draugija, angl. <i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NPV	– neigiama prognostinė vertė
OR	– šansų santykis, angl. <i>odds ratio</i>
PB	– prostatos biopsija
PIN	– prostatos intraepitelinė neoplazija, angl. <i>prostate intraepithelial neoplasia</i>
pISUP	– patologinis ISUP balas
PGR	– polimerazinė grandininė reakcija
PSA	– prostatos specifinis antigenas
pTNM	– patologinė TNM stadija
PV	– prostatos vėžys
<i>RARβ</i>	– retinoinės rūgšties receptoriaus β genas, angl. <i>retinoic acid receptor β</i>
<i>RASSF1</i>	– Ras sąveikos domeną turinčių baltymų 1 šeimos genas, angl. <i>RAS association domain family member 1</i>
RP	– radikali prostatektomija
TFS	– „Thermo Fisher Scientific“
TNM	– TNM klasifikacijos sistema, angl. <i>Tumour, Node, Metastasis</i>
TURP	– transuretrinė prostatos rezekcija
TPV	– teigiama prognostinė vertė
VPC	– Valstybinis patologijos centras
VUL SK	– Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

2. ĮVADAS

2.1. Darbo aktualumas

Prostatos (priešinės liaukos) vėžys (PV) – antras pagal dažnumą vyrų onkologinis susirgimas pasaulyje ir pirmas pagal dažnumą Šiaurės Amerikoje, Europoje ir Lietuvoje [1]. Tai ypač heterogeniška liga, galinti pasireikšti nuo lėtai progresuojančio lokalaus naviko iki ypač agresyvaus sistemiškai išplitusio PV, sąlygojančio letalines ligonių išeitis [2–4]. Tikslus ligos agresyvumo vertinimas – vienas svarbiausių klinicisto uždavinių, lemiantis tinkamą gydymo taktikos pasirinkimą. Tai ypač aktualu šiuolaikinės modernios medicinos laikotarpiu, kai daugeliui naujai diagnozuojamų PV atvejų būdingi prostatoje apriboti žemos ir vidutinės rizikos piktybiniai pakitimai, o židininė terapija kasdienėje klinikinėje praktikoje tampa standartiniu gydymo metodu [5].

Prostatos biopsijos (PB) metu nustatytas ISUP balas (cISUP), klinikinė ligos TNM stadija (cTNM) ir kraujo prostatos specifinio antigeno (PSA) kiekis – pagrindiniai klinikiniai ir pataloginiai rodikliai, lemiantys PV gydymo taktikos pasirinkimą. Mokslinės literatūros duomenimis, po chirurginio gydymo net 40–60 proc. ligonių stebimas ligos agresyvumo ir stadijos pasikeitimas [6–9]. Ligoniams, kuriems po taikyto gydymo nustatomas ligos stadijos ir (ar) agresyvumo padidėjimas, planuojant gydymą galėjo būti pasirinktas nepakankamai efektyvus gydymo metodas, lėmęs neigiamus PV onkologinius rezultatus. Mokslinėje literatūroje paskelbta įrodymų apie PV stadijos ir agresyvumo padidėjimo ryšį su didesniu biocheminio ligos atkryčio dažniu [10] ir blogesniais PV specifinio išgyvenamumo rodikliais [6]. Kita vertus, PV ligoniams, kuriems ligos stadija ir (ar) agresyvumas po taikyto gydymo sumažėjo, galėjo būti pasirinktas perteklinis gydymo būdas, susijęs su didesne komplikacijų rizika ir blogesniais funkciniais rodikliais.

Naujausi genetikos ir epigenetikos sričių pasiekimai ir giliau suvokiama molekulinė kancerogenezė atvėrė naujų diagnostikos galimybių PV sergantiems ligoniams. Vystantis PV, nustatoma pakitimų deoksiribonukleorūgščių (DNR) grandinėse ir epigenetinių pokyčių, kurių metu DNR seka nekinta, tačiau sutrinka normali genų raiška [11]. Epigenetinių pakitimų nustatoma ankstyvosiose kancerogenezės stadijose, jiems būdingas didesnis stabilumas, tad šie pakitimai tapo ypač patraukliu mokslinių tyrimų objektu [12].

Dauguma PV vystymosi metu nustatomų epigenetinių pokyčių susiję su metilimo pakitimais genų reguliacinėse srityse (pvz., promotorių

regionuose). Tai lemia baltymus koduojančių (informacinių) ribonukleorūgščių (iRNR) praradimą ir baltymų sintezės slopinimą [13, 14]. PV specifiskų DNR metilinimo pakitimų nesunkiai aptinkama organizmo skysčiuose (kraujyje, šlapime ir kt.), o organizme cirkuliuojančios naviko nukleorūgštys atspindi visų PV židinių genetinius ir epigenetinius pokyčius, todėl pastarųjų analizė leidžia tiksliai įvertinti ypač heterogeniškos prigimties PV ir tinkamai prognozuoti ligos agresyvumą bei klinikinę elgseną [15–17].

2.2. Darbo tikslas

Disertacijos tikslas – įvertinti šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojamų klinikinių ir pataloginių rodiklių tinkamumą PV diagnostikai bei iširti PV epigenetinį profilį ir įvertinti molekulinį žymenų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) potencialą savalaiki ir tiksliai diagnozei nustatyti.

2.3. Darbo uždaviniai

1. Remiantis pirminės prostatos biopsijos ir operacinės medžiagos histologinių tyrimų rezultatais, įvertinti klinikinėje praktikoje naudojamų klinikinių ir pataloginių rodiklių (cISUP balas, cTNM stadija ir priešoperacinis PSA) tinkamumą PV agresyvumui, išplitimui ir rizikos grupei nustatyti.
2. Remiantis operacinės medžiagos histologinių tyrimų rezultatais, pooperaciniu PSA, pooperaciniais radiologiniais tyrimais (kaulų scintigrafija, kompiuterine tomografija, magnetinio rezonanso tomografija) bei Mirties atvejų ir jų priežasčių valstybės registro duomenimis, nustatyti teigiamo chirurginio krašto ir biocheminio ligos atkryčio dažnį, laiką iki kaulinių ir (ar) minkštųjų audinių metastazių atsiradimo, bendrąjį ir PV specifinį išgyvenamumą bei įvertinti PV agresyvumo ir stadijos padidėjimo įtaką minėtiems rodikliams.
3. Nustatyti potencialių PV diagnostinių žymenų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) promotorių metilinimo dažnius normaliuose prostatos ir PV audiniuose.
4. Iširti *RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1* genų promotorių metilinimą dviejose nepriklausomose PV sergančių ligonių imtyse, kuriose šlapimo mėginiai surinkti skirtingais metodais – kateterizuojant ir pasišlapinus.
5. Įvertinti šlapime tirtų žymenų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) potencialą PV agresyvumui, ligos išplitimui ir rizikos grupei nustatyti bei parinkti tinkamiausią molekulinį žymenų bei klinikinių ir pataloginių rodiklių derinį savalaikiam ir tiksliam PV agresyvumo, išplitimo ir rizikos grupės nustatymui.

2.4. Darbo naujumas ir praktinė reikšmė

Didelė ir gerai charakterizuota, iš daugiau negu 1 000 tiriamųjų sudaryta kohorta, kuriai taikyta ilga pooperacinė stebėseną, leido tinkamai įvertinti šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojamų klinikinių ir pataloginių rodiklių (cISUP balas, cTNM stadija ir priešoperacinis PSA) diagnostinius trūkumus ir ryšį su teigiamu chirurginiu kraštu, biocheminiu ligos atkryčiu, laiku iki metastazių atsiradimo bei bendruoju ir PV specifiniu išgyvenamumu.

Mokslinėje literatūroje paskelbta daugiau kaip 100 genetinių pokyčių, susijusių su PV, tačiau dauguma jų tirti normaliuose prostatos ir prostatos karcinomos audiniuose bei menkai sietini su ligos agresyvumu, o tai ypač apriboja jų panaudojimą klinikinėje praktikoje.

Mūsų tyrimo metu *RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1* genų promotorių metilinimas tirtas lengvai pasiekiamoje biologinėje medžiagoje – šlapime. Šiai biologinei medžiagai surinkti nereikia papildomų intervencinių procedūrų; taip nesukeliama papildomų rizikų ligoniui ir molekulinis testas lengvai pritaikomas klinikinėje praktikoje. Tyrimo metu genetiniai žymenys tirti dviejose nepriklausomose imtyse, kuriose šlapimo mėginiai surinkti skirtingais metodais: kateterizuojant ir pasišlapinus. Tai leido palyginti skirtingus tiriamosios medžiagos surinkimo būdus. Tyrimo metu nustatyta kompleksinė tirtų molekulinų žymenų ir PSA reikšmė, leidžianti tiksliau prognozuoti PV agresyvumą, išplitimą ir rizikos grupę.

2.5. Disertacijos ginamieji teiginiai

1. Šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojami klinikiniai ir pataloginiai rodikliai (cISUP balas, cTNM stadija ir priešoperacinis PSA) nėra pakankamos diagnostinės priemonės PV agresyvumui, išplitimui ir rizikos grupei nustatyti.
2. PV agresyvumo ir stadijos padidėjimas yra susijęs su teigiamu chirurginiu kraštu, didesniu biocheminiu ligos atkryčiu, tolimosiomis metastazėmis, laiku iki metastazių atsiradimo ir blogesniais PV specifinio išgyvenamumo rodikliais.
3. *RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1* genų promotorių metilinimo dažniai patikimai skiriasi normaliuose prostatos ir PV audiniuose, todėl tinka PV diagnostikai.
4. *RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1* genų promotorių metilinimas šlapime derinamas su PSA gali būti naudojamas PV agresyvumui, išplitimui ir rizikos grupei vertinti.

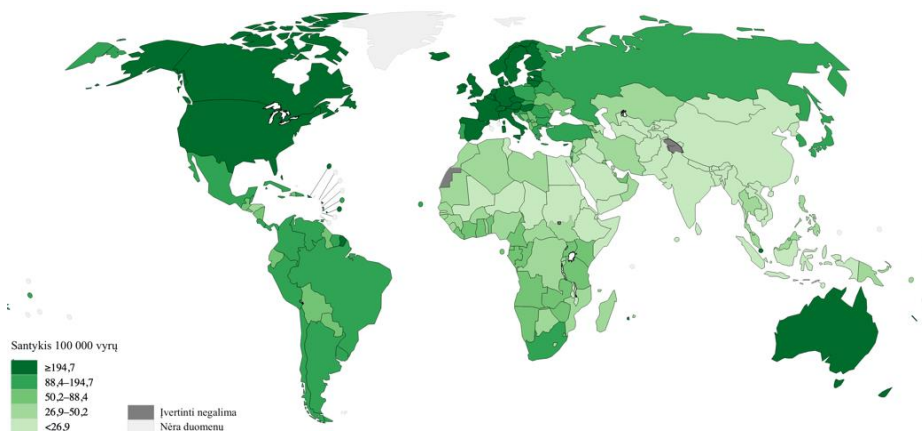
3. LITERATŪROS APŽVALGA

3.1. Prostatos vėžys

3.1.1. Prostatos vėžio epidemiologija

Kaip jau minėta, PV – antras pagal dažnumą vyrų onkologinis susirgimas pasaulyje (13,5 proc. visų vyrų onkologinių ligų) ir pirmas pagal dažnumą Šiaurės Amerikoje (18,4 %), Europoje (20,0 %) ir Lietuvoje (19,3 %). 2018 m. standartizuotas pagal amžių sergamumo rodiklis 100 000 vyrų Šiaurės Amerikoje siekė 73,7, Europoje – 62,1, Lietuvoje – 70,2, Azijoje – 11,5. Dėl ilgėjančios gyvenimo trukmės ir senėjančios populiacijos tikėtina, kad šis rodiklis ateityje didės.

Šiuo metu PV paplitimo rodiklis ypač aukštas Šiaurės Amerikoje ir Vakarų Europos valstybėse, įskaitant ir Lietuvą (5 m., 196/100 000 vyrų). Rytų Europos ir Azijos šalyse šis rodiklis gerokai mažesnis (1 pav.). Minėtina, kad, autopsijų duomenimis, skirtingų šalių PV paplitimo rodikliai smarkiau nesiskyrė. Tai liudija nevienodą klinikinį ligos pasireiškimą skirtinguose geografiniuose regionuose [18].



1 pav. Prostatos vėžio paplitimo per penkerius metus rodiklis pasaulyje (2018 m., visos amžiaus grupės. GLOBOCAN 2018, pritaikyta pagal prieigą internete: <<http://gco.iarc.fr/today>>)

Jaunesniems negu 30 m. vyrams PV nustatomas itin retai (< 5 %). Kiekvienas gyvenimo dešimtmetis tikimybę susirgti PV didina 1,7 šansų santykiu. Sulaukus 80 m., PV nustatomas net 59 proc. vyrų [19].

Tarp vyrų onkologinių mirties priežasčių PV užima penktą vietą pasaulyje (6,7 proc. visų vyrų onkologinių mirties priežasčių), trečią vietą Šiaurės Amerikoje (8,9 %) ir Europoje (9,9 %), antrą vietą Lietuvoje (11,5 %). 2018 m. standartizuotas pagal amžių mirštamumo rodiklis 100 000 vyrų mūsų šalyje siekė 18,1 [1].

3.1.2. Prostatos vėžio etiopatogenezė

PV – daugiafaktorinė liga, kurios tiksli etiologija nėra žinoma. Manoma, kad PV kancerogenezeje svarbiausia genetinė predispozicija ir išoriniai veiksniai. Ligos genetinę prigimtį taip pat liudija pagrindiniai rizikos veiksniai – šeiminė anamnezė, rasė ir etninė kilmė [20, 21]. Didžioji dalis (85–91 %) naujų PV ligos atvejų priskiriami sporadiniams, o likę 9–15 proc. priklauso šeiminiam paveldėjimui. Atlikti genomino masto tyrimai patvirtino daugiau kaip 100 genų, susijusių su PV, galinčių paaiškinti 38,9 proc. ligos paveldėjimo [21–24]. Tiriant įvairius išorinius veiksnius, nustatytas ryšys tarp PV ir gausaus alkoholinių gėrimų bei baltyminių maisto produktų vartojimo, tabako rūkymo, lytiškai plintančių ligų, didelio ir mažo D vitamino koncentracijos kiekio, apsauginio fitoestrogenų poveikio ir kitų veiksnių [25–32].

Manoma, kad lėtinis uždegiminis procesas ir oksidacinis stresas, nuolat veikdami genetinę predispoziciją turinčias prostatos ląsteles, skatina genetinius ir epigenetinius pokyčius, kurie inicijuoja onkogenės pradžią – ląstelių su proliferacine uždegimine atrofija (angl. *proliferative inflammatory atrophy*) susidarymą. Iš pastarųjų susiformuoja atipinės ląstelės, kurios, išsklodos prostatos liaukinį audinį ir latakėlius, sudaro prostatos intraepitelinę neoplaziją (PIN, angl. *prostate intraepithelial neoplasia*). PIN laikoma PV pirmtaku dėl kelių priežasčių: 1) didžioji dalis (85 %) PIN židinių, kaip ir PV židinių (80–90 %), nustatomi prostatos periferinėje zonoje; 2) PV ligos atveju PIN židinių skaičius ir dydis smarkiai padidėja; 3) PIN židinių kiekis tiesiogiai susijęs su PV daugiažidiniškumu [33–38].

Dažniausias PV histologinis tipas (95 %) – liaukinė adenokarcinoma. Mucininė (0,2 %) ar duktalinė (0,4–0,8 %) adenokarcinomos nustatomos daug rečiau [39, 40]. Mokslinės literatūros duomenimis, mucininė adenokarcinoma savo agresyvumu nesiskiria nuo liaukinės adenokarcinomos, o duktalinė adenokarcinoma pasižymi agresyvesne klinicine elgsena bei blogesniais

išgyvenamumo rodikliais [41–43]. Kiti ypač reti, tačiau labai agresyvūs ligos histologiniai tipai: hormoniniam gydymui nejautrios neuroendokrininė ir mažų ląstelių karcinomos, sarkomatoidinė karcinoma, plokščialąstelinė karcinoma ir žiedinių ląstelių karcinoma [43]. Minėtina, kad mokslinėje literatūroje trūksta duomenų apie ypač retus PV histologinius tipus, o didžioji dalis PV klinikinių tyrimų susiję su liaukine adenokarcinoma, tad, kalbant apie PV bendrąją prasmę, dažniausiai turima omenyje prostatos liaukinė adenokarcinoma.

PV būdingas daugiažidiniškumas ir histologinis heterogeniškumas. Kancerogenezės metu priešinėje liaukoje susiformuoja vidutiniškai 2,0–2,7 skirtingi navikiniai židiniai [2, 3, 44]. Jiems būdinga skirtinga diferenciacija, tačiau keli skirtingos diferenciacijos komponentai gali būti aptinkami viename židinyje. Prostatoje vidutiniškai nustatomi 2,7 skirtingos diferenciacijos komponentai [2].

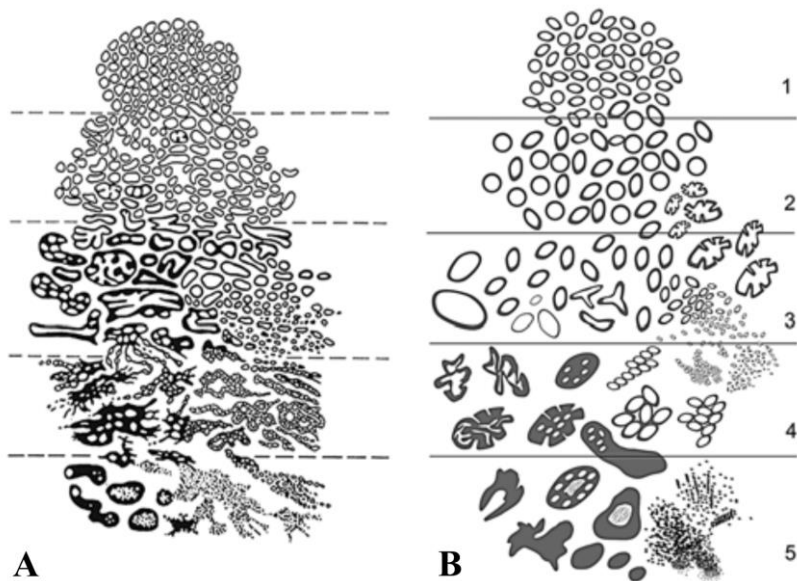
Į periprostatinius audinius PV dažniausiai plinta per dorsaliai esančias anatomines struktūras ir posterolateraliai per perineurinį tarpą. Toliau vietiskai plintantis navikas, ypač prostatos bazės srityje, gali infiltruoti sėklines pūsleles ir tiesiąją žarną. Retesniais atvejais sėklinių pūslelių invazija galima per sėklos išmetamuosius latakėlius (ypač duktalinės adenokarcinomos atveju) ar metastatiškai. Pagrindinės PV tolimųjų metastazių sritys: kaulai (įskaitant kaulų čiulpus; 84,4 %), tolimieji limfmazgiai (neįskaitant dubens limfmazgių; 10,6 %), kepenys (10,2 %), krūtinės organai (plaučiai, tarpuplautis ir pleura; 9,1 %), smegenys (galvos ir nugaros; 3,1 %), virškinamojo trakto organai (2,7 %), retroperitoninis tarpas (1,8 %), antinksčiai ir inkstai (1,0 %) [45].

3.1.3. Prostatos vėžio agresyvumo vertinimas

PV agresyvumui vertinti siūlytos net kelios sistemos (Andersono, Bockingo, Broderso, Mostofi, Mostofi-Schroederio ir kt.), tačiau plačiausiai paplitęs 1974 m. D. F. Gleasono sukurtas modelis [46–51].

Šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojama 2014 m. ISUP modifikuota Gleasono vertinimo sistema [52]. Ji grindžiama Gleasono skalės dviejų balų suma, kuri gali svyruoti nuo 2 iki 10 (2 žymi mažiausiai agresyvų, o 10 – agresyviausią naviką). Pirmasis Gleasono skalės balas žymi prostatos operacinėje medžiagoje ar PB stulpelyje pagal dydį dominuojantį naviką, kitas balas – antrą pagal dydį naviką. Kiekvienas Gleasono skalės balas gali svyruoti nuo 1 iki 5, priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio

(2 pav.). Jeigu prostatos operacinėje medžiagoje ar PB stulpelyje randamas tik vienos diferenciacijos navikas, Gleasono skalės balų suma apskaičiuojama pirmą Gleasono skalės balą padauginus iš dviejų. PB stulpelyje nustatčius tris ar daugiau skirtingų diferenciacijų navikus, Gleasono skalės balų suma sudaroma iš naviko, dominuojančio pagal dydį, bei blogiausios diferenciacijos naviko, neatsižvelgiant į pastarojo dydį. Tai netaikoma prostatos operacinei medžiagai, kai trečias ar kitas papildomas blogesnės diferenciacijos naviko židinytis pažymimas atskirai. Jei prostatos operacinėje medžiagoje ar PB stulpelyje dominuoja blogos diferenciacijos navikas (Gleasono skalės 4 ar 5 balas), o šalia jo randama geros diferenciacijos židinių, sudarančių < 5 proc. visų piktybinių pakitimų, šie į bendrą Gleasono skalės balų sumą neįtraukiami.



2 pav. Gleasono vertinimo sistema (A – 1974 m. D. F. Gleasono sukurta schema, B – 2014 m. ISUP modifikuota schema (pritaikyta pagal J. I. Epsteina, 2015))

Siekiant supaprastinti prostatos adenokarcinomos agresyvumo žymėjimą, suvienodinti PV ir kitų lokalizacijų navikų klasifikacijas, gerai diferencijuotam PV nebenaudoti Gleasono 6 žymėjimo bei išskirti kliniškai skirtingos elgsenos Gleasono 7 (3+4) ir Gleasono 7 (4+3) navikus, 2014 m. ISUP modifikacijoje Gleasono skalės balų sistemą pasiūlyta pakeisti ISUP balais (1 lentelė) [52].

1 lentelė. Prostatos vėžio ISUP vertinimo sistema

Gleasono skalės balų suma	ISUP balas
2–6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4; 3+5; 5+3)	4
9–10	5

3.1.4. Prostatos vėžio išplitimo vertinimas

Klinikinis PV išplitimas vertinamas remiantis 2017 m. TNM klasifikacija (2 lentelė). Patologinis PV išplitimas vertinamas remiantis 2017 m. TNM klasifikacija ir atitinka klinikinį PV vertinimą, išskyrus T1c ir T2 stadijas. T1c stadija taikoma tik klinikiniam ligos vertinimui. Patologiniame PV vertinime visi prostatoje apriboti navikai vertinami kaip T2, pogrūpiai nebenaudojami [53].

2 lentelė. Prostatos vėžio 2017 m. TNM klasifikacija

Pirminis navikas (T)	
T_x	Pirminis navikas neįvertintas
T₀	Pirminio naviko nėra
T₁	Kliniškai neaptinkamas, neapčiuopiamas navikas:
T1a	Histologiniame tyrime atsitiktinai rastas navikas, ≤ 5 proc. pašalintų audinių
T1b	Histologiniame tyrime atsitiktinai rastas navikas, > 5 proc. pašalintų audinių
T1c	Navikas nustatytas prostatos biopsijos metu dėl padidėjusio PSA
T₂	Apčiuopiamas ir prostatoje ribotas navikas:
T2a	Navikas apima pusę (ar mažiau) vienos skilties
T2b	Navikas apima daugiau negu pusę vienos skilties, bet ne abi skiltis
T2c	Navikas apima abi skiltis
T₃	Navikas išplinta už prostatos kapsulės ribų*:
T3a	Navikas išplinta už prostatos kapsulės (vienoje ar abiejose pusėse), įskaitant išplitimą į šlapimo pūslės kaklelį
T3b	Navikas išplinta į vieną ar abi sėklines pūsles
T₄	Navikas išplinta į kitas gretimas struktūras (ne į sėklines pūsles): išorinį rauką, tiesiąją žarną, tarpvietės raumenis ir (ar) pilvo sieną
Sritiniai limfmazgiai (N)[†]	
N_x	Sritiniai limfmazgiai neįvertinti
N₀	Sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra
N₁	Metastazės regioniniuose limfmazgiuose

2 lentelė (tęsinys). Prostatos vėžio 2017 m. TNM klasifikacija

Tolimosios metastazės (M) ²	
M0	Tolimųjų metastazių nėra
M1	Tolimosios metastazės:
M1a	Neregioniniuose limfmazgiuose
M1b	Kauluose
M1c	Kitose vietose

* Naviko plitimas į prostatos viršūnę ar į prostatos kapsulę (bet ne už jos ribų) vertinama kaip T2, o ne kaip T3.

¹ Ne didesnės kaip 0,2 cm metastazės gali būti žymimos pNmi.

² Kai metastazių randama keliuose vietose, pasirenkama blogesnė klasifikacijos kategorija. (p)M1c laikoma blogiausia klasifikacijos kategorija.

3.1.5. Prostatos vėžio rizikos vertinimas

PV rizikos vertinimo tikslas – sugrupuoti vienodas klinikines išėtis turinčius ligonius. Tai leidžia kiekvienai rizikos grupei parinkti tinkamiausią gydymo būdą. Europoje PV rizikai vertinti naudojama Europos urologų asociacijos (EAU, angl. *European Association of Urology*) modifikuota D'Amico sistema (3 lentelė) [4, 54, 55]. Jungtinėse Amerikos Valstijose plačiausiai paplitęs NCCN (angl. *National Comprehensive Cancer Network*) rizikos vertinimo modelis (4 lentelė) [56]. Šiuo metu abiejose rizikos vertinimo sistemose naudojamos tik klinikinės ir patloginės PV charakteristikos.

3 lentelė. EAU prostatos vėžio rizikos vertinimo modelis

PV rizikos grupė	Klinikinės-patloginės charakteristikos	
Maža	PSA < 10 ng/ml, ir ISUP balas – 1, ir cT1–2a.	Lokalus navikas
Vidutinė	PSA 10–20 ng/ml, ir (ar) ISUP balas – 2 ar 3 ir (ar) cT2b.	
Didelė	PSA > 20 ng/ml ir (ar) ISUP balas – 4 ar 5, ir (ar) cT2c.	
	Bet koks PSA, bet koks ISUP balas, cT3–4 ir (ar) cN+.	Lokaliai išplitęs navikas

Santrumpos: cT – klinikinė T stadija; EAU – Europos urologų asociacija, angl. *European Association of Urology*; ISUP balas – Tarptautinės urologinės patologijos draugijos (angl. *International Society of Urological Pathology*) balas; PSA – prostatos specifinis antigenas.

EAU rizikos vertinimo modelyje PV sergantys ligoniai, kuriems nustatyti ISUP 2 ir 3 balai, priskiriami vidutinei rizikos grupei. NCCN modelyje išskiriamos dvi vidutinės rizikos grupės. Mokslinės literatūros duomenimis, ISUP 2 ir 3 balai išsiskiria skirtingomis prognostinėmis savybėmis, tad vidutinės rizikos grupės skirstymas į mažos rizikos vidutinę (ISUP 2 balas) ir didelės rizikos vidutinę (ISUP 3 balas) leidžia tiksliau įvertinti PV riziką [57, 58].

4 lentelė. NCCN prostatos vėžio rizikos vertinimo modelis

PV rizikos grupė		Klinikinės-patologinės charakteristikos
Labai maža		PSA < 10 ng/ml, ir ISUP balas – 1, ir cT1c, ir < 3 teigiami biopsijos stulpeliai, kai kiekvienam iš jų ≤ 50 proc. naviko, ir PSA tankis < 0,15 ng/ml/g.
Maža		PSA < 10 ng/ml, ir ISUP balas – 1, ir cT1–T2a.
Vidutinė	Vidutinės rizikos veiksniai: PSA 10–20 ng/ml, ISUP balas – 2 ar 3, cT2b–2c.	Palanki Vienas vidutinės rizikos veiksnys, ir ISUP balas – 1 ar 2, ir < 50 proc. teigiamų biopsinių stulpelių.
		Nepalanki Du ar trys vidutinės rizikos veiksniai, ir (ar) ISUP balas – 3, ir (ar) ≥ 50 proc. teigiamų biopsinių stulpelių.
Didelė		PSA > 20 ng/ml, ir (ar) ISUP balas – 4 ar 5, ir (ar) cT3a.
Labai didelė		Pirminis Gleasono balas – 5, ir (ar) cT3b–T4, ir (ar) > 4 teigiami biopsiniai stulpeliai su ISUP balu – 4 ar 5.

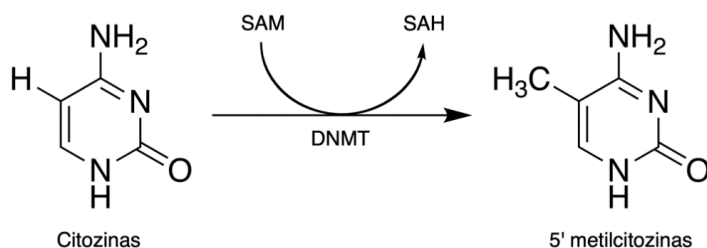
Santrumpos: cT – klinikinė T stadija; ISUP balas – Tarptautinės urologinės patologijos draugijos (angl. *International Society of Urological Pathology*) balas; PSA – prostatos specifinis antigenas.

3.2. Epigenetiniai prostatos vėžio žymenys

Palyginti su kitų lokalizacijų navikais, PV vystymosi metu genų mutacijų aptinkama retai. Epigenetinių pokyčių, kurių metu DNR seka nekinta, tačiau normali genų raiška sutrinka, nustatoma dažnai [11]. Šių pokyčių randama

ankstyvosiose kancerogenezės stadijose [59–61], jie pasižymi stabilumu *in vivo* ir *in vitro*, be to, gali būti grįžtamieji [13, 14], tad tapo ypač patraukliu mokslinių tyrimų objektu.

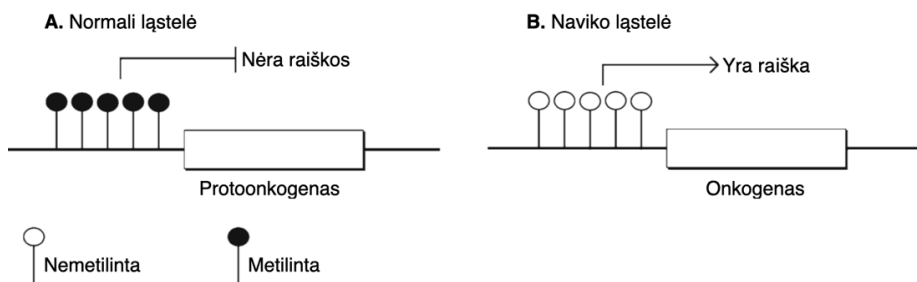
Plačiausiai tyrinėjamas epigenetinis reiškinys – DNR metilinimas, kurio metu DNR metiltransferazės fermentai perkelia metilo grupę nuo S-adenozilmetionino ant citozino penkto anglies atomo (3 pav.).



3 pav. Citozino metilinimo schema (pritaikyta pagal prieigą internete: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7b/Cytosine_5-methylation.png>)

(Santrumpos: DNMT – DNR metiltransferazių šeimos fermentai; SAM – S-adenozilmetioninas, SAH – S-adenozilhomocisteinas)

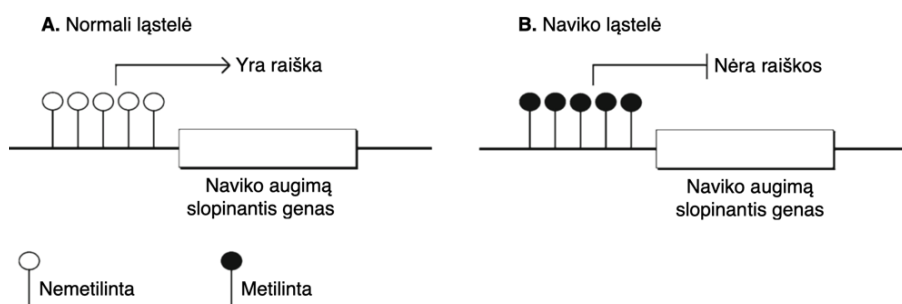
PV vystymosi metu nustatomi du skirtingi DNR metilinimo pokyčiai. Vienas iš jų – globalusis hipometilinimas, kurio metu metilo grupės prarandamos daugybinėse genomo vietose [62, 63]. Tai sutrikdo normalią genų raišką, lemia chromosomų nestabilumą, onkogenų ir transpozonų aktyvaciją ir navikinių ląstelių proliferaciją [64, 65]. Pavienių genų reguliacinių sričių (promotorių) hipometilinimas nustatomas retai, tačiau jis taip pat gali inicijuoti normaliomis sąlygomis neaktyvių protoonkogenų raišką (4 pav.) [66].



4 pav. Promotoriaus hipometilinimo schema: A – normali ląstelė, kurios protoonkogeno promotorius metilintas; B – navikinė ląstelė, kurios onkogeno promotorius hipometilintas (pritaikyta pagal M. G. Aithalą, 2013 [67])

Dauguma PV vystymosi metu nustatomų epigenetinių pokyčių susiję su DNR hipermetiliniu pavienėse citozino ir guanino dinukleotidų praturtintose genų srityse – CpG salose. Dauguma CpG salų išsidėsčiusios genų promotoriuose [68], kurios normaliose ląstelėse būna nemetilintos [69].

Reguliacinių sričių hipermetilinimas lemia baltymus koduojančių iRNR praradimą ir baltymų sintezės slopinimą (5 pav.) [13, 14]. Šiuo metu žinoma daugiau kaip 100 genų, kurių raiška PV gali būti slopinama metilinant promotorines genų sritis. Iš šių genų dažniausi: *GSTP1*, *RASSF1A*, *RARβ2*, *APC*, *CCND2*, *PTGS*, *ESR1/2*, *CDKN2A*, *EDNRB*, *HIC*, *MDR1*, *CAVI*, *CDH1* ir *BCL2* [70].



5 pav. Promotoriaus hipermetilavimo schema: A – normali ląstelė, kurios naviko augimą slopinančio geno promotorius nemetilintas; B – navikinė ląstelė, kurios augimą slopinančio geno promotorius metilintas (pritaikyta pagal M. G. Aithalą, 2013 [67])

3.2.1. Glutationo S-transferazės pi 1 klasės genas (*GSTP1*)

Glutationo S-transferazės (GST) šeimos baltymai pasižymi antioksidaciniu poveikiu. Glutationas, prisijungdamas prie žalingų junginių, apsaugo DNR nuo galimų pažeidimų [59, 71]. Iš viso nustatytos aštuonios GST klasės: *alpha*, *kappa*, *mu*, *omega*, *pi*, *sigma*, *theta* ir *zeta* [72].

GSTP1 – naviko augimą slopinantis genas, esantis 11q13 regione, atsakingas už glutationo S-transferazės pi 1 baltymo sintezę [72]. *GSTP1* geno promotoriaus metilinimo metu sutrinka *GSTP1* baltymų sintezė [73], kartu ir DNR apsauginė funkcija. *GSTP1* hipermetilinimas nustatytas daugelyje navikų, įskaitant hepatoceliulinę karcinomą [74], krūties [75], plaučių [76] ir kolorektalinį vėžį [77], tačiau pastarasis labiausiai ištirtas kaip PV žymuo [78, 79].

Įvairių autorių duomenimis, *GSTPI* hipermetilinimas nustatytas 17–95 proc. prostatos navikinių audinių. Minėtina, kad 17 iš 24 studijų metilinimo dažnis siekė ≥ 72 proc. (5 lentelė). PV sergančių ligonių šlapime *GSTPI* buvo hipermetilintas 27–83 proc. tiriamųjų, kraujo mėginių metilinimo dažnis siekė 28–95 proc. (5 lentelė). Atskirų studijų duomenimis, *GSTPI* hipermetilinimas taip pat buvo nustatytas 86 proc. prostatos sekreto [80] ir 44–50 proc. sėklos mėginių [81, 82].

GSTPI promotoriaus metilinimas prostatos normaliame ar GPH audinyje rastas 0–24 proc. atvejų. Minėtina, kad 15 iš 19 studijų jis siekė tik 0–6 proc. (5 lentelė). PV nesergančių vyrų šlapime *GSTPI* buvo hipermetilintas 0–28 proc. tiriamųjų, panašūs rezultatai pastebėti ir kraujo mėginiuose – 0–21 proc. atvejų (5 lentelė).

Metaanalizės [83] duomenimis, *GSTPI* hipermetilinimas yra reikšmingai susijęs su PV (šansų santykis (OR; angl. *odds ratio*) – 18,58; 95 proc. pasikliautinis intervalas (CI; angl. *confidence interval*): 9,60–35,95; $p < 0,001$). PV buvo nustatytas 82 proc. navikinių ir 5 proc. nenavikinių prostatos audinių, o testo diagnostinis jautrumas siekė 82 proc., kai specifiskumas – 95 proc. [83].

GSTPI promotoriaus metilinimas nustatytas PIN metu [60, 84–88], taip pat normaliuose paranavikiniuose prostatos audiniuose [89–91]. Tai patvirtina epigenetinio lauko efektą morfologiškai nepakitusiame prostatos audinyje.

GSTPI mažai tirtas kaip prognostinis ar predikcinis PV žymuo, tačiau mokslinėje literatūroje aprašytas jo ryšys su ligos agresyvumu ir patologine stadija [14, 15, 86, 92–94], biocheminiu [15, 95], lokaliu ir sisteminiu ligos atkryčiu [96], atsaku į chemoterapinį gydymą docetakseliu bei bendru išgyvenamumu [97].

5 lentelė. *GSTPI* promotoriaus metilino dažniai prostatos navikiniame ir nenavikiniame audiniuose bei organizmo skysčiuose

Autorius, metai	Tiriamoji medžiaga	Tiriamosios medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metodas	Metilinta tiriamoji medžiaga, % (metilinta / N)	Kontrolė ²	Kontrolinės medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metilinta kontrolė, % (metilinta / N)
Prostatos audinys							
Cairns P, et al.; 2001 [98]	Navikinis audinys	RP (28)	MSP	78,6 (22/28)	–	–	–
Jerónimo C, et al.; 2002 [99]	Navikinis audinys	RP (69)	QMSP	91,3 (63/69)	GPH	TURP (31)	0,0 (0/31)
Manuyama R, et al.; 2002 [100]	Navikinis audinys	RP (101)	MSP	35,6 (36/101)	Normalus audinys, GPH	RP (7), TURP (25)	3,1 (1/32)
Yamanaka M, et al.; 2003 [101]	Navikinis audinys	Nenurodyta (109)	MSP	88,1 (96/109)	GPH	Nenurodyta (36)	2,8 (1/36)
Jerónimo C, et al.; 2004 [92]	Navikinis audinys	RP (118)	QMSP	94,9 (112/118)	Normalus audinys, GPH	RP (32)	0,0 (0/32)
Singal R, et al.; 2004 [102]	Navikinis audinys	RP (81)	MSP	71,6 (58/81)	GPH	TURP (42)	4,8 (2/42)
Yegnasubramanian S, et al.; 2004 [103]	Navikinis audinys	RP (73)	QMSP	94,5 (69/73)	Normalus audinys	RP (25) ³	0,0 (0/25)
Bastian PJ, et al.; 2004 [104]	Navikinis audinys	RP (31)	QMSP	90,3 (28/31)	GPH	Nenurodyta (5)	0,0 (0/5)
Kang GH, et al.; 2004 [88]	Navikinis audinys	RP (44), TURP (4)	MSP	86,5 (32/37)	Normalus audinys	PB (20)	0,0 (0/20)
Tokumaru Y, et al.; 2004 [105]	Navikinis audinys	PB (61)	QMSP	75,4 (46/61)	Normalus audinys	PB (11)	0,0 (0/11)
Enokida H, et al.; 2005 [106]	Navikinis audinys	RP (170)	MSP	54,1 (92/170)	GPH	TURP (69)	5,8 (4/69)
Bastian PJ, et al.; 2005 [107]	Navikinis audinys	RP (53)	QMSP	90,6 (48/53)	GPH	RP (14)	0,0 (0/14)

5 lentelė (tęsinys). *GSTPI* promotoriaus metilimo dažniai prostatos navikiniame ir nenavikiniame audiniuose bei organizmo skysčiuose

Autorius, metai	Tiriamoji medžiaga	Tiriamosios medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metodas	Metilinta tiriamoji medžiaga, % (metilinta / N)	Kontrolė ²	Kontrolinės medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metilinta kontrolė, % (metilinta / N)
Bastian PJ, et al.; 2007 [108]	Navikinis audinys	RP (78)	QMSP	33,3 (26/78)	GPH	RP ir adenomektomija (32)	0,0 (0/32)
Richiardi L, et al.; 2009 [109]	Navikinis audinys	PB (346), TURP (56), RP (57)	MSP	69,0 (309/448)	–	–	–
Zon G, et al.; 2009 [110]	Navikinis audinys	PB (43)	MSP	86,0 (37/43)	GPH	PB (22)	0,0 (0/22)
Steiner I, et al.; 2010 [86]	Navikinis audinys	RP (25)	QMSP	84,0 (21/25)	Normalus audinys, GPH	RP (5), nenurodyta (1)	0,0 (0/6)
Devaney J, et al.; 2011 [95]	Navikinis audinys	RP (195)	QMSP	88,2 (172/195)	Normalus audinys	RP (90) ⁴	4,4 (4/90)
Hashad DI, et al.; 2011 [87]	Navikinis audinys	Nenurodyta (44)	QMSP	86,4 (38/44)	GPH	TURP (50)	24,0 (12/50)
Richiardi L, et al.; 2013 [89]	Navikinis audinys	PB (54), TURP (54), RP (49)	MSP	84,1 (132/157)	Paranavikinis audinys	PB (54), TURP (54), RP (49)	42,0 (66/157)
Lan VT, et al.; 2015 [111]	Navikinis audinys	RP (50)	MSP	46,0 (23/50)	GPH	RP (17)	11,8 (2/17)
Zhang W, et al.; 2015 [112]	Navikinis audinys	RP (4), TURP (19), PB (33)	MSP	73,2 (41/56)	GPH	Adenomektomija (10)	10,0 (1/10)
Martignano F, et al.; 2016 [113]	Navikinis audinys	RP (56)	QMSP	91,1 (51/56)	Normalus audinys	RP (56) ³	5,4 (3/56)
Vo TT, et al.; 2016 [114]	Navikinis audinys	RP (59)	MSP	66,1 (39/59)	GPH	RP (37)	10,8 (4/37)
Sanchez BE, et al.; 2018 [115]	Navikinis audinys	PB (83)	QMSP	16,9 (14/83)	GPH	PB (103)	1,9 (2/103)

5 lentelė (tęsinys). *GSTPI* promotoriaus metilimo dažniai prostatos navikiniame ir nenavikiniame audiniuose bei organizmo skysčiuose

Autoriaus, metai	Tiriamoji medžiaga	Tiriamosios medžiagos surinkimo būdas (N)¹	Metodas	Metilinta tiriamoji medžiaga, % (metilinta / N)	Kontrolė²	Kontrolinės medžiagos surinkimo būdas (N)¹	Metilinta kontrolė, % (metilinta / N)
Šlapimas							
Cairns P, et al.; 2001 [98]	Šlapimas	Pasišlapinūs (22), RP	MSP	27,3 (6/22)	–	–	–
Goessl C, et al.; 2001 [82]	Šlapimas	Nenurodyta (29), nenurodyta	MSP	75,9 (22/29)	Šlapimas (GPH)	Nenurodyta (40), nenurodyta	2,5 (1/40)
Jeronimo C, et al.; 2002 [99]	Šlapimas	Be masažo, pasišlapinūs (69), RP	MSP	30,4 (21/69)	Šlapimas (GPH)	Be masažo, pasišlapinūs (31), TURP	3,2 (1/31)
Hoque MO, et al.; 2005 [116]	Šlapimas	Nenurodyta (52), RP	QMSP	48,1 (25/52)	Šlapimas (normalus audinys, GPH) ⁵	Nenurodyta (91), nenurodyta (neoperuoti)	0,0 (0/91)
Roupret M, et al.; 2007 [117]	Šlapimas	Su masažu, kateterizuojant (95), RP	QMSP	83,2 (79/95)	Šlapimas (normalus audinys, GPH)	Su masažu (38), nenurodyta (neoperuoti)	13,2 (5/38)
Dimitriadis E, et al.; 2013 [118]	Šlapimas	Su masažu (14), PB	MSP	42,9 (6/14)	Šlapimas (normalus audinys)	Su masažu (52), PB	23,1 (12/52)
Sanchez BE, et al.; 2018 [115]	Šlapimas	Nenurodyta (82), PB	QMSP	47,6 (39/82)	Šlapimas (GPH)	Nenurodyta (102), PB	27,5 (28/102)
Kraujas							
Goessl C, et al.; 2001 [82]	Plazma, serumas	Venos punkcija (32), nenurodyta	MSP	71,9 (23/32)	Plazma, serumas (GPH)	Venos punkcija (22), nenurodyta	0,0 (0/22)
Jeronimo C, et al.; 2002 [99]	Plazma	Venos punkcija (69), RP	MSP	36,2 (25/69)	Plazma (GPH)	Venos punkcija (31), TURP	0,0 (0/31)

5 lentelė (tęsinys). *GSTPI* promotoriaus metilimo dažniai prostatos navikiniame ir nenavikiniame audiniuose bei organizmo skysčiuose

Autorius, metai	Tiriamoji medžiaga	Tiriamosios medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metodas	Metilinta tiriamoji medžiaga, % (metilinta / N)	Kontrolė ²	Kontrolinės medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metilinta kontrolė, % (metilinta / N)
Chuang CK, et al.; 2007 [119]	Plazma	Venos punkcija (36), nenurodyta	QMSP	30,6 (11/36)	Plazma (GPH)	Venos punkcija (27), nenurodyta	7,4 (2/27)
Roupret M, et al.; 2008 [120]	Kraujas (nepatikslinta)	Venos punkcija (42), PB	QMSP	95,2 (40/42)	Kraujas (normalus audinys)	Venos punkcija (22), PB	9,1 (2/22)
Sanchez BE, et al.; 2018 [115]	Plazma	Venos punkcija (83), PB	QMSP	27,7 (23/83)	Plazma (GPH)	Venos punkcija (103), PB	21,4 (22/103)

Prostatos sekretas

Gonzalogo ML, et al.; 2004 [80]	Prostatos sekretas	Nenurodyta (100), RP	MSP	86,0 (86/100)	–	–	–
---------------------------------	--------------------	----------------------	-----	---------------	---	---	---

Sėkla

Suh CI, et al.; 2000 [81]	Sėkla	Nenurodyta (9), PB	MSP	44,4 (4/9)	–	–	–
Goessel C, et al.; 2001 [82]	Sėkla	Nenurodyta (8), nenurodyta	MSP	50,0 (4/8)	Sėkla (GPH)	Nenurodyta (6), nenurodyta	0,0 (0/6)

Santrumpos: GPH – gerybinė prostatos hiperplazija; MSP – metilimui jautri PGR, angl. *methylaton-specific polymerase chain reaction*; N – tiriamųjų skaitėms; RP – radikali prostatektomija; PB – prostatos biopsija; PGR – polimerazinė grandininė reakcija; QMSP – kiekybinė metilimui jautri PGR, angl. *quantitative methylation-specific polymerase chain reaction*; TURP – transuretrinė prostatos rezekcija.

¹ Kai tiriamoji ir (ar) kontrolinė medžiaga buvo organizmo skysčiai (šlapimas, kraujas, prostatos sekretas ir sėkla), po kablelio nurodytas būdas, kuriuo buvo nustatyta PV diagnozė.

² Skliaustuose prie tiriamųjų, kuriems tirtas kraujas ir šlapimo mėginys, nurodyta kita prostatos patologija, jei tokia buvo nustatyta; jei patologija nenustatyta, nurodytas normalus prostatos audinys.

³ 12/25 kontrolinės grupės pacientų įtraukta iš tiriamųjų, kuriems dėl PV atlikta RP, grupės. Normalus prostatos audinys histologinio tyrimo metu paaimtas iš prostatos vietų be navikinių pokyčių.

⁴ Visa kontrolinė grupė sudaryta iš tiriamųjų, kuriems dėl PV atlikta RP, grupės. Normalus prostatos audinys histologinio tyrimo metu paimtas iš prostatos vietų be navikinių pokyčių.

⁵ 5 kontrolinės grupės tiriamiesiems diagnozuotas kitos lokalizacijos pirminis navikas; 25/91 kontrolinės grupės tiriamųjų buvo moterys.

3.2.2. Ras sąveikos domeną turinčių baltymų 1 šeimos genas (*RASSF1*)

RASSF1 – naviko augimą slopinantis genas, esantis 3p21 regione. Šis genas priklauso Ras GTPazės šeimai (RASSF), kurią sudaro dešimt skirtingų genų (*RASSF1–RASSF10*), koduojančių dešimt skirtingų baltymų [121]. Pastarieji atsakingi už signalų perdavimą ląstelės signaliniuose keliuose, susijusiuose su ląstelių proliferacija, diferenciacija, apoptoze ir kt. [122]. Iš viso nustatytos aštuonios skirtingos *RASSF1* izoformos A–H [122], iš kurių *RASSF1A* raiškos sumažėjimas, sukeltas *RASSF1A* (toliau *RASSF1*) promotoriaus metilavimo, nustatytas įvairių lokalizacijų navikuose: sėklidžių [123], inkstų [124], šlapimo pūslės [125], skydliaukės [126], plaučių [127], kiaušidžių [128] ir prostatos [129].

Įvairių autorių duomenimis, *RASSF1* hipermetilimas nustatytas 28–99 proc. prostatos navikinių audinių. Minėtina, kad 8 iš 12 studijų metilavimo dažnis siekė ≥ 54 proc. (6 lentelė). PV sergančių ligonių šlapime hipermetilintas *RASSF1* rastas 38–78 proc. tiriamųjų, kraujo mėginių metilavimo dažnis – 31–98 proc. (6 lentelė).

RASSF1 promotoriaus hipermetilimas 0–93 proc. atvejų nustatytas normaliame prostatos ir GPH audinyje. Minėtina, kad 11 iš 12 studijų jis siekė < 29 proc. ir tik vienoje studijoje [92] nustatytas itin aukštas (93 %) metilavimo dažnis esant GPH kontrolei (6 lentelė). PV nesergančių vyrų šlapime *RASSF1* hipermetilintas 8–29 proc. atvejų. Panašūs rezultatai nustatyti ir kraujo mėginiuose – 23–25 proc. (6 lentelė). Metaanalizės [129] duomenimis, testo diagnostinis jautrumas PV nustatyti siekia 76 proc., o specifškumas – 87 proc.

RASSF1 promotoriaus metilimas rastas ir PIN atveju [85, 88, 130]. J. Mehrotros ir bendraautorių duomenimis [131], *RASSF1* promotoriaus metilimas taip pat nustatytas morfologinių naviko požymių neturinčiuose prostatos paranevikiškuose audiniuose.

RASSF1 mažai tirtas kaip PV prognostinis ar predikcinis žymuo, tačiau mokslinėje literatūroje aprašytas jo ryšys su blogesnės diferenciacijos [88, 129, 132, 133] ir aukštesnės stadijos PV [92, 132], didesniu naviko tūriu bei biocheminiu ligos atkryčiu po radikalaus chirurginio gydymo [15].

6 lentelė. *RASSF1* promotoriaus metilimo dažniai prostatos navikiniame ir nenavikiniame audinyje bei organizmo skysčiuose

Autorius, metai	Tiriamoji medžiaga	Tiriamosios medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metodas	Metilinta tiriamoji medžiaga, % (metilinta / N)	Kontrolė ²	Kontrolinės medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metilinta kontrolė, % (metilinta / N)
Prostatos audinys							
Maruyama R, et al.; 2002 [100]	Navikinis audinys	RP (101)	MSP	53,5 (54/101)	Normalus audinys, GPH	RP (7), TURP (25)	15,6 (5/32)
Kang GH, et al.; 2004 [88]	Navikinis audinys	RP (44) TURP (4)	MSP	83,8 (31/37)	Normalus audinys	PB (20)	0,0 (0/20)
Jerónimo C, et al.; 2004 [92]	Navikinis audinys	RP (118)	QMSP	99,2 (117/118)	GPH	TURP (30)	93,3 (28/30)
Yegnasubramanian S, et al.; 2004 [103]	Navikinis audinys	RP (73)	QMSP	95,9 (70/73)	Normalus audinys	RP (25) ³	0,0 (0/25)
Singal R, et al.; 2004 [102]	Navikinis audinys	RP (81)	MSP	49,4 (40/81)	GPH	TURP (42)	19,0 (8/42)
Bastian PJ, et al.; 2005 [107]	Navikinis audinys	RP (53)	QMSP	67,9 (36/53)	GPH	RP (14)	28,6 (4/14)
Cho NY, et al.; 2007 [134]	Navikinis audinys	RP (179)	MSP	86,6 (155/179)	GPH	TURP (30)	23,3 (7/30)
Kawamoto K, et al.; 2007 [132]	Navikinis audinys	RP (131)	MSP	74,0 (97/131)	GPH	TURP (65)	18,5 (12/65)
Syed N, et al.; 2010 [135]	Navikinis audinys	RP (50)	MSP	34,0 (17/50)	GPH	TURP (45)	15,6 (7/45)
Vasiljevic N, et al.; 2011 [136]	Navikinis audinys	RP (37), TURP (6), nežinoma (5)	PYRO	91,7 (44/48)	GPH	TURP (29)	6,9 (2/29)
Lan VT, et al.; 2015 [111]	Navikinis audinys	RP (50)	MSP	28,0 (14/50)	GPH	RP (17)	23,5 (4/17)
Vo TT, et al.; 2016 [114]	Navikinis audinys	RP (59)	MSP	32,2 (19/59)	GPH	RP (37)	27,0 (10/37)

6 lentelė (tęsinys). *RASSFI* promotoriaus metilimo dažniai prostatos navikiniame ir nenavikiniame audinyje bei organizmo skysčiuose

Autorius, metai	Tiriamoji medžiaga	Tiriamosios medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metodas	Metilinta tiramoji medžiaga, % (metilinta / N)	Kontrolė ²	Kontrolinės medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metilinta kontrolė, % (metilinta / N)
Šlapimas							
Hoque MO, et al.; 2005 [116]	Šlapimas	Nenurodyta (52), RP	QMSP	73,1 (38/52)	Šlapimas (normalus audinys, GPH) ⁴	Nenurodyta (91), nenurodyta (neoperuoti)	11,0 (10/91)
Roupret M, et al.; 2007 [117]	Šlapimas	Po masažo, kateterizuojant (95), RP	QMSP	77,9 (74/95)	Šlapimas (normalus audinys, GPH)	Po masažo (38), nenurodyta (neoperuoti)	7,9 (3/38)
Dimitriadis E, et al.; 2013 [118]	Šlapimas	Po masažo (14), PB	MSP	42,9 (6/14)	Šlapimas (normalus audinys)	Po masažo (52), PB	28,8 (15/52)
Sanchez BE, et al.; 2018 [115]	Šlapimas	Nenurodyta (82), PB	QMSP	38,0 (32/82)	Šlapimas (GPH)	Nenurodyta (102), PB	25,5 (26/102)
Kraujas							
Roupret M, et al.; 2008 [120]	Kraujas (nepatikslinkta)	Venos punkcija (42), PB	QMSP	97,6 (41/42)	Kraujas (normalus audinys)	Venos punkcija (22), PB	22,7 (5/22)
Sanchez BE, et al.; 2018 [115]	Plazma	Venos punkcija (82), PB	QMSP	31,3 (26/83)	Plazma (GPH)	Venos punkcija (102), PB	25,2 (26/103)

Santrumpos: GPH – gerybinė prostatos hiperplazija; MSP – metilimui jautri PGR, angl. *methylaton-specific polymerase chain reaction*; N – tiriamųjų, kuriems patvirtintas geno hipermetilimas, skaičius visoje imtyje; RP – radikali prostatektomija; PB – prostatos biopsija; PGR – polimerazinė grandininė reakcija; QMSP – kiekybinė metilimui jautri PGR, angl. *quantitative methylaton-specific polymerase chain reaction*; TURP – transuretrinė prostatos rezekcija.

¹ Kai tiriamoji ir (ar) kontrolinė medžiaga buvo organizmo skysčiai (šlapimas ir kraujas), po kablelio nurodytas būdas, kuriuo buvo nustatyta PV diagnozė.

² Skliausteliuose prie tiriamųjų, kuriems tirtas kraujas ir šlapimo mėginys, nurodyta kita prostatos patologija, jei tokia buvo nustatyta; jei patologija nenustatyta, nurodytas normalus prostatos audinys.

³ 12/25 kontrolinės grupės pacientų įtraukta iš tiriamųjų, kuriems dėl PV atlikta RP, grupės. Normalus prostatos audinys histologinio tyrimo metu paimtas iš prostatos vietų be navikinių pokyčių.

⁴ 5 kontrolinės grupės tiriamiesiems diagnozuotas kitos lokalizacijos pirminis navikas; 25/91 kontrolinės grupės tiriamųjų buvo moterys.

3.2.3. Retinoinės rūgšties receptoriaus β genas (*RAR β*)

Retinoinės rūgšties receptoriaus (RAR) – branduolio receptoriaus, aktyvinamas trans- ir 9-cis retinoinės rūgšties ligando [137]. Iš viso nustatyti trys RAR tipai: RAR α , RAR β ir RAR γ . Minėtinas RAR β , itin svarbus epitelinių ląstelių augimui ir diferenciacijai. *RAR β* geno, randamo 3p24 regione [138], promotoriaus metilinimo metu sutrinka RAR β raiška, kartu ir apsauginė funkcija [139]. *RAR β* hipermetilinimas nustatytas plaučių [140], krūties [141], kiaušidžių, inkstų [142], prostatos [143, 144] ir kitų lokalizacijų navikuose.

Mokslinės literatūros duomenimis, hipermetilintas *RAR β* promotorius randamas 40–96 proc. prostatos navikinių audinių. Minėtina, kad 8 iš 12 studijų metilinimo dažnis siekė ≥ 69 proc. (7 lentelė). PV sergančių ligonių šlapime hipermetilintas *RAR β* nustatytas 35–62 proc., kraujo mėginiuose – 79–98 proc. atvejų (7 lentelė).

RAR β promotoriaus metilinimas normaliame prostatos ar GPH audinyje nustatytomas retai – 0–30 proc. atvejų. 10 iš 11 studijų duomenimis, jis siekė ≤ 3 proc. ir tik vienoje studijoje [145] nustatytas aukštesnis (30 %) metilinimo dažnis, esant GPH kontrolei (7 lentelė). Reikšmingus *RAR β* metilinimo skirtumus tarp prostatos navikinio ir nenavikinio audinio taip pat patvirtina 2018 m. atlikta metaanalizė: OR – 21,65; 95 % CI: 9,27–50,57; $p < 0,001$ [144]. PV nesergančių vyrų šlapime *RAR β* buvo hipermetilintas 0–9 proc. tiriamųjų. Panašūs rezultatai gauti ir kraujo mėginiuose – 9–11 proc. atvejų (7 lentelė).

RAR β promotoriaus metilinimas nustatytas ir PIN metu [60, 86], taip pat paranavikiniuose prostatos audiniuose [86, 90, 131]. I. Steiner ir bendraautorių duomenimis [86], *RAR β* hipermetilinimas susijęs su PV agresyvumu.

7 lentelė. *RARβ* promotoriaus metilinio metilino dažniai prostatos navikiniame ir nenavikiniame audinyje bei organizmo skysčiuose

Autorius, metai	Tiriamoji medžiaga	Tiriamosios medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metodas	Metilinta tiriamoji medžiaga, % (metilinta / N)	Kontrolė ²	Kontrolinės medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metilinta kontrolė, % (metilinta / N)
Prostatos audinys							
Nakayama T, et al.; 2001 [146]	Navikinis audinys	RP (14), MTS biopsija (10)	MSP	83,3 (20/24)	Normalus audinys	RP (10)	0,0 (0/10)
Maruyama R, et al.; 2002 [100]	Navikinis audinys	RP (101)	MSP	53,5 (54/101)	Normalus audinys, GPH	RP (7), TURP (25)	3,1 (1/32)
Yamanaka M, et al.; 2003 [101]	Navikinis audinys	Nenurodyta (109)	MSP	78,0 (85/109)	GPH	Nenurodyta (36)	0,0 (0/36)
Singal R, et al.; 2004 [102]	Navikinis audinys	RP (81)	MSP	39,5 (32/81)	GPH	TURP (42)	0,0 (0/42)
Zhang J, et al.; 2004 [147]	Navikinis audinys	Nenurodyta (50)	MSP	84,0 (42/50)	GPH	Nenurodyta (2)	0,0 (0/2)
Tokumaru Y, et al.; 2004 [105]	Navikinis audinys	PB (61)	QMSP	88,5 (54/61)	Normalus audinys	PB (11)	0,0 (0/11)
Cho NY, et al.; 2007 [134]	Navikinis audinys	RP (179)	MSP	68,7 (123/179)	GPH	TURP (30)	3,3 (1/30)
Bastian PJ, et al.; 2007 [108]	Navikinis audinys	RP (78)	QMSP	71,8 (56/78)	GPH	RP ir adenomektomija (32)	3,1 (1/32)
Zon G, et al.; 2009 [110]	Navikinis audinys	PB (43)	MSP	90,7 (39/43)	GPH	PB (22)	0,0 (0/22)
Steiner I, et al.; 2010 [86]	Navikinis audinys	RP (25)	QMSP	96,0 (24/25)	Normalus audinys, GPH	RP (5), nenurodyta (1)	Nenurodyta
Ameri A, et al.; 2011 [148]	Navikinis audinys	PB (42)	MSP	52,4 22/42	GPH	PB (21)	0,0 (0/21)
Tang D, et al.; 2013 [145]	Navikinis audinys	RP (58)	MSP	61,1 (33/54)	GPH	RP (58) ³	29,6 (16/54)

7 lentelė (tsinys). *RARβ* promotoriaus metilimo dažniai prostatos navikiniam ir nenavikiniam audinyje bei organizmo skysčiuose

Autorius, metai	Tiriamoji medžiaga	Tiriamosios medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metodas	Metilinta tiriamoji medžiaga, % (metilinta / N)	Kontrolė ²	Kontrolinės medžiagos surinkimo būdas (N) ¹	Metilinta kontrolė, % (metilinta / N)
Šlapimas							
Hoque MO, et al.; 2005 [116]	Šlapimas	Nenurodyta (52), RP	QMSP	34,6 (18/52)	Šlapimas (normalus audinys, GPH) ⁴	Nenurodyta (91), nenurodyta (neoperuoti)	8,8 (8/91)
Roupret M, et al.; 2007 [117]	Šlapimas	Po masažo, kateterizuo-jant (95), RP	QMSP	62,1 (59/95)	Šlapimas (normalus audinys, GPH)	Po masažo (38), nenurodyta (neoperuoti)	2,6 (1/38)
Kraujas							
Roupret M, et al.; 2008 [120]	Kraujas (nepatiks-linta)	Venos punkcija (42), PB	QMSP	78,6 (33/42)	Kraujas (normalus audinys)	Venos punkcija (22), PB	9,1 (2/22)
Dumache R, et al.; 2012 [149]	Serumas	Venos punkcija (91), RP	QMSP	97,8 (89/91)	Kraujas (GPH)	Venos punkcija (94), TURP	10,6 (10/94)

Santrumpos: GPH – gerybinė prostatos hiperplazija; MSP – metilimui jautri PGR, angl. *methylation-specific polymerase chain reaction*; MTS – metastazės; N – tiriamųjų, kuriems patvirtintas geno hipermetilimas, skaičius visoje imtyje; RP – radikali prostatektomija; PB – prostatos biopsija; PGR – polimerazinė grandininė reakcija; QMSP – kiekybinė metilimui jautri PGR, angl. *quantitative methylation-specific polymerase chain reaction*; TURP – transuretrinė prostatos rezekcija.

¹ Kai tiriamoji ir (ar) kontrolinė medžiaga buvo organizmo skysčiai (šlapimas ir kraujas), po kablelio nurodytas būdas, kuriuo buvo nustatyta PV diagnozė.

² Skliaustuose prie tiriamųjų, kuriems tirtas kraujas ir šlapimo mėginys, nurodyta kita prostatos patologija, jei tokia buvo nustatyta; jei patologija nenustatyta, nurodytas normalus prostatos audinys.

³ Visa kontrolinė grupė sudaryta iš tiriamųjų, kuriems dėl PV atlikta RP, grupės. Normalus prostatos audinys histologinio tyrimo metu paimtas iš prostatos vietų be navikinių pokyčių.

⁴ 5 kontrolinės grupės tiriamiesiems diagnozuotas kitos lokalizacijos pirminis navikas; 25/91 kontrolinės grupės tiriamųjų buvo moterys.

4. DARBO METODOLOGIJA

Tyrimui atlikti išduotas Lietuvos bioetikos komiteto (Algirdo g. 31, 03219 Vilnius, Lietuva) leidimas (2007-11-23 Nr. 50; žr. 1 priedą). Vėliau išduotas ir leidimas pratęsti tyrimą (2011-09-07 Nr. 6B-11-275; žr. 2 priedą).

Dalyvauti tyrime buvo kviečiami visi liginiai, gydyti Vilniaus universiteto ligininės Santaros klinikų (VUL SK) Urologijos centre (Santariškių g. 2, 08661 Vilnius, Lietuva), kurie atitiko įtraukimo į tyrimą kriterijus ir kuriems nenustatyta atmetimo kriterijų.

Molekuliniai tyrimai atlikti Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute (Saulėtekio al. 7, 10257 Vilnius, Lietuva).

4.1. Įtraukimo kriterijai

- Transrektalinės PB metu histologiškai patvirtinta prostatos adenokarcinoma.
- VUL SK Urologijos centre dėl nustatytos prostatos karcinomos ligoniui atlikta operacija – radikali prostatektomija (RP).

4.2. Atmetimo kriterijai

- PB metu paimta <10 biopsinių stulpelių.
- Diagnozuota neuroendokrininė, mažų ląstelių, sarkomatoidinė, plokščia-ląstelinė ar žiedinių ląstelių karcinoma.
- Anksčiau diagnozuotas PV, kuriam taikyta aktyvaus stebėjimo taktika ar kitas specifinis gydymas, įskaitant hormonų terapiją.
- Diagnozuota apatinių ir (ar) viršutinių šlapimo takų urotelio karcinoma.

4.3. Klinikiniai ir patologiniai duomenys

4.3.1. Klinikinių ir patologinių duomenų rinkimas

Iš PB histologinių tyrimų rezultatų ir procedūrų medicininės dokumentacijos surinkti visų tiriamųjų, sutikusių dalyvauti biomediciniame tyrime, klinikiniai ir patologiniai duomenys: tiriamojo amžius PV diagnozės nustatymo metu, priešoperacinis PSA (ng/ml), PB data, Gleasono skalės balų suma, cTNM. Dalis PB buvo atliktos kitose gydymo įstaigose, kurių patologinė medžiaga VUL SK Valstybiniame patologijos centre (VPC; P. Baublio g. 5, 08406 Vilnius, Lietuva) pakartotinai netirta.

Visi tiriamieji, įtraukti į biomedicininį tyrimą, gavo savalaikį ir visavertį PV gydymą. Jų dalyvavimas tyrime neturėjo jokios įtakos PV gydymo pasirinkimui, pradžiai, eigai ar baigčiai. Iš tiriamųjų operacinės medžiagos histologinių tyrimų rezultatų ir pooperacinės stebėsenos duomenų surinkti tokie klinikiniai ir pataloginiai duomenys: operacijos data, Gleasono skalės balų suma, pTNM, informacija apie teigiamą chirurginį kraštą, pooperacinis PSA (ng/mL), kaulinių ir minkštųjų audinių metastazių nustatymo data.

Visuose histologiniuose tyrimuose Gleasono skalės balų suma buvo vertinta laikantis Tarptautinės urologinės patologijos draugijos (ISUP; angl. *International Society of Urologic Pathology*) 2005 m. rekomendacijų [150]. Remiantis ISUP 2014 m. rekomendacijomis [57], visiems tiriamiesiems vietoj Gleasono skalės balų sumos priskirtas ISUP balas, kuris PB histologiniuose tyrimuose atitinkamai žymėtas kaip cISUP, o RP operacinėje medžiagoje – pISUP.

Duomenys apie biomedicininiame tyrime dalyvavusių tiriamųjų mirtį (data, mirties priežastis) gauti iš Higienos instituto (Didžioji g. 22, 01128 Vilnius, Lietuva) tvarkomo Mirties atvejų ir jų priežasčių valstybės registro (2019-10-21 Nr. (9.20) 01-517; žr. 3 priedą).

4.3.2. Agresyvumo, stadijos ir rizikos grupės pasikeitimas

PV agresyvumo pasikeitimas vertintas remiantis ISUP balo pokyčiu tarp PB ir RP histologinių tyrimų rezultatų. Ligos agresyvumo padidėjimas buvo nustatomas, kai operacinės medžiagos histologinio tyrimo pISUP balas buvo didesnis už PB metu nustatytą cISUP balą, t. y. pISUP > cISUP.

PV stadijos pasikeitimas vertintas remiantis T stadijos pokyčiu tarp klinikinės diagnozės ir operacinės medžiagos histologinio tyrimo rezultato. PV stadijos padidėjimas buvo nustatomas, kai, operuojant kliniškai lokalų naviką (cT1–2), operacinėje medžiagoje buvo nustatyta vietiškai išplitusi prostatos adenokarcinoma (pT3–4). Pagal 2013 m. M. T. Partino nomogramas [151] taip pat buvo apskaičiuota tikimybė operacijos metu nustatyti vietiškai išplitusį naviką.

Remiantis EAU 2019 m. [55] ir NCCN 2019 m. [56] PV rizikos vertinimo modeliais bei klinikiniais ir pataloginiais rodikliais (ISUP ir T stadija), visi tiriamieji suskirstyti į rizikos grupes: priešoperacinę mažą (cISUP 1 balas ir \leq cT2a), vidutinę (cISUP 2 ar 3 balas ir (ar) cT2b) ir didelę (cISUP 4 ar 5 ir (ar) \geq cT2c), pooperacinę mažą (pISUP 1 balas ir \leq pT2c), vidutinę (pISUP 2 ar 3 balas ir \leq pT2c) ir didelę (pISUP 4 ar 5 balas ir (ar) \geq pT3a). PV rizikos

pasikeitimas vertintas remiantis priešoperacinėmis ir pooperacinės rizikos grupėmis. PV rizikos padidėjimas buvo nustatomas, kai po operacijos buvo randama didesnė PV rizikos grupė negu buvo diagnozuota kliniškai.

4.3.3. Teigiamas chirurginis kraštas ir biocheminis ligos atkrytis

Teigiamas chirurginis kraštas vertintas remiantis operacinės medžiagos patologinio tyrimo rezultatu. Chirurginis kraštas buvo laikomas teigiamu, kai mikroskopinio tyrimo metu dažai, dengiantys histologinio preparato paviršius, turėjo tiesioginį kontaktą su prostatos adenokarcinomos ląstelėmis.

Biocheminiam ligos atkryčiui po RP nustatyti buvo vertinti tiriamųjų pooperacinės stebėsenos duomenys – pooperacinis PSA (ng/ml). Biocheminis ligos atkrytis apibrėžtas kaip dviejų iš eilės PSA koncentracijų serume padidėjimas $> 0,2$ ng/ml ir tolesnis šio rodiklio didėjimas. Paskutinį kartą pooperacinės stebėsenos duomenys atnaujinti 2019 m. spalio 25 d.

4.3.4. Laikas iki metastazių, bendrasis ir prostatos vėžio specifinis išgyvenamumas

Duomenys apie kaulines ir minkštųjų audinių metastazes vertinti remiantis radiologiniais tyrimais, atliktais po operacijos: kaulų scintigrafija, kompiuterine tomografija ir (ar) magnetinio rezonanso tomografija. Laikas iki metastazių atsiradimo apibrėžtas kaip laikas nuo RP iki minėtais radiologiniais tyrimais pirmą kartą nustatytų kaulinių ir (ar) visceralinių metastazių. Metastazės dubens limfmazgiuose laikytos kaip vietiškai išplitusi liga ir prie tolimųjų metastazių nepriskirtos.

Bendrasis ir PV specifinis išgyvenamumas vertintas remiantis tiriamųjų mirties datomis ir mirčių priežastimis. Bendrasis išgyvenamumas apibrėžtas kaip laikas nuo PV nustatymo datos iki tiriamojo mirties nuo bet kokios priežasties. PV specifinis išgyvenamumas apibrėžtas kaip laikas nuo PV nustatymo datos iki tiriamojo mirties esant progresavusiam ir sistemškai išplitusiam PV.

4.4. Biologiniai mėginiai ir jų molekulinė analizė

4.4.1. Biologinių mėginių rinkimas ir paruošimas

Iš tiriamųjų, sutikusį dalyvauti biomedicininiam tyrime, molekuliniams tyrimams buvo renkami prostatos audinių ir šlapimo mėginiai.

Prieš numatytą planinę operaciją į 100 ml sterilų šlapimo surinkimo indelį buvo renkama 30–50 ml šlapimo. Dalies tiriamųjų pirma rytinio šlapimo porcija surinkta jiems pasišlapinus po atlikto standartizuoto prostatos masažo (trys perbraukimai per kiekvieną prostatos skiltį). Iš kitų tiriamųjų šlapimo mėginiai surinkti kateterizavus šlapimo pūslę prieš chirurginę operaciją. Šlapimo mėginiai ne vėliau kaip per 30 min. buvo pristatyti į genetinę laboratoriją.

Pašalinta ir nefiksuota prostata po RP ne vėliau kaip per 30 min. buvo pristatyta į VPC, kur histologinio tyrimo metu gydytojas patologas iš tos pačios priešinės liaukos atrinko 8 mm prostatos navikinius (≥ 70 proc. navikinių ląstelių) ir nenavikinius (0 proc. navikinių ląstelių) mėginius ir juos užšaldė skystame azote.

Iš VPC perduoti prostatos mėginiai mechaniškai homogenizuoti iki miltelių. Šlapimo mėginiai 15 min. centrifuguoti 1000 rpm 4 °C temperatūroje, o surinktos nuosėdos du kartus praplautos 1×PBS buferiu (*Thermo Fisher Scientific* (TFS), Valthamas, Masačusetsas, JAV). Paruošti mėginiai saugoti –80 °C temperatūroje.

4.4.2. Biologinių mėginių molekulinė analizė

4.4.2.1. DNR gryninimas ir bisulfitinė modifikacija

DNR išskirta iš 10–30 mg skystame azote užšaldytų ir homogenizuotų prostatos audinių bei 1–2 ml užšaldytų šlapimo nuosėdų, naudojant standartinį fenolio-chloroformo metodą. Prostatos audinių ir šlapimo nuosėdų mėginiai paveikti proteinaze K (TFS) ir lizės buferiu (audiniams: 50 mM Tris-HCl (*Carl Roth*, Karlsrūhė, Vokietija), 1 mM EDTA (*Carl Roth*), 0,5 % Tween-20 (*Carl Roth*); šlapimo nuosėdoms: 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (*Carl Roth*), 1 % SDS (*Carl Roth*), 75 mM NaCl (*Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, JAV)), 18 val. lizuojant 55 °C temperatūroje termopurtyklėje. Precipitacija vykdyta ≥ 96 proc. etanoliumi, o eliucija – 40 μ l vandens be nukleazių. Išgrynintos DNR kokybiniai ir kiekybiniai parametrai patikrinti „NanoDrop 2000“ spektrofotometru (*Fisher Scientific*, FS).

400 ng DNR bisulfitinė modifikacija atlikta naudojant „EZ DNA Methylation™ Kit“ rinkinį (*Zymo Research*, Irvinas, Kalifornija, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas, išskyrus pradinę inkubaciją (42 °C, 15 min.). Modifikuota DNR iš karto naudota tolesniems tyrimams arba saugota –80 °C temperatūroje.

4.4.2.2. DNR metilinimo analizė audiniuose

RARβ, *RASSF1* ir *GSTP1* genų metilinimo analizei prostatos audiniuose naudota kokybinė metilinimui jautri polimerazės grandininė reakcija (PGR), pradmenų sekas parenkant iš mokslinės literatūros [152–154]. 25 μl tūrio galutinį reakcijos mišinį sudarė 1× „Maxima Hot Start Taq PCR buffer“ buferis (TFS), 2,5 mM MgCl₂ (TFS), 1,6 mM deoksiribonukleozidtrifosfatų mišinys (TFS), 1,25 U polimerazės „Maxima[®] Hot Start Taq DNA Polymerase“ (TFS), 1 mM kiekvieno pradmens (*Metabion*, Miunchenas, Vokietija) ir 1 μl bisulfitu modifikuotos DNR. DNR gausinimas vykdytas atliekant 37–39 PGR ciklą, pradmenų prijungimą vykdant 45 sek. 60–62 °C temperatūroje. Kiekvieno tyrimo metu taikyta trijų rūšių kontrolė: teigiama metilinimo kontrolė (*in vitro* metilinta leukocitų DNR), neigiama metilinimo kontrolė (sveikų vyrų leukocitų DNR) ir taršos kontrolė (reakcijos mišinys be DNR).

4.4.2.3. DNR metilinimo analizė šlapime

RARβ, *RASSF1* ir *GSTP1* metilinimo analizei šlapime naudota kiekybinė metilinimui jautri PGR, pradmenų ir hidrolizės zondų sekos pasirinktos iš mokslinės literatūros [99, 153, 155, 156]. 20 μl galutinio tūrio reakcijos mišinio sudarė 1× „TaqMan[®] Universal Master II no UNG“ mišinys (TFS), 50 nM hidrolizės zondo, 300 nM kiekvieno pradmens (*Metabion*) ir 1 μl modifikuotos DNR. Reakcijos temperatūrinis režimas susidėjo iš 10 min. inkubacijos 95 °C ir 50 amplifikacijos ciklą po 15 sek. 95 °C ir 1 min. 60 °C temperatūroje. Į kiekvieną reakciją įtraukta teigiama metilinta ir taršos kontrolės. Kiekybinė metilinimui jautri PGR reakcija laikyta pavykusia, jei buvo nustatyta teigiamos metilintos kontrolės amplifikacija, o taršos kontrolės amplifikacija nenustatyta. Mėginio rezultatas įskaitytas, jei referentinio geno ACTB amplifikacijos ciklą įverčiai buvo < 40 kartojant tris kartus. Santykinis metilintos DNR kiekis kiekvienam genui apskaičiuotas $\Delta\Delta Cq$ metodu [157] pagal ACTB endogeninę ir metilintą kontrolę ir išreikštas procentais. Kokybinei analizei rezultatai buvo suskirstyti į metilintus ir nemetilintus, ribine verte pasirinkus 0,1 proc. metilinimo intensyvumą.

4.5. Rezultatų vertinimas matematinės statistikos metodais

Statistinė duomenų analizė atlikti naudojant STATISTICA[™] 8.0 (*StatSoft*, Talsa, JAV), SPSS 23.0 (*IBM*, Armonkas, Njujorkas, JAV) ir MedCalc[®] 12.7 (*MedCalc Software*, Ostendė, Belgija) programines įrangas.

Kiekybiniai duomenys pateikti kaip vidurkiai kartu su standartinėmis paklaidomis (SEM; angl. *standard error of mean*), kokybiniai duomenys – dažnių lentelėmis ir (ar) procentinėmis išraiškėmis.

Kiekybinių duomenų skirstinio normalumui įvertinti naudotas Shapiro ir Wilko kriterijus (angl. *Shapiro-Wilk test*). Tikrinant dvipuses hipotezes, skirtumui tarp kiekybinių duomenų, pasiskirsčiusių pagal normalųjį dėsnį, įvertinti naudotas t-testas, kiekybiniai neparametriniai duomenys lyginti Manno ir Whitney U kriterijumi (angl. *Mann-Whitney U test*). Skirtumams tarp kategorinių duomenų įvertinti taikytas χ^2 kriterijus, tačiau dėl mažų tikėtinų dažnių rezultatams patikslinti naudotas tikslusis Fisherio testas (angl. *Fisher's test*).

Biocheminio ligos progresavimo, laiko iki metastazių atsiradimo bei bendrojo ir PV specifinio išgyvenamumo analizės atliktos panaudojant Kaplano ir Meierio (angl. *Kaplan-Meier*) kreives, skirtumai tarp kreivių vertinti Mantelio ir Coxo (angl. *Mantel-Cox*) logaritminio rango analizės kriterijumi (angl. *log-rank test*). Biocheminio ligos progresavimo ir metastazių atsiradimo rizikoms įvertinti naudoti vienalypės ir daugialypės logistinės regresijos rizikos modeliai. Apskaičiuota santykinė rizika (šansų santykis (OR); angl. *odds ratio*), pateikiama su 95 proc. pasikliautinaisiais intervalais (CI; angl. *confidence interval*).

Molekulinių žymenų tinkamumui įvertinti naudota ROC kreivių analizė, apskaičiuojant plotą po kreivėmis (AUC; angl. *area under the curve*). Molekuliniai žymenys sujungti atlikus regresinę analizę, apskaičiuotas pastarųjų jautrumas, specifiskumas, teigiama ir neigiama prognostinės vertės.

Skirtumai tarp grupių laikyti statistiškai reikšmingais, kai p reikšmė $< 0,050$.

4.6. Doktoranto ir kitų tyrėjų indėlis

Doktorantas Arnas Bakavičius dalyvavo įtraukiant tiriamuosius į biomedicininį tyrimą, surinko visus klinikinius ir patologinius duomenis. Rinko biologinę medžiagą ir atlikto pooperacinę tiriamųjų stebėseną. Arnas Bakavičius savarankiškai atliko 30 proc. molekulinį tyrimų, analizavo šių tyrimų rezultatus ir siejo juos su klinikiniais ir patologiniais duomenimis. Doktorantas buvo pagrindinis autorius, rengiant pirmą tyrimo duomenimis paremtą mokslinį straipsnį, taip pat parengė antrą mokslinę publikaciją. Pristatė biomedicininio tyrimo duomenis mokslinėse konferencijose.

Kitą molekulinį tyrimų dalį atliko Kristina Daniūnaitė ir Kristina Žukauskaitė. Kristina Daniūnaitė taip pat analizavo molekulinis duomenis ir aktyviai dalyvavo rengiant pirmą tyrimo duomenimis paremtą mokslinį straipsnį. Kristina Žukauskaitė išmokė doktorantą atlikti molekulinis tyrimus ir buvo pagrindinė koordinatorė doktorantui šiuos tyrimus atliekant.

Prof. Sonata Jarmalaitė buvo pagrindinė konsultantė, atsakinga už biomedicininio tyrimo molekulinę dalį. Profesorė kritiškai vertino parengtas mokslines publikacijas, pateikė vertingų pastabų dėl jų turinio ir pateikimo spaudai.

Prof. Feliksas Jankevičius buvo darbo vadovas, atsakingas už biomedicininio tyrimo dizainą, ir pagrindinis konsultantas, sprendžiant klinikinius klausimus. Profesorius taip pat kritiškai vertino parengtas mokslines publikacijas, pateikė vertingų pastabų dėl jų turinio ir pateikimo spaudai.

5. TYRIMO REZULTATAI

5.1. Tiriamųjų bendrosios charakteristikos

Į biomedicininį tyrimą įtraukti 1 056 tiriamieji, kuriems VULSK Urologijos centre atlikta RP. Vidutinis laikas nuo PV nustatymo datos iki operacijos – 3,8 mėn. (SEM: ± 0,2).

Iš viso surinkta 111 navikinių ir 16 nenavikinių prostatos audinių ir 514 šlapimo mėginių (188 iš jų pacientams pasišlapinus, 326 – kateterizavus šlapimo pūslę).

Bendrosios tiriamųjų klinikinės ir patloginės charakteristikos pateiktos 8 lentelėje.

8 lentelė. Bendrosios tiriamųjų klinikinės ir patloginės charakteristikos

Rodiklis	Visi tiriamieji (N = 1056)	Navikiniai audiniai (N = 111)	Kateterizuotas šlapimas (N = 326)	Pasišlapintas šlapimas (N = 188)	P reikšmė*
Amžius, metai ^a					
Vidurkis (± SEM)	62,2 (0,2)	60,6 (0,8)	61,7 (0,4)	62,2 (0,6)	0,382
PSA, ng/ml ^b					
Vidurkis (± SEM)	8,4 (0,3)	10,3 (1,0)	8,6 (0,5)	8,4 (0,7)	0,613
cISUP, N (%) ^c					
1	723 (70,5)	69 (64,5)	226 (81,0)	93 (51,4)	< 0,001
2	203 (19,8)	21 (19,6)	42 (15,0)	55 (30,4)	
3	58 (5,7)	9 (8,4)	7 (2,5)	24 (13,2)	
4	34 (3,3)	6 (5,6)	3 (1,1)	7 (3,9)	
5	7 (0,7)	2 (1,9)	1 (0,4)	2 (1,1)	
pISUP, N (%) ^a					
1	539 (51,0)	38 (34,2)	207 (67,0)	39 (21,4)	< 0,001
2	405 (38,4)	50 (45,1)	86 (27,8)	108 (59,3)	
3	76 (7,2)	16 (14,4)	13 (4,2)	28 (15,4)	
4	14 (1,3)	2 (1,8)	1 (0,3)	1 (0,6)	
5	22 (2,1)	5 (4,5)	2 (0,7)	6 (3,3)	
cT stadija, N (%) ^a					
≤ cT1c	637 (60,3)	59 (53,2)	189 (61,2)	112 (61,5)	0,597
cT2a	11 (1,1)	2 (1,8)	4 (1,3)	3 (1,7)	
cT2b	128 (12,1)	17 (15,3)	28 (9,0)	30 (16,5)	
cT2c	188 (17,8)	20 (18,0)	73 (23,6)	25 (13,7)	
cT3a	78 (7,4)	13 (11,7)	12 (3,9)	10 (5,5)	
cT3b	13 (1,2)	–	3 (1,0)	2 (1,1)	
cT4	1 (0,1)	–	–	–	

Rodiklis	Visi tiriamieji (N = 1056)	Navikiniai audiniai (N = 111)	Kateterizuotas šlapimas (N = 326)	Pasišlapintas šlapimas (N = 188)	P reikšmė*
pT stadija, N (%) ^a					
pT2a	80 (7,6)	4 (3,6)	36 (11,7)	3 (1,7)	0,006
pT2b	12 (1,1)	–	1 (0,3)	3 (1,7)	
pT2c	698 (66,1)	63 (56,8)	199 (64,4)	122 (67,0)	
pT3a	169 (16,0)	30 (27,0)	48 (15,5)	37 (20,3)	
pT3b	95 (9,0)	13 (11,7)	24 (7,8)	17 (9,3)	
pT4	2 (0,2)	1 (0,9)	1 (0,3)	–	
Priešoperacinė PV rizikos grupė, N (%) ^c					
Maža	501 (48,9)	44 (41,1)	152 (54,5)	70 (38,7)	0,104
Vidutinė	243 (23,7)	29 (27,1)	47 (16,8)	71 (39,2)	
Didelė	281 (27,4)	34 (31,8)	80 (28,7)	40 (22,1)	
Pooperacinė PV rizikos grupė, N (%) ^a					
Maža	489 (46,3)	35 (31,5)	183 (59,2)	38 (20,9)	< 0,001
Vidutinė	290 (27,5)	30 (27,0)	52 (16,8)	88 (48,3)	
Didelė	277 (26,2)	46 (41,5)	74 (24,0)	56 (30,8)	
Partino reikšmė, % ^d					
Vidutinė (± SEM)	27,2 (0,4)	29,3 (1,3)	26,3 (0,8)	29,1 (1,0)	0,024

Santrumpos: cISUP – klinikinis ISUP balas; cT – klinikinė T stadija; ISUP – Tarptautinė urologinės patologijos draugija, angl. *International Society for Urological Pathology*; N – tiriamųjų skaičius; pISUP – patologinis ISUP balas; PSA – prostatos specifinis antigenas; pT – patloginė T stadija; PV – prostatos vėžys; SEM – vidurkio standartinė paklaida, angl. *standard error of mean*; T – pirminio naviko išplitimo stadija pagal TNM klasifikaciją.

^a Amžius, pISUP balas, cT stadija, pT stadija ir pooperacinė PV rizikos grupė neįvertinta 17 tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti kateterizuojant šlapimo pūslę, ir 6 tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti pasišlapinus.

^b PSA neįvertintas 10 tiriamųjų visoje kohortoje, 25 tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti kateterizuojant šlapimo pūslę, ir 6 tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti pasišlapinus.

^c cISUP balas, priešoperacinė PV rizikos grupė neįvertinta 31 tiriamojo visoje kohortoje, 4 tiriamųjų navikinių audinių grupėje, 47 tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti kateterizuojant šlapimo pūslę, ir 7 tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti pasišlapinus.

^d Partino vertė neįvertinta 145 tiriamųjų visoje kohortoje, 15 tiriamųjų navikinių audinių grupėje, 63 tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti kateterizuojant šlapimo pūslę, ir 17 tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti pasišlapinus.

* P reikšmė apskaičiuota tik tarp tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti kateterizuojant šlapimo pūslę, ir tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti pasišlapinus. P reikšmės < 0,050 paryškintos.

Vienas iš biomedicininio tyrimo uždavinių – ištirti *RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1* genų promotorių metilinimą dviejose nepriklausomose PV imtyse, kuriose šlapimo mėginiai surinkti skirtingais metodais. Taigi tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti kateterizuojant, ir tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai

surinkti pasišlapinus, grupės lygintos tarpusavyje, siekiant įvertinti galimus jų skirtumus. Amžius ir PSA rodiklis nesiskyrė, tačiau tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai surinkti pasišlapinus, grupėje nustatyta daugiau PV atvejų su didesniu cISUP ($p < 0,001$) ir pISUP ($p < 0,001$) balais bei didesne pT stadija ($p = 0,006$), taigi ir didesne pooperacine PV rizika ($p < 0,001$) bei didesne Partino tikimybe ($p = 0,024$) diagnozuoti vietiškai išplitusį PV (8 lentelė).

5.2. Prostatos vėžio agresyvumo, stadijos ir rizikos pasikeitimas

PV agresyvumo padidėjimas po radikalaus chirurginio gydymo nustatytas 27,2 proc. (279/1025) tiriamųjų. Šio pokyčio dėl klinikinių duomenų trūkumo nebuvo galima įvertinti 31 iš 1 056 ligonių. 20,3 proc. (214/1056) tiriamųjų po radikalaus chirurginio gydymo nustatytas ligos stadijos padidėjimas. Bendras klaidingos klinikinės diagnozės dažnis, kai randamas PV agresyvumo ir (ar) stadijos padidėjimas, stebėtas 39,0 proc. (400/1025) ligonių.

86,4 proc. (241/279) tiriamųjų, kuriems po operacinio gydymo nustatyta didesnio agresyvumo liga, kliniškai diagnozuotas cISUP 1 navikas, kai didžiajai daliai (86,3 %, 208/241) tiriamųjų ligos agresyvumas pasikeitė į pISUP 2. Tiriamųjų PV agresyvumo pasikeitimo dažniai pateikti 6 paveiksle.

	pISUP 1 % (N)	pISUP 2 % (N)	pISUP 3 % (N)	pISUP 4 % (N)	pISUP 5 % (N)	Bendras rizikos padidėjimas, % (N)
cISUP 1	66.7 (482)	28.8 (208)	3.6 (26)	0.5 (4)	0.4 (3)	33.3 (241)
cISUP 2	14.3 (29)	73.4 (149)	8.4 (17)	1.5 (3)	2.4 (5)	12.3 (25)
cISUP 3	12.1 (7)	41.4 (24)	36.2 (21)	3.4 (2)	6.9 (4)	10.3 (6)
cISUP 4	2.9 (1)	35.3 (12)	29.4 (10)	11.8 (4)	20.6 (7)	20.6 (7)
cISUP 5	0	28.6 (2)	14.3 (1)	14.3 (1)	42.8 (3)	–

sumažėjimas	padidėjimas	be pokyčio
50%	0% 50%	

6 pav. Prostatos vėžio agresyvumo pasikeitimo dažniai po radikalių prostatektomijos, priklausomai nuo cISUP grupės (Intensyvesnė raudona spalva žymi didesnį ligos agresyvumo padidėjimo dažnį, intensyvesnė mėlyna spalva – didesnį ligos agresyvumo sumažėjimo dažnį, pilka spalva žymimi atvejai, kai agresyvumo pokyčio nėra. Santrumpos: cISUP – klinikinis ISUP balas; ISUP – Tarptautinė urologinės patologijos draugija, angl. *International Society of Urological Pathology*; N – tiriamųjų skaičius; pISUP – pataloginis ISUP balas)

49,1 proc. (105/214) tiriamųjų, kuriems po operacijos nustatytas ligos stadijos padidėjimas, kliniškai diagnozuotas cT1c stadijos PV. Ligos stadijos pasikeitimo dažniai pateikti 7 paveiksle.

	pT2a-2b, % (N)	pT2c, % (N)	pT3a, % (N)	pT3b, % (N)	pT4, % (N)	Bendras stadijos padidėjimas, % (N)
cT1-2a	10.6 (69)	72.7 (471)	12.7 (82)	4.0 (26)	0	16.7 (108)
cT2b	7.0 (9)	65.6 (84)	23.5 (30)	3.9 (5)	0	27.3 (35)
cT2c	6.4 (12)	55.8 (105)	21.8 (41)	16.0 (30)	0	37.8 (71)
cT3a	2.6 (2)	42.3 (33)	19.2 (15)	33.3 (26)	2.6 (2)	–
cT3b	0	38.5 (5)	7.7 (1)	53.8 (7)	0	–
cT4	0	0	0	100 (1)	0	–

sumažėjimas

50%

padidėjimas

50%

be pokyčio

7 pav. Prostatos vėžio stadijos pasikeitimo dažniai po radikalios prostatektomijos, priklausomai nuo cT stadijos (Intensyvesnė raudona spalva žymi didesnį ligos stadijos padidėjimo dažnį, intensyvesnė mėlyna spalva – didesnį ligos stadijos sumažėjimo dažnį, pilka spalva žymimi atvejai, kai stadijos pokyčio nėra. Santrumpos: cT – klinikinė T stadija; N – tiriamųjų skaičius; pT – pataloginė T stadija; T stadija – pirminio naviko išplitimo stadija pagal TNM klasifikaciją)

Vertinant PV rizikos pasikeitimą, 23,9 proc. tiriamųjų (245/1025) nustatyta didesnė pooperacinė PV rizika negu diagnozuota kliniškai. Dėl klinikinių duomenų trūkumo šio pokyčio nebuvo galima įvertinti 31/1056 ligonių. Didžiajai daliai tiriamųjų (69,8 %, 171/245), kurių rizika padidėjo, kliniškai diagnozuotas mažos rizikos PV. Ligos agresyvumo padidėjimas buvo pagrindinis veiksnys (45,3 %, 111/245), lemiantis PV rizikos pokytį, kai stadijos padidėjimas sudarė 32,2 proc. (79/245), o ligos agresyvumo ir stadijos padidėjimas kartu – 22,5 proc. (55/245) atveju.

5.3. Teigiamas chirurginis kraštas

Teigiamo chirurginio krašto, biocheminio ligos atkryčio, tolimųjų metastazių, laiko iki metastazių atsiradimo ir išgyvenamumo analizėje dalyvavo 676/1056 tiriamieji, turintys pooperacinės stebėsenos duomenis.

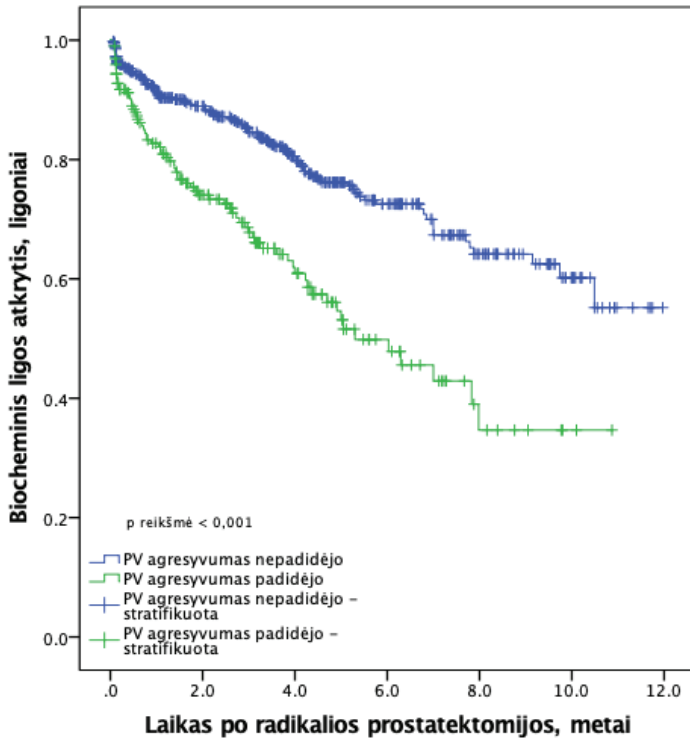
Teigiamas chirurginis kraštas nustatytas 32,1 proc. (217/676) tiriamųjų. Prostatos viršūnė buvo dažniausia teigiamo chirurginio krašto vieta (56,0 %; 108/193). Posterolateraliai teigiamas chirurginis kraštas rastas 48,2 proc. (93/193), bazėje – 15,0 proc. (29/193), o sėklinėse pūslelėse – 4,7 proc. (9/193) atvejų. Dėl histologinių tyrimų atsakymuose trūkstamos informacijos 24/217 tiriamųjų tiksli teigiamo chirurginio krašto vieta nebuvo identifikuota.

Nustatytas reikšmingas PV agresyvumo ir stadijos padidėjimo ryšys su teigiamu chirurginiu kraštu. 41,6 proc. tiriamųjų, kuriems po operacijos nustatyta agresyvesnė liga, palyginti su 28,2 proc. tiriamųjų, kurių ligos agresyvumas nepadidėjo, operacinėje medžiagoje nustatytas teigiamas chirurginis kraštas ($p = 0,001$). Panašūs rezultatai stebėti ir su PV stadijos pokyčiu: tiriamiesiems, kuriems nustatytas ligos stadijos padidėjimas, teigiamas chirurginis kraštas buvo rastas 44,3 proc. (66/149) atvejų, o stadijai nepakitęs – 28,7 proc. (151/527) atvejų ($p < 0,001$).

5.4. Biocheminis ligos atkrytis

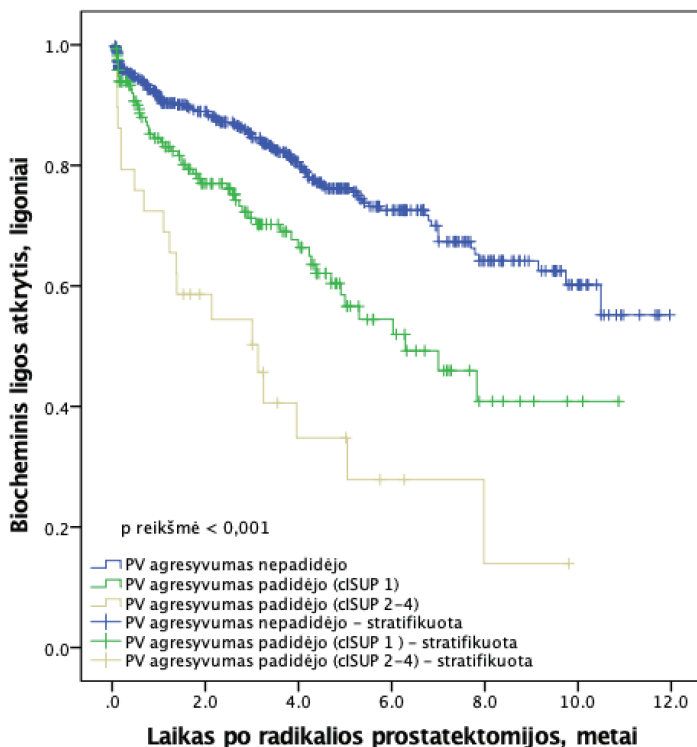
Biocheminis ligos atkrytis po radikalaus chirurginio gydymo diagnozuotas 25,7 proc. (174/676) tiriamųjų. Biocheminio atkryčio metu 77,3 proc. (126/163) ligonių PSA buvo $< 0,5$ ng/ml, kai 12,3 proc. (20/162) tiriamųjų pastarasis rodiklis siekė 0,5–2,0 ng/ml, o 10,4 proc. (17/163) tiriamųjų $> 2,0$ ng/ml. Dėl klinikinių duomenų trūkumo 11/174 ligonių tiksli PSA vertė biocheminio ligos atkryčio nustatymo metu nebuvo žinoma. Vidutinis ligonių, kuriems biocheminis ligos atkrytis nefiksuotas, pooperacinis stebėjimo laikas – 46,8 mėn. (SEM \pm 1,6).

Biocheminis ligos atkrytis diagnozuotas 37,6 proc. (74/197) tiriamųjų, kuriems po operacijos nustatyta agresyvesnė liga, ir tik 20,9 proc. (100/479) ligonių, kurių PV agresyvumas nepadidėjo ($p < 0,001$). Vidutinis laikas nuo RP iki biocheminio ligos atkryčio – 2,1 m. (SEM \pm 0,2) tiriamųjų, kuriems ligos agresyvumas padidėjo, grupėje ir 2,7 m. (SEM \pm 0,3) tiriamiesiems, kuriems ligos agresyvumo padidėjimas nenustatytas (8 pav., $p < 0,001$).



8 pav. Biocheminis ligos atkrytis po radikalaus prostatektomijos, priklausomai nuo PV agresyvumo pokyčio (Mėlyna kreivė žymi tiriamuosius, kuriems ligos agresyvumo padidėjimas nustatytas, žalia kreivė – tiriamuosius (cISUP 1–4), kurių PV agresyvumas padidėjo. Santrumpos: cISUP – klinikinis ISUP balas; ISUP – Tarptautinė urologinės patologijos draugija, angl. *International Society of Urological Pathology*; PV – prostatos vėžys)

Ligonių, kuriems ligos agresyvumas padidėjo, tačiau kliniškai diagnozuotas mažos rizikos (cISUP 1) PV, išgyvenamumo be biocheminio ligos atkryčio rodikliai buvo geresni, palyginti su tiriamųjų, kuriems kliniškai diagnozuota vidutinės ir didelės rizikos (cISUP 2–4) prostatos karcinoma (9 pav., $p < 0,001$).

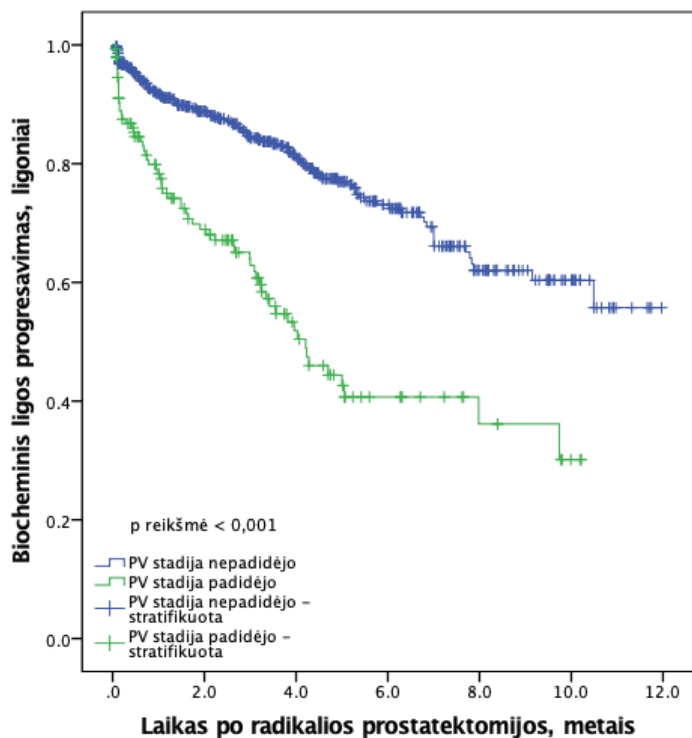


9 pav. Biocheminis ligos atkrytis po radiklios prostatektomijos, priklausomai nuo PV agresyvumo pokyčio (Mėlyna kreivė žymi tiriamuosius, kuriems ligos agresyvumo padidėjimas nenumatytas, žalia (cISUP 1) ir geltona (cISUP 2–4) – tiriamuosius, kurių PV agresyvumas padidėjo. Santrumpos: cISUP – klinikinis ISUP balas; ISUP – Tarptautinė urologinės patologijos draugija, angl. *International Society of Urological Pathology*; PV – prostatos vėžys)

PV stadijos padidėjimas po RP taip pat parodė reikšmingą ryšį su biocheminiu ligos atkryčiu. Atkrytis nustatytas 43,6 proc. (65/149) tiriamųjų, kurių PV stadija padidėjo, ir tik 20,7 proc. (109/527) ligonių, kuriems ligos stadijos padidėjimas nenumatytas ($p < 0,001$). Vidutinis laikas nuo RP iki biocheminio ligos atkryčio – 1,9 m. (SEM \pm 0,3) tiriamųjų grupėje, kurių PV stadija padidėjo, ir 2,8 m. (SEM \pm 0,2) tiriamiesiems, kuriems ligos stadijos padidėjimas nenumatytas (10 pav., $p < 0,001$).

Siekiant įvertinti pavienių ir visų kintamųjų santykinę riziką (OR) biocheminiam ligos atkryčiui prognozuoti (9 lentelė), atlikta vienalypė ir daugialypė logistinės regresijos analizės. Nustatyta, kad teigiamas chirurginis kraštas turi didžiausią prognostinę vertę tiek kaip nepriklausomas kintamasis (OR = 3,27; 95 % CI: 2,28–4,69; $p < 0,001$), tiek būdamas visų kintamųjų sudėtyje (OR = 2,29; 95 % CI: 1,55–3,40; $p < 0,001$). Daugialypėje analizėje

PV agresyvumo padidėjimas biocheminio ligos atkryčio riziką padidino 1,92 karto (95 % CI: 1,29–2,86; $p = 0,001$), o PV stadijos padidėjimas – 2,14 karto (95 % CI: 1,39–3,27; $p < 0,001$).



10 pav. Biocheminis ligos atkrytis po radiklios prostatektomijos, priklausomai nuo PV stadijos pokyčio (Mėlyna kreivė žymi tiriamuosius, kuriems ligos stadijos padidėjimas nenumatytas, žalia – tiriamuosius, kurių PV stadija padidėjo. Santrumpa PV – prostatos vėžys)

9 lentelė. Vienalypė ir daugialypė logistinės regresijos analizė biocheminiam ligos atkryčiui prognozuoti

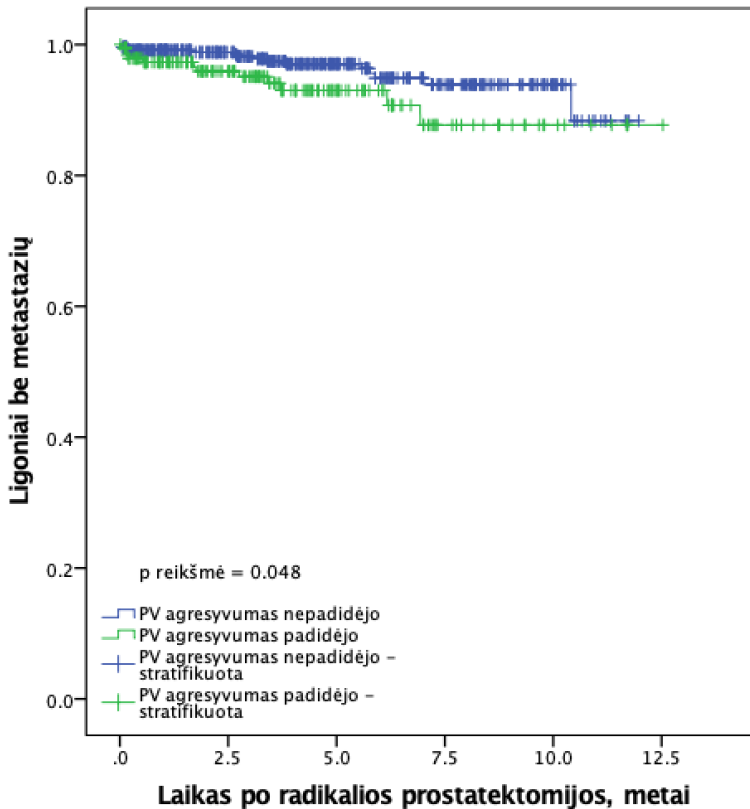
Rodiklis	Vienalypė analizė			Daugialypė analizė		
	OR	95 % CI	P reikšmė	OR	95 % CI	P reikšmė
PSA, ng/ml	1,10	[1,07–1,13]	< 0,001	1,09	[1,05–1,13]	< 0,001
Teigiamas chirurginis kraštas	3,27	[2,28–4,69]	< 0,001	2,29	[1,55–3,40]	< 0,001
Agresyvumo padidėjimas	2,28	[1,59–3,28]	< 0,001	1,92	[1,29–2,86]	0,001
Stadijos padidėjimas	2,97	[2,02–4,37]	< 0,001	2,14	[1,39–3,27]	< 0,001

P reikšmės < 0,050 paryškintos. Santrumpas: CI – pasikliautiniai intervalai (angl. *confidence interval*); OR – šansų santykis (angl. *odds ratio*); PSA – prostatos specifinis antigenas.

5.5. Tolimosios metastazės ir laikas iki metastazių atsiradimo

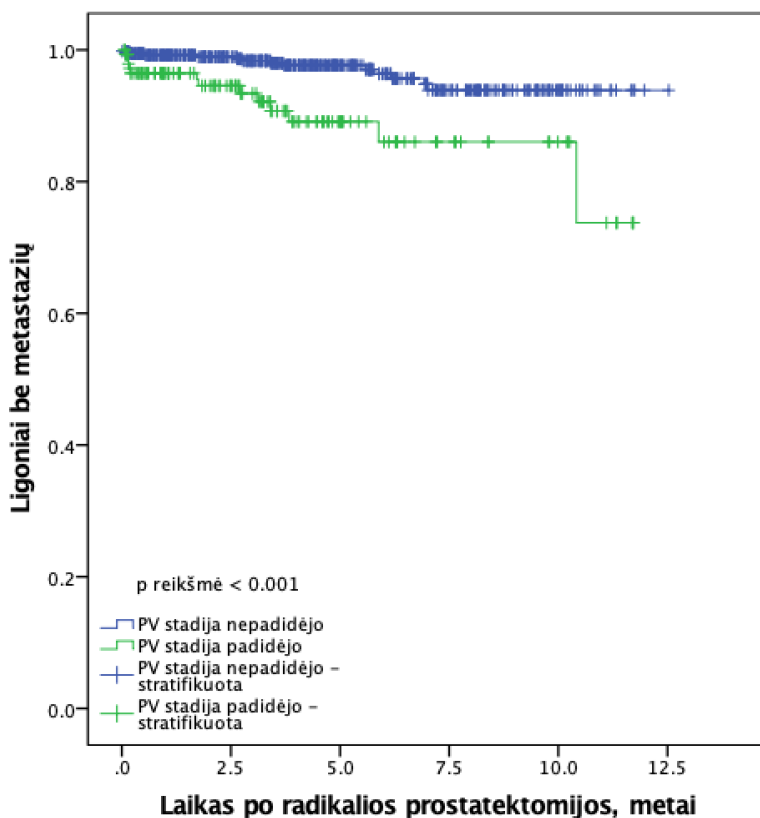
Kaulinės ir (ar) visceralinės metastazės išsivystė 4,0 proc. (27/676) tiriamųjų, įtrauktų į biomedicininį tyrimą.

Metastazės diagnozuotos 6,1 proc. (12/197) tiriamųjų, kuriems po operacijos nustatyta agresyvesnė liga, ir tik 3,1 proc. (15/479) ligonių, kuriems PV agresyvumas nepadidėjo ($p = 0,074$). Vidutinis laikas nuo RP iki metastazių atsiradimo – 11,5 m. (95 % CI: 10,9–12,1) tiriamųjų, kurių ligos agresyvumas padidėjo, grupėje, ir 11,4 m. (95 % CI: 11,1–11,7) tiriamiesiems, kuriems ligos agresyvumo padidėjimas nenustatytas (11 pav., $p < 0,001$).



11 pav. Laikas be metastazių, priklausomai nuo PV agresyvumo pokyčio (Mėlyna kreivė žymi tiriamuosius, kuriems ligos agresyvumo padidėjimas nenustatytas, žalia – tiriamuosius, kurių PV agresyvumas padidėjo. Santrumpa PV – prostatos vėžys)

PV stadijos padidėjimas po RP taip pat parodė reikšmingą ryšį su sistemiškai išplitusia PV liga: metastazių nustatyta 8,7 proc. (13/149) tiriamųjų, kuriems rastas stadijos padidėjimas, ir tik 2,7 proc. (14/527) ligonių, kuriems ligos stadijos padidėjimas nenumatytas ($p = 0,001$). Vidutinis laikas nuo RP iki metastazių atsiradimo – 10,3 m. (95 % CI: 9,6–11,1) tiriamųjų, kurių PV stadija padidėjo, grupėje ir 12,1 m. (95 % CI: 11,8–12,3) ligoniams, kuriems ligos stadijos padidėjimas nenumatytas (12 pav., $p < 0,001$).

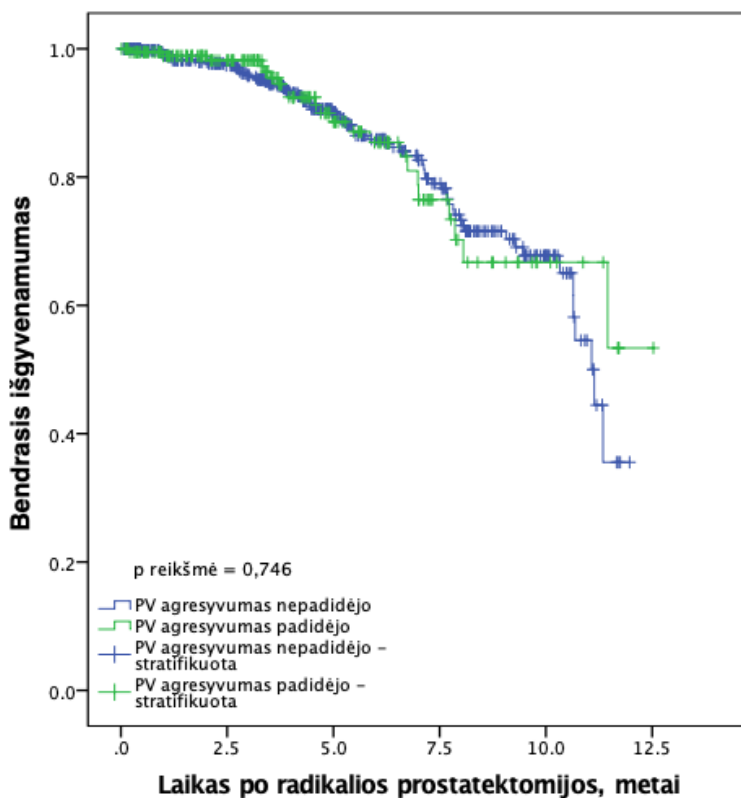


12 pav. Laikas be metastazių, priklausomai nuo PV stadijos pokyčio (Mėlyna kreivė žymi tiriamuosius, kuriems ligos stadijos padidėjimas nenumatytas, žalia – tiriamuosius, kurių PV stadija padidėjo. Santrumpa PV – prostatos vėžys)

Daugialypės logistinės regresijos metu, siekiant įvertinti visų kintamųjų santykinę riziką laikui iki metastazių prognozuoti, ligos stadijos padidėjimas ($OR = 3,40$; 95 % CI: 1,52–7,61; $p = 0,003$) ir PSA ($OR = 1,05$; 95 % CI: 1,01–1,08; $p = 0,004$) turėjo didžiausią prognostinę vertę. Ligos agresyvumo padidėjimas iš modelio buvo pašalintas.

5.6. Bendrasis ir prostatos vėžio specifinis išgyvenamumas

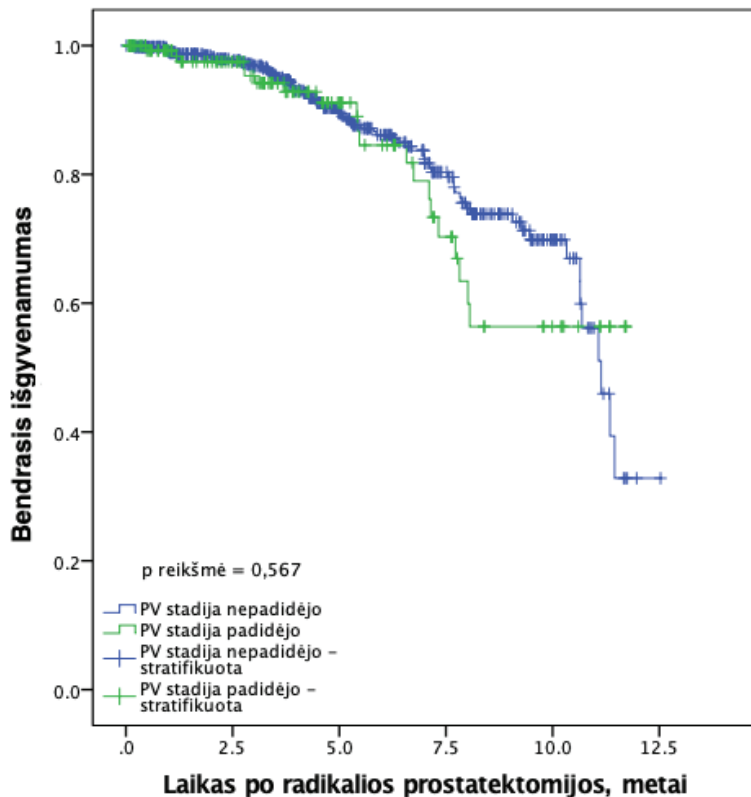
Vidutinis pooperacinės stebėsenos laikas – 53,4 mėn. (SEM \pm 1,5). Tiriamųjų, kuriems PV agresyvumas padidėjo, bendrojo išgyvenamumo vidurkis siekė 10,2 m. (95 % CI: 9,3–11,0), o ligonių, kuriems agresyvumas nepadidėjo, – 9,7 m. (95 % CI: 9,3–10,2). 5 ir 10 metų bendrasis išgyvenamumas tarp grupių reikšmingai nesiskyrė: atitinkamai 88,6 proc. ir 66,7 proc. ligonių, kuriems ligos agresyvumas padidėjo, bei 90,1 proc. ir 67,7 proc. ligonių, kuriems agresyvumas nepadidėjo (13 pav., $p = 0,746$).



13 pav. Tiriamųjų bendrasis išgyvenamumas, priklausomai nuo ligos agresyvumo pokyčio (Mėlyna kreivė žymi tiriamuosius, kuriems ligos agresyvumo padidėjimas nenustatytas, žalia – tiriamuosius, kurių PV agresyvumas padidėjo. Santrumpa PV – prostatos vėžys)

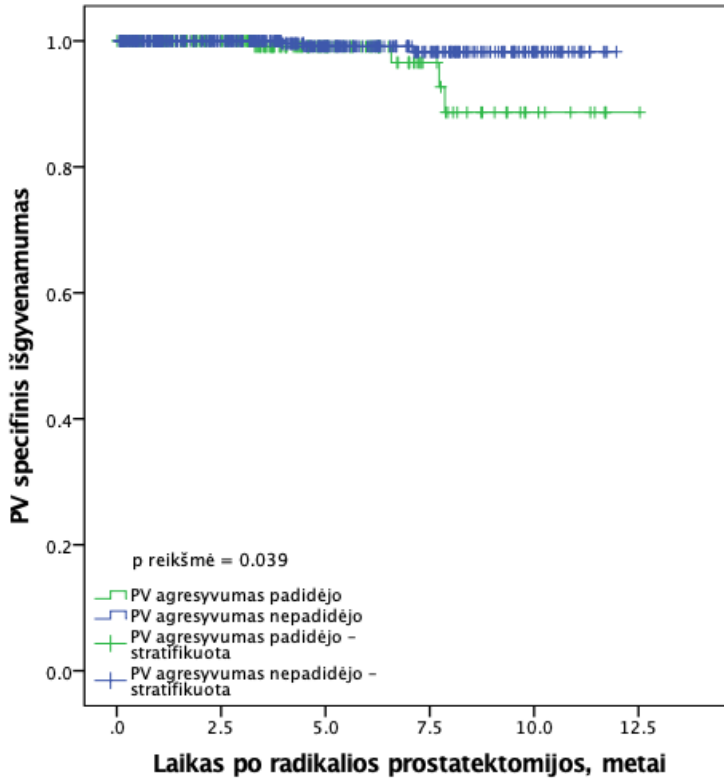
Panašūs rezultatai nustatyti ir esant PV stadijos pokyčiui. Ligonų, kurių ligos stadija padidėjo, bendrojo išgyvenamumo vidurkis siekė 9,3 m. (95 % CI: 8,5–10,2), o ligonių, kuriems stadija nepadidėjo, – 10,0 m. (95 % CI: 9,5–

10,5). 5 ir 10 metų bendrasis išgyvenamumas tarp grupių taip pat reikšmingai nesiskyrė: atitinkamai 91,2 proc. ir 56,4 proc. ligonių, kurių ligos stadija padidėjo, bei 89,5 proc. ir 69,9 proc. ligonių, kuriems stadija nepadidėjo ($p = 0,567$) (žr. 14 pav.).



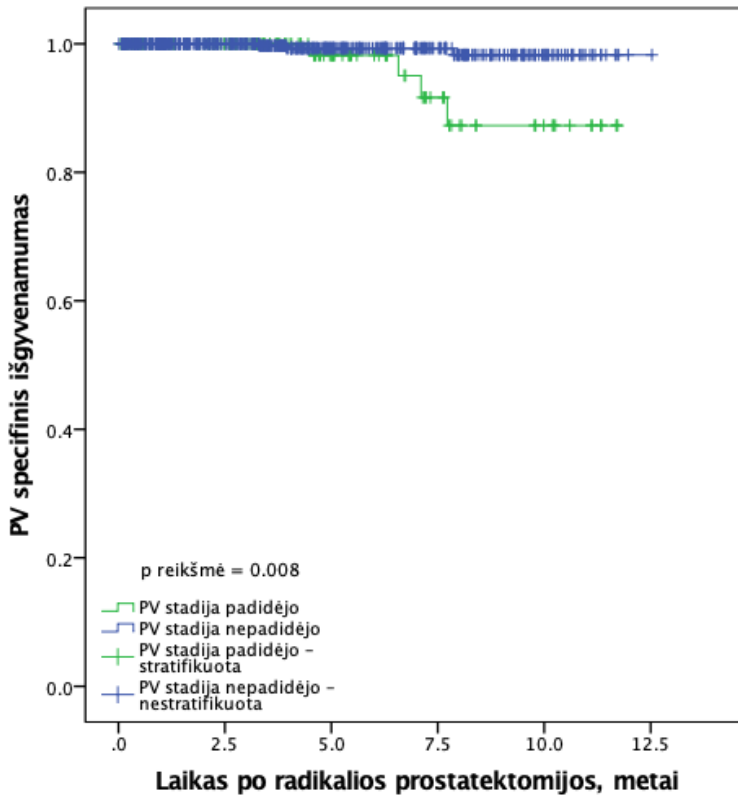
14 pav. Tiriamųjų bendrasis išgyvenamumas, priklausomai nuo ligos stadijos pokyčio (Mėlyna kreivė žymi tiriamuosius, kuriems ligos stadijos padidėjimas nenustatytas, žalia – tiriamuosius, kurių PV stadija padidėjo. Santrumpa PV – prostatos vėžys)

Ligonių, kuriems ligos agresyvumas padidėjo, PV specifinio išgyvenamumo vidurkis siekė 11,9 m. (95 % CI: 11,3–12,5), o ligonių, kuriems agresyvumas nepadidėjo, – 11,9 m. (95 % CI: 11,7–12,0). 5 metų PV specifinis išgyvenamumas tarp grupių nesiskyrė (plg. 99,1 proc. ir 99,1 proc.). 10 metų PV specifinis išgyvenamumas buvo daug blogesnis tiriamųjų, kuriems pastebėtas ligos agresyvumo padidėjimas, grupėje (plg. atitinkamai 88,7 proc. ir 98,3 proc., $p = 0,039$) (žr. 15 pav.).



15 pav. Prostatos vėžio specifinis išgyvenamumas, priklausomai nuo ligos agresyvumo pokyčio (Mėlyna kreivė žymi tiriamuosius, kuriems ligos agresyvumo padidėjimas nenustatytas, žalia – tiriamuosius, kurių PV agresyvumas padidėjo. Santrumpa PV – prostatos vėžys)

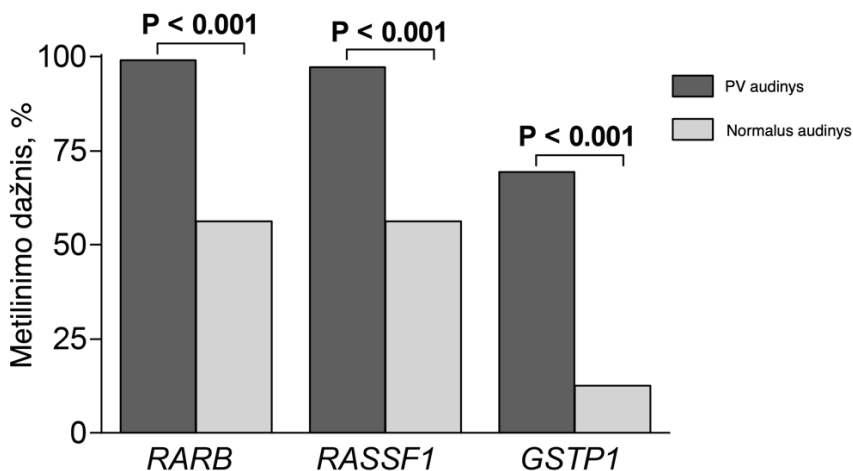
Ligonių, kurių ligos stadija padidėjo, grupėje PV specifinio išgyvenamumo vidurkis siekė 11,1 m. (95 % CI: 10,5–11,7), o ligonių, kuriems stadija nepadidėjo, – 12,4 m. (95 % CI: 12,3–12,5). 5 metų PV specifinis išgyvenamumas tarp grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė (plg. 98,2 proc. ir 99,3 proc.). 10 metų PV specifinis išgyvenamumas buvo daug blogesnis tiriamųjų, kuriems ligos stadija padidėjo, grupėje (plg. atitinkamai 87,3 proc. ir 98,3 proc., $p = 0,008$) (žr. 16 pav.).



16 pav. Prostatos vėžio specifinis išgyvenamumas, priklausomai nuo ligos stadijos pokyčio (Mėlyna kreivė žymi tiriamuosius, kuriems ligos stadija padidėjimas nustatytas, žalia – tiriamuosius, kurių PV stadija padidėjo. Santrumpa PV – prostatos vėžys)

5.7. DNR metilinimas prostatos audiniuose

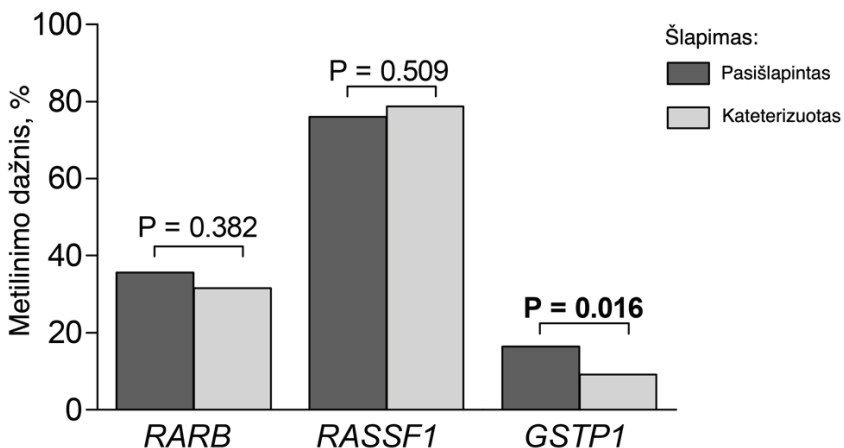
Siekiant įvertinti naviką slopinančių genų (angl. *tumor suppressor genes*) tinkamumą PV diagnostikai, prostatos audiniuose tirtas *RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1* genų promotorių metilinimas. Visų genų metilinimo dažniai statistiškai patikimai skyrėsi normaliuose prostatos ir PV audiniuose (visais atvejais $p < 0,001$) (žr. 17 pav.). Tai leido atlikti pastarųjų genų analizę šlapime.



17 pav. DNR genų (*RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*) metilinimo dažniai normaliuose prostatos ir PV audiniuose (P reikšmės $< 0,050$ paryškintos; santrumpa PV – prostatos vėžys)

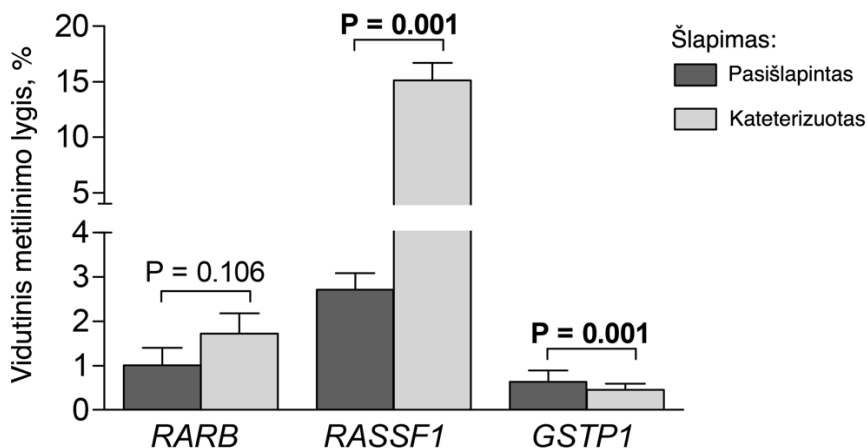
5.8. DNR metilinimas šlapimo mėginiuose

Lyginant šlapimo mėginius, surinktus pacientams pasišlapinus ir kateterizuojant šlapimo pūslę, statistiškai reikšmingas skirtumas nustatytas tik tarp *GSTP1* metilinimo dažnių ($p = 0,016$). *RARB* ir *RASSF1* statistiškai reikšmingų skirtumų neparodė (žr. 18 pav.).



18 pav. DNR genų (*RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*) metilinimo dažniai šlapimo mėginiuose (P reikšmės $< 0,050$ paryškintos)

Metilintas bent vienas iš trijų genų buvo nustatytas 80,3 proc. (151/188) pasišlapinto ir 83,7 proc. (273/326) kateterizuoto šlapimo mėginių. Vidutinis metilinimo lygis svyravo nuo 0,6 proc. iki 15,1 proc., kai pastarasis *RASSF1* ir *GSTP1* genuose statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp pasišlapinto ir kateterizuoto šlapimo mėginių (abiem atvejais $p = 0,001$) (žr. 19 pav.).

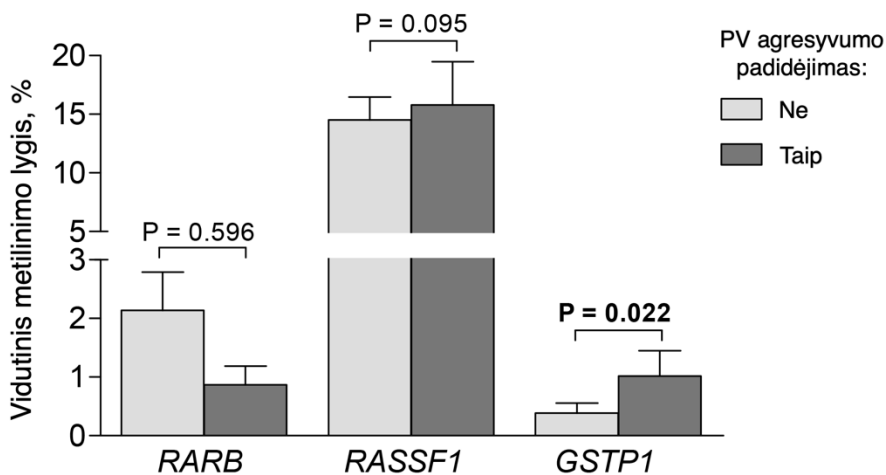


19 pav. DNR genų (*RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*) vidutiniai metilinimo lygiai pasišlapinto ir kateterizuoto šlapimo mėginiuose (P reikšmės < 0,050 paryškintos)

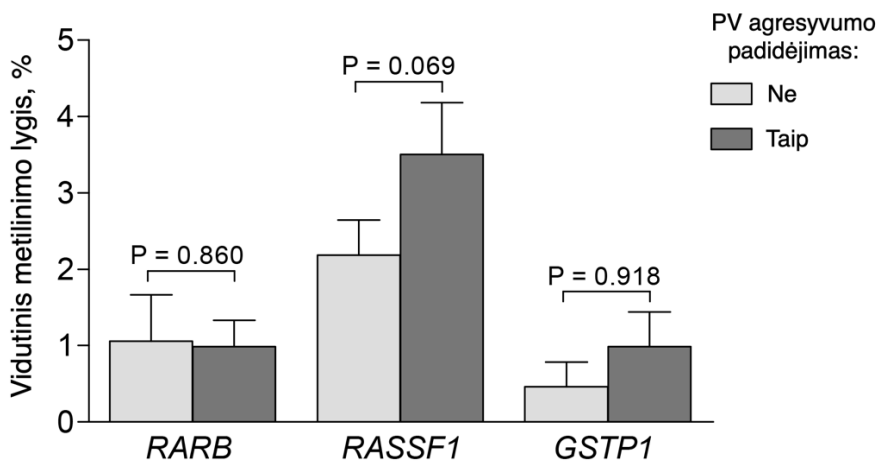
5.9. DNR metilinimas šlapime ir prostatos vėžio agresyvumas

Pavieniai genai bei dviejų (*RASSF1* ir *GSTP1*) ir trijų (*RARB*, *RASSF1*, *GSTP1*) genų deriniai toliau tirti PV agresyvumo, stadijos ir rizikos padidėjimui įvertinti.

Vidutinis *GSTP1* metilinimo lygis kateterizuotame šlapime statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp ligonių su padidėjusiu ir nepakitusiu ligos agresyvumu ($p = 0,022$) (žr., 20 pav.), kai pasišlapinto šlapimo imtyje statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo nustatyta (žr. 21 pav.).



20 pav. DNR genų (*RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*) vidutiniai metilinimo lygiai kateterizuotame šlapime priklausomai nuo PV agresyvumo pokyčio (P reikšmės < 0,050 paryškintos; santrumpa PV – prostatos vėžys)



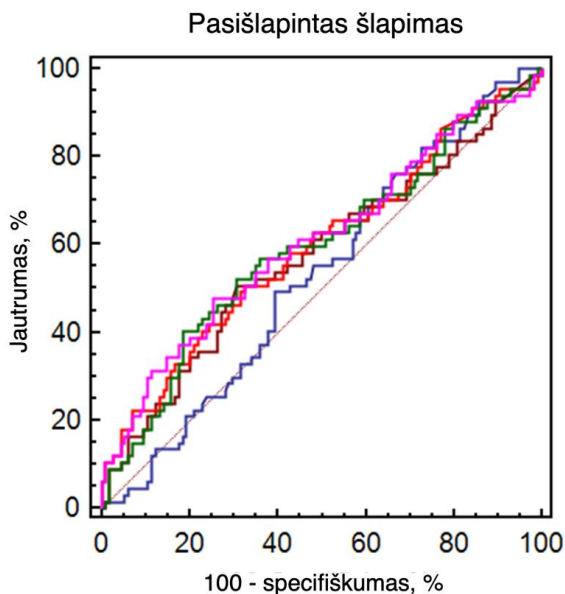
21 pav. DNR genų (*RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*) vidutiniai metilinimo lygiai pasišlapintame šlapime priklausomai nuo PV agresyvumo pokyčio (santrumpa PV – prostatos vėžys)

Analizuojant ROC kreives, nė vienas iš genų atskirai (žr. 10 lentelę) neatskleidė reikšmingų rezultatų PV agresyvumo padidėjimui prognozuoti, tačiau trijų genų (*RARB*, *RASSF1*, *GSTP1*) derinys abiejose imtyse (žr. 22 ir 23 pav.), taip pat ir PSA šlapimo, surinkto kateterizuojant, imtyje (žr. 23 pav.) bei jo kombinacijos su pavieniais genais (žr. 10 lentelę) bei dviejų ir trijų genų deriniais (žr. 22 ir 23 pav.) turėjo statistiškai reikšmingą prognostinę vertę (visais atvejais $p < 0,050$).

10 lentelė. ROC kreivių analizė pavienių genų ir jų kombinacijų su PSA ligos agresyvumui, stadijai ir rizikos padidėjimui prognozuoti

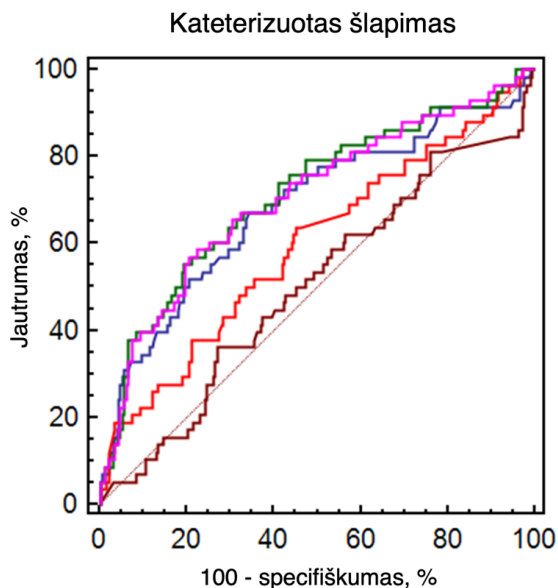
Genas	Pasišlapintas šlapimas				Katerizuotas šlapimas			
	Geno metilimas		Geno metilimas + PSA		Geno metilimas		Geno metilimas + PSA	
	AUC	P reikšmė	AUC	P reikšmė	AUC	P reikšmė	AUC	P reikšmė
Agresyvumo padidėjimas								
<i>RARB</i>	0,508	0,862	0,532	0,470	0,521	0,600	0,682	< 0,001
<i>RASSF1</i>	0,581	0,074	0,600	0,025	0,571	0,082	0,692	< 0,001
<i>GSTP1</i>	0,503	0,919	0,517	0,704	0,550	0,065	0,715	< 0,001
Stadijos padidėjimas								
<i>RARB</i>	0,551	0,330	0,596	0,053	0,554	0,154	0,626	0,002
<i>RASSF1</i>	0,586	0,106	0,608	0,029	0,540	0,313	0,632	0,001
<i>GSTP1</i>	0,575	0,062	0,608	0,033	0,533	0,174	0,627	0,018
Rizikos padidėjimas								
<i>RARB</i>	0,558	0,194	0,518	0,692	0,510	0,816	0,589	0,045
<i>RASSF1</i>	0,538	0,434	0,537	0,426	0,523	0,599	0,597	0,025
<i>GSTP1</i>	0,539	0,189	0,521	0,634	0,557	0,047	0,623	0,004

P reikšmės < 0,050 paryškintos; santrumpa PSA – prostatos specifinis antigenas.



	AUC	p reikšmė
— PSA	0.523	0.596
— 2 genai	0.576	0.095
— 2 genai + PSA	0.593	0.039
— 3 genai	0.596	0.034
— 3 genai + PSA	0.608	0.017

22 pav. Pasišlapinto šlapimo dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkinių bei jų kombinacijų su PSA ROC kreivių analizė ligos agresyvumo padidėjimui prognozuoti (P reikšmės < 0,050 parodytos; santrumpos: AUC – plotas po kreive, angl. *area under the curve*; PSA – prostatos specifinis antigenas)



	AUC	p reikšmė
— PSA	0.677	<0.001
— 2 genai	0.501	0.979
— 2 genai + PSA	0.711	<0.001
— 3 genai	0.594	0.033
— 3 genai + PSA	0.704	<0.001

23 pav. Kateterizuoto šlapimo dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkinių bei jų kombinacijų su PSA ROC kreivių analizė ligos agresyvumo padidėjimui prognozuoti (P reikšmės < 0,050 parodyšintos; santrumpos: AUC – plotas po kreive, angl. *area under the curve*; PSA – prostatos specifinis antigenas)

Dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų derinių bei jų kombinacijų su PSA neigiama prognostinė vertė (NPV) siekė 38–83 proc., teigiama prognostinė vertė (TPV) – 25–51 proc., testų jautrumas – 40–85 proc., specifiškumas – 55–82 proc. (žr. 11 lentelę).

11 lentelė. Dviejų (*RASSFI*, *GSTPI*) ir trijų (*RARβ*, *RASSFI* ir *GSTPI*) genų derinių bei jų kombinacijų su PSA testų jautrumas, specifiskumas, NPV ir TPV ligos agresyvumo, stadijos ir rizikos padidėjimui prognozuoti

Rodiklis	Agresyvumo padidėjimas				Stadijos padidėjimas				Rizikos padidėjimas			
	Jautrumas, %	Specifiškumas, %	TPV, %	NPV, %	Jautrumas, %	Specifiškumas, %	TPV, %	NPV, %	Jautrumas, %	Specifiškumas, %	TPV, %	NPV, %
Pasišlapintas šlapimas (N = 188)												
PSA	82,6	27,0	29,7	80,6	86,7	27,9	23,4	89,1	85,0	27,4	26,9	85,3
<i>RARβ</i> , <i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i>	50,7	67,5	36,9	78,6	52,3	72,5	32,6	85,6	45,8	71,3	33,4	80,7
<i>RARβ</i> , <i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i> + PSA	47,8	74,6	41,2	79,3	56,8	65,2	29,4	85,6	89,8	27,0	27,9	89,4
<i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i>	50,7	69,3	35,7	78,1	50,0	73,9	32,8	85,3	45,8	71,3	33,4	80,7
<i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i> + PSA	40,3	81,6	45,0	78,5	54,5	66,7	27,7	84,6	89,8	27,0	27,9	89,4
Kategorizuotas šlapimas (N = 326)												
PSA	66,1	64,8	41,2	87,3	73,1	51,4	27,7	88,2	58,2	62,6	32,8	82,7
<i>RARβ</i> , <i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i>	63,8	54,8	34,5	80,2	68,7	43,7	23,7	84,6	30,2	82,4	35,0	79,0
<i>RARβ</i> , <i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i> + PSA	56,9	79,2	50,5	83,1	60,9	63,3	29,7	86,4	56,6	62,1	31,2	81,4
<i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i>	84,5	73,6	24,7	38,4	67,2	53,9	27,1	86,6	35,8	75,8	31,7	79,0
<i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i> + PSA	55,2	80,5	51,4	82,8	65,6	64,9	27,5	86,5	58,5	61,2	32,2	82,4

Santrumpos: N – tiriamųjų skaičius; NPV – neigiama prognostinė vertė; PSA – prostatos specifinis antigenas; TPV – teigiama prognostinė vertė.

Daugialypės logistinės regresijos metu (žr. 12 lentelę) trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų testas kartu su PSA atskleidė didžiausią OR ligos agresyvumo padidėjimui prognozuoti pasiūlapintame (OR = 111,5; 95 % CI: 3,0–4077,9; p = 0,004) ir kateterizuotame (OR = 213,0; 95 % CI: 13,6–3339,4; p < 0,001) šlapime.

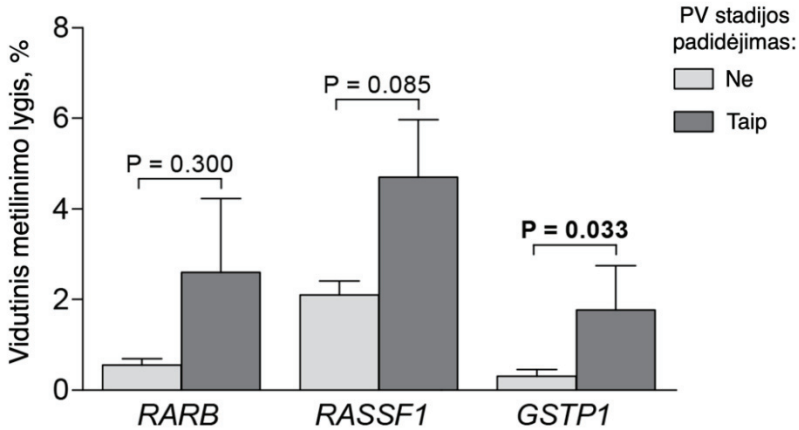
12 lentelė. Daugialypė logistinės regresijos analizė ligos agresyvumo, stadijos ir rizikos padidėjimui prognozuoti

Genas	Pasiūlapintas šlapimas (N = 188)			Kateterizuotas šlapimas (N = 326)		
	OR	95 % CI	P reikšmė	OR	95 % CI	P reikšmė
Agresyvumo padidėjimas						
PSA	1,0	[0,9; 1,0]	0,385	1,1	[1,0; 1,1]	< 0,001
<i>RARβ</i> , <i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i>	110,6	[2,8; 4422,2]	0,005	199,7	[1,2; > 10000,0]	0,040
<i>RARβ</i> , <i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i> + PSA	111,5	[3,0; 4077,9]	0,004	213,0	[13,6; 3339,4]	< 0,001
<i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i>	69,9	[0,4; > 10000,0]	0,092	68,7	[0,1; > 10000,0]	0,192
<i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i> + PSA	69,7	[0,6; 8442,0]	0,075	171,0	[10,4; 2801,1]	< 0,001
Stadijos padidėjimas						
PSA	1,0	[1,0; 1,0]	0,857	1,1	[1,0; 1,1]	< 0,001
<i>RARβ</i> , <i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i>	120,1	[2,2; 6545,0]	0,009	1742,6	[0,1; > 10000,0]	0,078
<i>RARβ</i> , <i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i> + PSA	122,2	[2,3; 6556,6]	0,008	169,1	[8,6; 3335,0]	< 0,001
<i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i>	113,1	[2,2; 5717,0]	0,009	585,6	[<0,1; > 10000,0]	0,252
<i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i> + PSA	115,2	[2,3; 5742,5]	0,008	143,0	[7,4; 2773,5]	< 0,001
Rizikos padidėjimas						
PSA	1,0	[0,9; 1,0]	0,401	1,0	[1,0; 1,1]	0,130
<i>RARβ</i> , <i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i>	84,5	[0,8; 9115,3]	0,059	416,0	[1,4; > 10000,0]	0,037
<i>RARβ</i> , <i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i> + PSA	83,5	[1,0; 7048,2]	0,046	280,4	[2,7; > 10000,0]	0,018
<i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i>	85,2	[0,8; 9215,9]	0,045	118,5	[0,1; > 10000,0]	0,171
<i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i> + PSA	84,5	[1,0; 7164,5]	0,045	103,5	[0,7; > 10000,0]	0,074

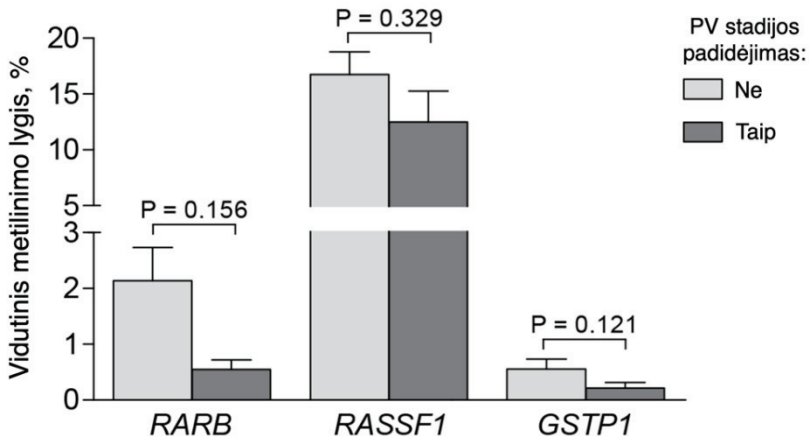
Santrumpos: CI – pasikliautiniai intervalai, angl. *confidence interval*; OR – šansų santykis, angl. *odds ratio*; PSA – prostatos specifinis antigenas. P reikšmės < 0,050 paryškintos.

5.10. DNR metilinimas šlapime ir prostatos vėžio išplitimas

Vidutinis *GSTP1* metilinimo lygis pasišlapinto šlapimo kohortoje statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp ligonių su padidėjusia ir nepakitusia ligos stadija ($p = 0,033$) (žr. 24 pav.), kai kateterizuotame šlapime statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo nustatyta (žr. 25 pav.).

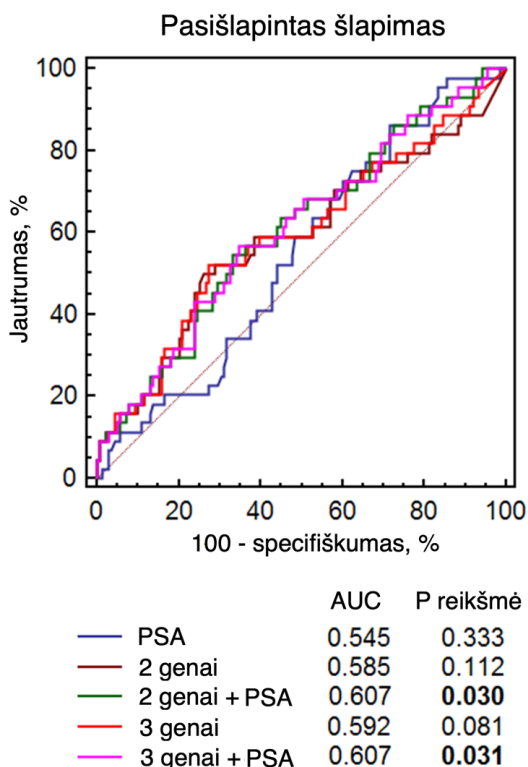


24 pav. DNR genų (*RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*) vidutiniai metilinimo lygiai pasišlapintame šlapime priklausomai nuo PV stadijos pokyčio (P reikšmės < 0,050 paryškintos, santrumpa PV – prostatos vėžys)



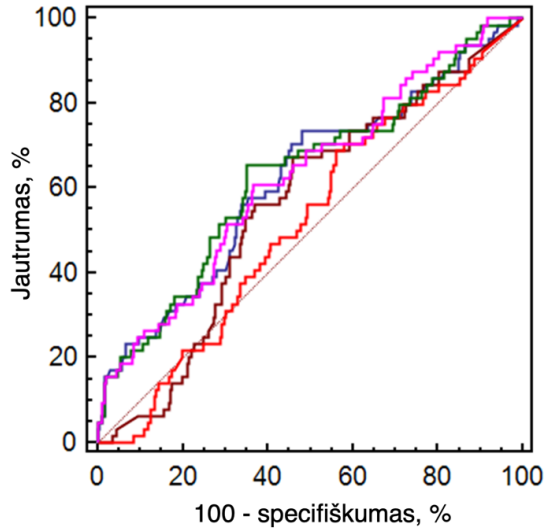
25 pav. DNR genų (*RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*) vidutiniai metilinimo lygiai kateterizuotame šlapime priklausomai nuo PV stadijos pokyčio (santrumpa PV – prostatos vėžys)

Analizuojant ROC kreives, nė vienas iš genų atskirai (žr. 10 lentelę), taip pat ir jų kombinacijos (žr. 26 ir 27 pav.) neatskleidė statistiškai reikšmingų rezultatų, kai reikšmingą prognostinę vertę PV stadijos padidėjimui prognozuoti parodė PSA kateterizuotame šlapime ($p = 0,006$) (žr. 27 pav.). Pavienių genų kombinacijos su PSA (žr. 10 lentelę) bei dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų deriniais (žr. 26 ir 27 pav.) taip pat statistiškai reikšmingai prognozavo PV stadijos padidėjimą abiejose imtyse (visais atvejais $p < 0,005$).



26 pav. Pasišlapinto šlapimo dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkinių bei jų kombinacijų su PSA ROC kreivių analizė ligos stadijos padidėjimui prognozuoti (P reikšmės $< 0,050$ paryškintos; santrumpos: AUC – plotas po kreive, angl. *area under the curve*; PSA – prostatos specifinis antigenas)

Kateterizuotas šlapimas

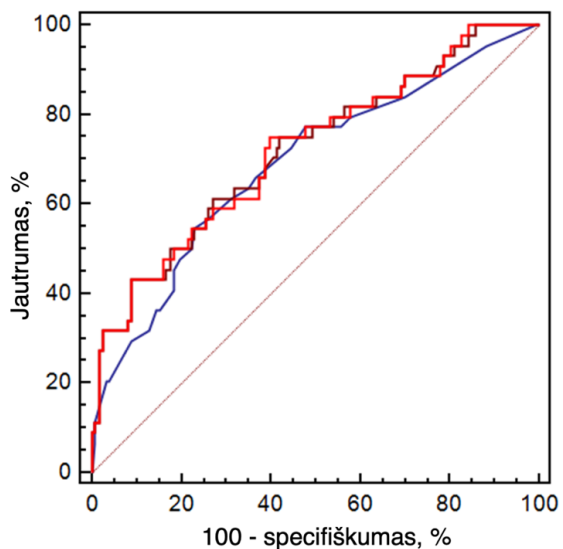


	AUC	P reikšmė
— PSA	0.620	0.006
— 2 genai	0.558	0.133
— 2 genai + PSA	0.630	0.002
— 3 genai	0.519	0.626
— 3 genai + PSA	0.625	0.002

27 pav. Kateterizuoto šlapimo dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkinių bei jų kombinacijų su PSA ROC kreivių analizė ligos stadijos padidėjimui prognozuoti (P reikšmės < 0,050 paryškintos; santrumpos: AUC – plotas po kreive, angl. *area under the curve*; PSA – prostatos specifinis antigenas)

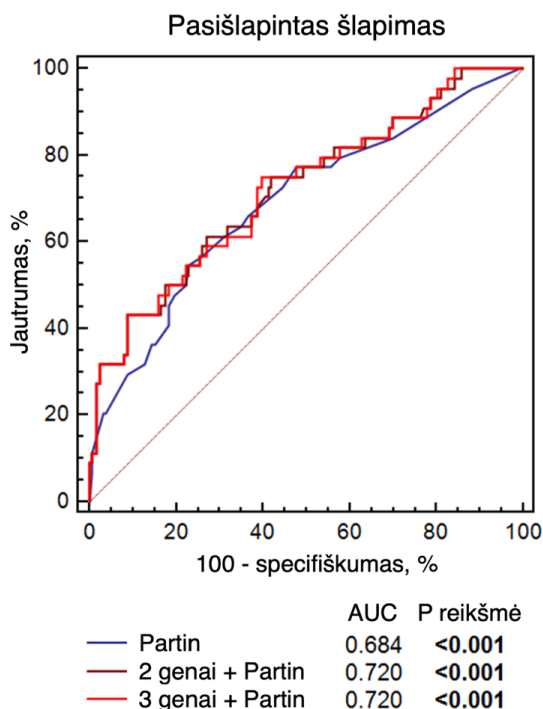
Partino nomogramos reikšmė vietiškai išplitusiam PV diagnozuoti turėjo reikšmingą prognostinę vertę ligos stadijos padidėjimui, tačiau pastarosios kombinacija su dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkiniais tik nedaug pagerino prognostinius rodiklius (žr. 28 ir 29 pav.).

Pasišlapintas šlapimas



	AUC	P reikšmė
— Partin	0.684	<0.001
— 2 genai + Partin	0.720	<0.001
— 3 genai + Partin	0.720	<0.001

28 pav. Pasišlapinto šlapimo Partino nomogramos reikšmė ir jos kombinacijos su dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkiniais ROC kreivių analizė ligos stadijos padidėjimui prognozuoti (P reikšmės < 0,050 paryškintos; santrumpa AUC – plotas po kreive, angl. *area under the curve*)



29 pav. Kateterizuoto šlapimo Partino nomogramos reikšmė ir jos kombinacijos su dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkiniais ROC kreivių analizė ligos stadijos padidėjimui prognozuoti (P reikšmės < 0,050 paryškintos; santrumpa AUC – plotas po kreive, angl. *area under the curve*)

Dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkinių bei jų kombinacijų su PSA NPV siekė 85–87 proc., TPV – 24–33 proc., testų jautrumas – 50–69 proc., specifiškumas – 44–74 proc. (žr. 11 lentelę).

Partino reikšmės kombinacija su dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkiniais padidino testo specifiškumą ir TPV, kai naujo testo NPV siekė 82–91 proc., TPV – 33–56 proc., jautrumas – 43–75 proc., specifiškumas – 60–91 proc. (žr. 13 lentelę).

13 lentelė. Partino rodiklio ir jo kombinacijų su dviem (*RASSFI*, *GSTPI*) ir trijų (*RARβ*, *RASSFI* ir *GSTPI*) genų rinkiniais jautrumas, specifiškumas, NPV ir TPV ligos stadijos padidėjimui prognozuoti

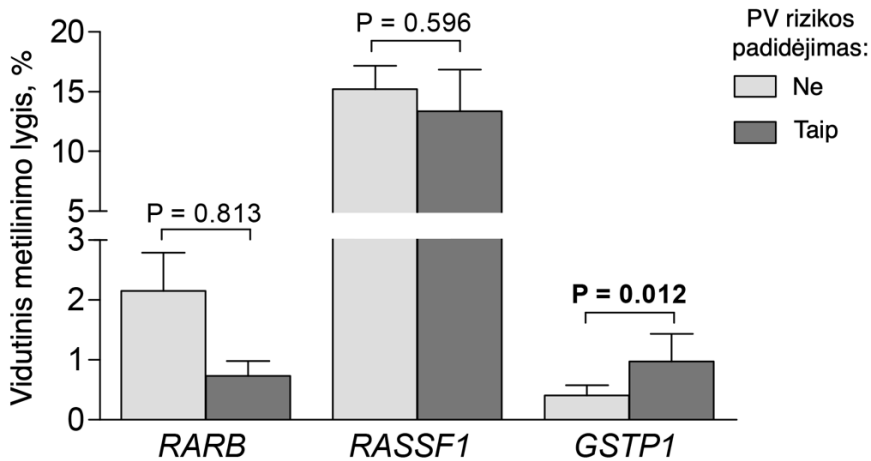
Rodiklis	Jautrumas, %	Specifiškumas, %	TPV, %	NPV, %
Pasišlapintas šlapimas (N = 188)				
Partino reikšmė	53,3	77,0	37,1	86,6
<i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i> + Partino reikšmė	43,2	91,3	55,7	86,3
<i>RARβ</i> , <i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i> + Partino reikšmė	75,0	60,3	32,5	90,5
Kateterizuotas šlapimas (N = 326)				
Partino reikšmė	56,5	79,8	41,6	82,4
<i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i> + Partino reikšmė	59,3	80,8	44,0	88,6
<i>RARβ</i> , <i>RASSFI</i> , <i>GSTPI</i> + Partino reikšmė	61,0	79,8	43,5	88,9

Santrumpos: N – tiriamųjų skaičius; NPV – neigiama prognostinė vertė; TPV – teigiama prognostinė vertė.

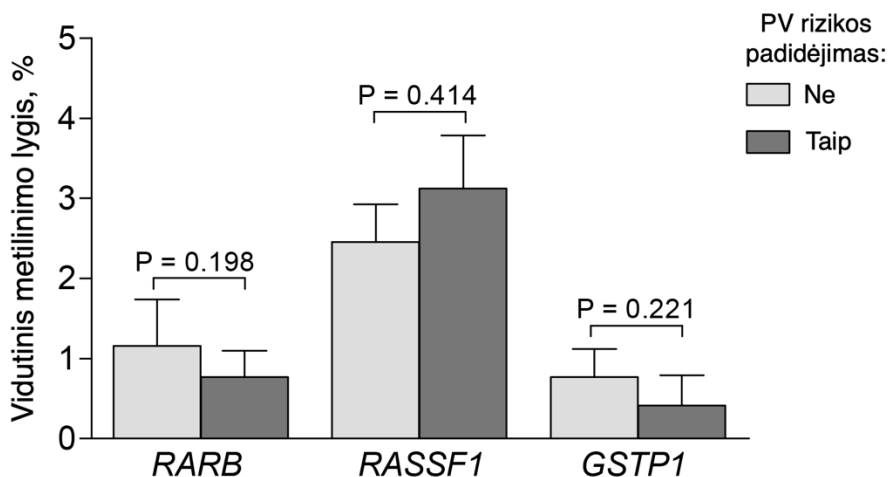
Daugialypės logistinės regresijos analizės metu (žr. 12 lentelę) trijų genų (*RARβ*, *RASSFI* ir *GSTPI*) testas kartu su PSA atskleidė didžiausią OR ligos stadijos padidėjimui prognozuoti pasišlapintame (OR = 122,2; 95 % CI: 2,3–6556,6; p = 0,008) ir kateterizuotame (OR = 169,1; 95 % CI: 8,6–3335,0; p < 0,001) šlapime.

5.11. DNR metilinimas šlapime ir prostatos vėžio rizika

Vidutinis *GSTPI* metilinimo lygis kateterizuotame šlapime buvo statistiškai reikšmingai didesnis tiriamųjų grupėje, kurių PV rizika padidėjo (p = 0,012) (žr. 30 pav.), kai pasišlapintame šlapime statistiškai reikšmingo skirtumo tarp grupių nebuvo nustatyta (žr. 31 pav.).



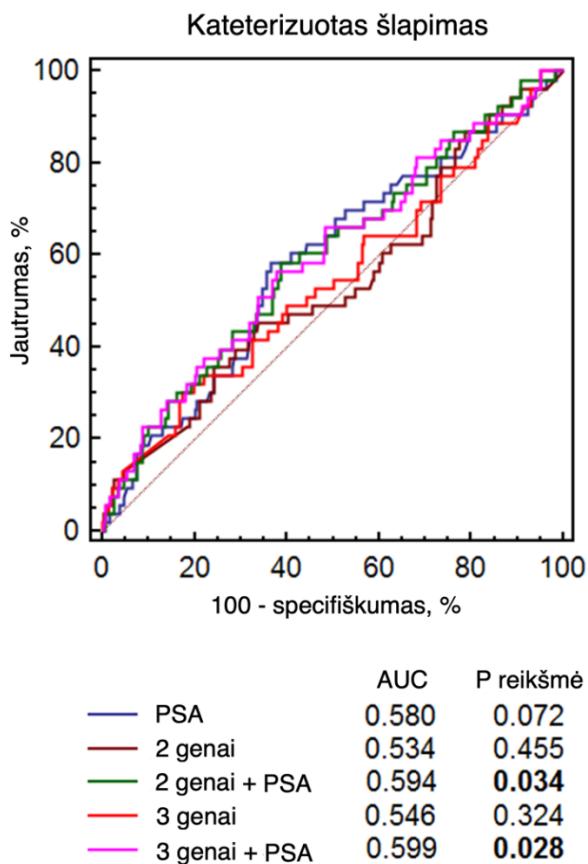
30 pav. DNR genų (*RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*) vidutiniai metilinimo lygiai kateterizuotame šlapime priklausomai nuo PV rizikos pokyčio (P reikšmės < 0,050 paryškintos; santrumpa PV – prostatos vėžys)



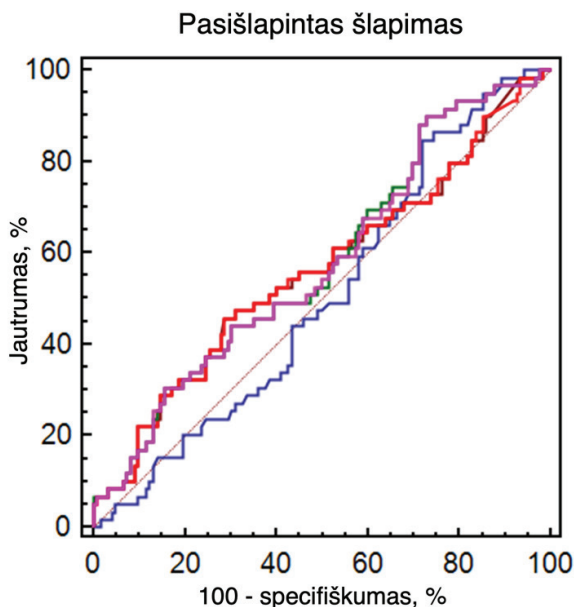
31 pav. DNR genų (*RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*) vidutiniai metilinimo lygiai pasiūlapintame šlapime priklausomai nuo PV rizikos pokyčio (santrumpa PV – prostatos vėžys)

Analizuojant ROC kreives, nė vienoje imtyje PSA atskirai (žr. 32 ir 33 pav.) bei pasiūlapintame šlapime nė vienas iš genų atskirai (žr. 10 lentelę) neatskleidė statistiškai reikšmingų reikšmingų rezultatų. Tiriant kateterizuotą

šlapimą, *GSTPI* atskirai ($p = 0,047$) ir visų pavienių genų kombinacijos su PSA (visais atvejais $p < 0,050$) turėjo statistiškai reikšmingą vertę PV rizikos padidėjimui prognozuoti (žr. 10 lentelę). Dviejų (*RASSF1*, *GSTPI*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTPI*) genų rinkinių kombinacijos su PSA kateterizuoto šlapimo imtyje taip pat atskleidė reikšmingą vertę PV rizikos padidėjimui prognozuoti (visais atvejais $p < 0,005$) (žr. 32 pav.), kai pasišlapinto šlapimo kohortoje stebėta silpna tendencija (žr. 33 pav.).



32 pav. Kateterizuoto šlapimo dviejų (*RASSF1*, *GSTPI*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTPI*) genų rinkinių bei jų kombinacijų su PSA ROC kreivių analizė ligos rizikos padidėjimui prognozuoti (P reikšmės $< 0,050$ paryškintos; santrumpos: AUC – plotas po kreive, angl. *area under the curve*; PSA – prostatos specifinis antigenas)



	AUC	P reikšmė
— PSA	0.502	0.960
— 2 genai	0.562	0.186
— 2 genai + PSA	0.579	0.081
— 3 genai	0.562	0.188
— 3 genai + PSA	0.577	0.089

33 pav. Pasišlapinto šlapimo dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkinių bei jų kombinacijų su PSA ROC kreivių analizė ligos rizikos padidėjimui prognozuoti (santrumpos: AUC – plotas po kreive, angl. *area under the curve*; PSA – prostatos specifinis antigenas)

Dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkinių bei jų kombinacijų su PSA NPV siekė 79–89 proc., TPV – 27–35 proc., testų jautrumas – 36–90 proc., specifiškumas – 27–82 proc. (žr. 11 lentelę).

Daugialypės logistinės regresijos analizės metu (žr. 12 lentelę) *RASSF1* ir *GSTP1* genų kombinacija atskleidė didžiausią OR PV rizikos padidėjimui prognozuoti tiriamųjų, su pasišlapintu šlapimu, imtyje (OR = 85,2; 95 % CI: 0,8–9215,9; p = 0,045). Tiriant kateterizuotą šlapimą didžiausią prognostinę vertę turėjo trijų genų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) rinkinys (OR = 416,0; 95 % CI: 1,4–10000,0; p = 0,037).

6. REZULTATŲ APTARIMAS

PV – heterogeniška liga, pasižyminti molekuline ir morfologine įvairove, kliniškai galinti pasireikšti nuo lėtai progresuojančio lokalaus naviko iki ypač agresyvaus sistemiškai išplitusio PV [158]. Tikslus ligos agresyvumo vertinimas ir tinkamos gydymo taktikos pasirinkimas – vienas svarbiausių klinicisto uždavinių. Pagrindinė prognostinė priemonė, leidžianti įvertinti PV riziką, šiuo metu yra modifikuoti D'Amico kriterijai [4, 54, 55], tačiau, mokslinės literatūros duomenimis, 24–41 proc. ligonių po radikalaus chirurginio gydymo nustatomas PV agresyvumo padidėjimas, o 29–34 proc. atvejų nustatoma didesnė ligos stadija [7, 159–161]. Mūsų tyrimo metu PV agresyvumo padidėjimas rastas 27 proc. ligonių, o didesnė ligos stadija nustatyta 20 proc. atvejų. 86 proc. tiriamųjų, kuriems ligos agresyvumas padidėjo, kliniškai diagnozuotas cISUP 1 navikas, o 49 proc. ligonių, kuriems nustatytas ligos stadijos padidėjimas, kliniškai diagnozuota cT1c liga. Remiantis D'Amico kriterijais, minėti rodikliai apibūdina mažos rizikos PV ir yra pagrindinė indikacija aktyviam stebėjimui.

Skirtumus tarp PB ir RP histologinių tyrimų rezultatų didžiąja dalimi lemia biopsinės medžiagos paėmimo ir histologinio ištyrimo trūkumai:

1. PB metu paaimamas ribotas audinio kiekis, tad didesnio agresyvumo, tačiau mažo tūrio navikinis komponentas gali nepatekti į biopsinę medžiagą [162, 163].
2. 20 proc. prostatos navikų turi tretinį Gleasono skalės balą, kuris gali būti nustatytas PB metu, tačiau neįvertintas per operacinės medžiagos histologinį tyrimą, ypač tiriant ne visą prostatos audinį [162, 163].
3. Tarpiniai navikiniai pakitimai prostatoje gali būti interpretuojami skirtingai, ypač atliekant tyrimus nespecializuotame centre ir tiriant blogos kokybės histologinę medžiagą [162, 164].

PV agresyvumo ir stadijos padidėjimo klinikinė reikšmė bei prognostinė vertė galutinai nėra aiški. Remiantis mūsų tyrimo duomenimis, ligos agresyvumo ar stadijos padidėjimas 1,5 karto padidino teigiamo chirurginio krašto riziką. Mokslinėje literatūroje įrodyta, kad didelės rizikos PV ir maža chirurgo patirtis yra pagrindiniai rizikos veiksniai neradikaliam naviko pašalinimui [165, 166], ypač ligos agresyvumo ir stadijos padidėjimo atveju, kai operacijos metu chirurgas tikisi mažos rizikos PV [167].

Literatūroje taip pat aprašytas ryšys tarp ligos agresyvumo pokyčių ir biocheminio ligos atkryčio. W. S. Hamo ir bendraautorių duomenimis, ligonių,

kurių ligos agresyvumas po operacijos sumažėjo, biocheminio atkryčio rodikliai buvo geresni [168]. Ligos agresyvumo padidėjimas biocheminio ligos atkryčio riziką padidina [159]. Mūsų tyrimo duomenimis, ligos agresyvumo padidėjimas biocheminio atkryčio riziką didino 1,8 karto, o PV stadijos padidėjimas – 2,1 karto. Tiriamųjų, kuriems kliniškai nustatytas vidutinės ir didelės rizikos PV, rodikliai buvo blogiausi. Skirtingą įtaką biocheminiam ligos atkryčiui galima paaiškinti nevienodai didėjančiu ligos agresyvumu: didžiosios dalies mažos rizikos tiriamųjų (cISUP 1) rizika po operacijos pasikeitė į vidutinę (pISUP 2; mūsų atliktame tyrime – 86 proc. tiriamųjų), o vidutinės rizikos tiriamųjų (cISUP 2) – į didesnę riziką (\geq pISUP 3).

Mokslinėje literatūroje aprašytas ryšys tarp biocheminio ligos atkryčio ir metastatinės ligos bei PV specifinio išgyvenamumo [169]. Mūsų tyrimo duomenimis, laikas be metastazių buvo reikšmingai trumpesnis ligoniams, kurių ligos agresyvumas ir stadija padidėjo. Minėtina, kad šie pokyčiai neturėjo įtakos bendrajam išgyvenamumui, tačiau buvo susiję su blogesniu 10 metų PV specifiniu išgyvenamumu (plg.: rizikos padidėjimo atveju – atitinkamai 89 proc. ir 98 proc., stadijos padidėjimo atveju – 87 proc. ir 98 proc.). Pateikti rezultatai atitinka kitų tyrėjų duomenis – ligos agresyvumo ir stadijos padidėjimo metu taip pat nustatyti blogesni specifinio išgyvenamumo rodikliai [6, 8].

PV agresyvumo ir stadijos padidėjimo įtaka chirurginiams ir onkologiniams rezultatams atskleidė klinikinėje praktikoje naudojamų diagnostinių metodų trūkumus. Ligos agresyvumo padidėjimui prognozuoti siūlyta net keletas nomogramų [170-172], tačiau pastarosios pritaikytos mažos rizikos PV ir jų panaudojimas vidutinės bei didelės rizikos navikams išlieka ribotas. Molekuliniai žymenys, atspindys visų navikinių židinių genetinius ir epigenetinius pokyčius, leistų išvengti dabartinių diagnostinių problemų ir padėtų tiksliau prognozuoti PV agresyvumą.

Disertacijoje pristatomame tyrime PV agresyvumui, stadijai ir rizikos grupei prognozuoti *RAR β* , *RASSF1* ir *GSTP1* genų metilinimas tirtas pasišlapintame ir kateterizuotame šlapime. Metilinimo dažniai prostatos navikiniuose audiniuose siekė: *RAR β* – 99 proc., *RASSF1* – 97 proc., *GSTP1* – 69 proc. (žr. 17 pav.), o PV sergančių ligonių pasišlapintame ir kateterizuotame šlapime: *RAR β* – 35 proc. ir 32 proc., *RASSF1* – 76 proc. ir 79 proc., *GSTP1* – 17 proc. ir 9 proc. (žr. 18 pav.). Kitų autorių duomenimis, *RAR β* hipermetilinimas nustatytas 40–96 proc. prostatos navikinių audinių ir 35–62 proc. PV šlapimo mėginių (žr. 7 lentelę), *RASSF1* hipermetilintas 28–99 proc. prostatos navikinių audinių ir 38–78 proc. PV šlapimo mėginių (žr. 6 lentelę), o *GSTP1* –

17–95 proc. prostatos navikinių audinių ir 27–83 proc. PV šlapimo mėginių (žr. 5 lentelę).

Metilinimo dažnio ir intensyvumo skirtumus gali lemti:

1. Skirtingos tiriamųjų kohortos, susidedančios iš skirtingo dydžio imčių su skirtingomis šeiminiėmis anamnezėmis, epidemiologiniais duomenimis ir klinikinėmis charakteristikomis.
2. Skirtingi prostatos navikinių audinių surinkimo būdai: RP, PB, transuretrinė prostatos rezekcija (TURP) ir metastazių pašalinimas. PB ir TURP metu nustatyto PV charakteristikos gali nevisiškai atspindėti prostatoje esamus navikinius pokyčius.
3. Skirtingas navikinių ląstelių kiekis prostatos navikiniuose mėginiuose. Mūsų tyrimo metu jis siekė ≥ 70 proc. Minėtina, kad daugelyje kitų autorių tyrimų šis rodiklis nenurodytas.
4. Skirtingi šlapimo mėginių surinkimo būdai: su prostatos masažu ir be masažo, kateterizuojant šlapimo pūslę ar pasišlapinant pačiam ligoniui.
5. Skirtingi PV diagnozės nustatymo būdai, kai tiriamoji medžiaga – organizmo skysčiai: PB ir RP. PB metu nustatytos PV charakteristikos gali nevisiškai atspindėti prostatoje esamus navikinius pokyčius.
6. Tiriamųjų, sudarančių kontrolinę grupę, skirtumai, kai skiriasi ne tik demografinės, epidemiologinės ir klinikinės charakteristikos, bet ir imtis bei nenavikinė medžiaga, pavyzdžiui, studijose, kuriose tirti šlapimo žymenys, kontrolinę grupę sudarė normalus prostatos ir gerybinės prostatos hiperplazijos audinys.
7. Skirtingi nenavikinių audinių surinkimo būdai: RP, PB, TURP ir adenomektomija. PB, TURP ir adenomektomijos metu gauta histologinė medžiaga negali paneigti PV, o TURP ir adenomektomijos metu pašalinama tranzitorinė prostatos zona. PV dažniausiai išsivysto periferinėje zonoje. Minėtų procedūrų metu taip pat gali būti paimtas paranavikinis prostatos audinys, kuriame jau pastebima metilinimo pokyčių, o morfolginiai pokyčiai dar nenustatyti.
8. Kiti onkologiniai susirgimai, kuriems taip pat būdingas *RAR β* , *RASSF1* ir *GSTP1* genų promotorių metilinimas.
9. Skirtingi audinių apdoravimo ir saugojimo būdai. DNR, išgrynintos iš skystame azote užšaldytų audinių, kokybė yra geresnė. Ši DNR yra tinkamesnė molekuliniais genetiniams tyrimams negu išskirta iš formaline fiksuotų ir į parafiną įlietų mėginių, nes tokia DNR dažnai būna fragmentuota. Nekokybiška ir fragmentuota DNR gali iškreipti

metilinimo analizės rezultatus, nes bus gausinami tik trumpesnių amplikonų turintys genai.

10. Skirtingi šlapimo apdorojimo metodai. Tiriant skirtingas šlapimo frakcijas, pavyzdžiui, šlapimo nuosėdas, egzosomas ar šlapimo supernatantą, gali būti gaunami skirtingi DNR metilinimo rezultatai.
11. Skirtingi tyrimo metodai. Naudojant kokybinius metodus, tokius kaip metilinimui jautri PGR, DNR metilinimas nustatomas pakankamai jautriai, tačiau nedidelio metilinimo intensyvumo atvejai gali likti neaptikti arba priešingai – klaidingai priskirti prie intensyvaus metilinimo. Kiekybiniai DNR metilinimo tyrimo metodai, tokie kaip kiekybinė metilinimui jautri PGR, pirosekvenavimas ir kt., įgalina tiksliai nustatyti DNR metilinimo lygį, tačiau reikalingi kontroliniai mėginiai ir kitos tyrimo specifiškumą užtikrinančios techninės priemonės, kad žemas metilinimo intensyvumas nebūtų interpretuojamas klaidingai.
12. Kiekybinės metilinimui jautrios PGR metu nustatytas metilinimo lygis, kuris pasirenkamas kaip ribinė vertė. Mūsų tyrimo metu ribinė vertė buvo 0,1 proc. Minėtina, kad daugelyje kitų studijų ši vertė nebuvo nurodyta.

Nepaisant metilinimo dažnio ir intensyvumo skirtumų, visų genų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) metilinimo dažniai reikšmingai skyrėsi normaliaame prostatos ir PV audiniuose. Hipermetilinimas buvo daug didesnis navikiniame audinyje (žr. 17 pav.).

Disertacijoje pristatomo tyrimo metu bendras *GSTP1* metilinimo intensyvumas ir lygis buvo sąlygiškai žemi, tačiau statistiškai reikšmingų metilinimo skirtumų pastebėta ligos agresyvumo, stadijos ir rizikos padidėjimo atvejais. Tiriant pasišlapintą šlapimą, ligoniams, kurių ligos stadija padidėjo, nustatytas didesnis *GSTP1* metilinimo intensyvumas. Kateterizuotame šlapime nustatyta, kad *GSTP1* hipermetilinimas susijęs su ligos agresyvumo ir rizikos padidėjimu. Pastarieji rezultatai atitinka kitų autorių duomenis, kur *GSTP1* hipermetilinimas taip pat siejamas su PV agresyvumu ir patologine ligos stadija [14, 15, 86, 92–94].

Pasišlapintame šlapime nustatytas nedaug didesnis *RASSF1* metilinimo intensyvumas ligoniams, kurių ligos stadija padidėjo, kai panaši tendencija pastebima ir ligos agresyvumo padidėjimo atveju pasišlapinto ir kateterizuoto šlapimo kohortose. *RARβ* hipermetilinimas neatskleidė statistiškai reikšmingų skirtumų klinikinių rodiklių pasikeitimui prognozuoti.

Pavienių genų reikšmė PV agresyvumo ir stadijos padidėjimui po RP prognozuoti buvo ribota, tačiau pavienių genų bei dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų derinių kombinacijos su PSA turėjo vidutinius prognostinius rodiklius pasišlapinto ir kateterizuoto šlapimo kohortose. *GSTP1* atskirai ir PSA kombinacija su visais pavieniais genais bei dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų deriniais taip pat atskleidė reikšmingus rezultatus PV rizikos padidėjimui prognozuoti, tačiau tik kateterizuoto šlapimo imtyje. Skirtumai tarp skirtingų šlapimo imčių gali būti sąlygoti skirtingų metilinimo lygių, ypač *GSTP1* ir *RASSF1* atvejais, kai pastarieji tikėtina yra susiję su skirtingais šlapimo surinkimo būdais.

Nepaisant gautų reikšmingų rezultatų, reikėtų paminėti pagrindinius atlikto biomedicininio tyrimo trūkumus. Klinikinių ir patologinių rodiklių skirtumai galėjo lemti tiriamųjų, kurių šlapimo mėginiai buvo surinkti skirtingais metodais, metilinimo dažnių ir lygių skirtumus. Visa biologinė medžiaga surinkta perspektyviai, tačiau dalis klinikinių ir patologinių duomenų surinkti ir jų analizė atlikta retrospektyviai. Dalis PB buvo atliktos kitose gydymo įstaigose, kai pastarųjų patologinė medžiaga VUL SK Valstybiniame patologijos centre pakartotinai netirta. Multiparametrinio magnetinio rezonanso tomografija nebuvo įtraukta į biomedicininio tyrimo protokolą, nors pastarasis diagnostikos metodas tampa standartine priemone kasdienėje klinikinėje praktikoje ir yra susijęs su mažesniu ligos agresyvumo padidėjimu [173].

7. IŠVADOS

1. Šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojamas cISUP balas, cTNM stadija ir PSA nėra pakankamai patikimi diagnostiniai įrankiai PV agresyvumui, išplitimui ir rizikos grupei vertinti, nes 27,2 proc. tiriamųjų po radikalaus chirurginio gydymo nustatomas ligos agresyvumo padidėjimas, 20,3 proc. tiriamųjų – ligos stadijos padidėjimas, 23,9 proc. tiriamųjų – PV rizikos padidėjimas, o bendras klaidingos klinikinės diagnozės dažnis (agresyvumo ir (ar) stadijos padidėjimas) siekia net 39,0 proc.
2. PV agresyvumo ir stadijos padidėjimas statistiškai reikšmingai buvo susiję su:
 - a) teigiamo chirurginio krašto dažniu (kiekvienas iš minėtų veiksnių riziką didino 1,5 karto);
 - b) biocheminio ligos atkryčio dažniu (ligos agresyvumo padidėjimas riziką didino 1,8 karto, o PV stadijos padidėjimas – 2,1 karto);
 - c) metastatine liga (ligos agresyvumui padidėjus, metastazių nustatyta 2,0 kartus dažniau, o padidėjus PV stadijai – 3,2 kartų dažniau);
 - d) laiku be metastazių (padidėjus PV stadijai, vidutinis laikas iki metastazių atsiradimo buvo daug trumpesnis (plg. 10,3 m. ir 12,1 m.));
 - e) 10 metų PV specifiniu išgyvenamumu (jis buvo daug trumpesnis ligonių, kuriems nustatytas ligos agresyvumo (plg. atitinkamai 89 proc. ir 98 proc.) ir stadijos (plg. atitinkamai 87 proc. ir 98 proc.) padidėjimas).
3. *RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1* genų promotorių metilinimo dažniai statistiškai reikšmingai skyrėsi normaliuose prostatos ir PV audiniuose.
4. Lyginant pasišlapinto ir kateterizuoto šlapimo mėginius, didesnis *GSTP1* metilinimo dažnis ir lygis nustatytas šlapime, surinktame pacientams pasišlapinus, kai didesnis *RASSF1* metilinimo lygis rastas kateterizuotame šlapime.
5. Dviejų (*RASSF1*, *GSTP1*) ir trijų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) genų rinkinių kombinacijos su PSA atskleidė reikšmingus rezultatus PV agresyvumo ir stadijos padidėjimui prognozuoti, todėl gali būti naudojami PV diagnostikoje.

8. REKOMENDACIJOS

- 39 proc. atvejų klinikinės diagnozės metu nustatoma PV stadija ir (ar) diferenciacijos laipsnis nesutampa su pooperaciniu įvertinimu, todėl klinikinio ligonio ištyrimo tikslumą gali padidinti neinvaziniai molekuliniai testai.
- Kuriant diagnostinius ar prognostinius PV testus, rekomenduojama naudoti epigenetinių žymenų derinius ir jų kombinacijas su PSA ir klinikiniais rodikliais.
- Diagnozavus mažos rizikos PV ir pasirenkant aktyvaus stebėjimo taktiką, rekomenduojama atlikti papildomą trijų žymenų (*RARβ*, *RASSF1* ir *GSTP1*) šlapimo testą, kuris kartu su PSA leistų patikslinti PV agresyvumą ir išplitimą.
- Operuojant mažos rizikos PV, rekomenduojama kruopščiai laikytis visų onkologinių operacijų principų, ypač šalinant priešinę liauką jos viršūnės srityje, kur dažniausiai nustatomas teigiamas chirurginis kraštas.
- Esant mažos rizikos PV, po taikyto radikalaus chirurginio gydymo nustačius ligos agresyvumo ir (ar) stadijos padidėjimą, rekomenduojama griežta PSA stebėseną. Siūlytina svarstyti galimybę taikyti adjuvantinį spindulinį gydymą.
- Esant vidutinės rizikos PV, po taikyto radikalaus chirurginio gydymo nustačius ligos agresyvumo ir (ar) stadijos padidėjimą, rekomenduojama taikyti adjuvantinį spindulinį gydymą.

9. PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

9.1. Straipsniai disertacijos tema

1. Bakavičius A, Daniūnaitė K, Žukauskaitė K, Barisienė M, Jarmalaitė S, Jankevičius F. Urinary DNA methylation biomarkers for prediction of prostate cancer upgrading and upstaging. *Clin Epigenetics*. 2019; 11(1): 115–125.
2. Bakavičius A, Drevinskaitė M, Daniūnaitė K, Barisienė M, Jarmalaitė S, Jankevičius F. The impact of prostate cancer upgrading and upstaging on biochemical recurrence and cancer-specific survival. *Medicina* 2020; 56(2): E61.

Straipsniai, iš dalies susiję su disertacijos tema:

1. Stuopelytė K, Daniūnaitė K, Bakavičius A, Lazutka JR, Jankevičius F, Jarmalaitė S. The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *Br J Cancer*. 2016; 115(6): 707–715.
2. Damidenko R, Daniūnaitė K, Bakavičius A, Sabaliauskaitė R, Skeberdytė A, Petroška D, Laurinavičius A, Jankevičius F, Lazutka JR, Jarmalaitė S. Decreased expression of *MTIE* is a potential biomarker of prostate cancer progression. *Oncotarget*. 2017; 8(37): 61709–61718.
3. Daniūnaitė K, Dubikaitytė M, Gibas P, Bakavičius A, Lazutka JR, Ulys A, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Clinical significance of miRNA host gene promoter methylation in prostate cancer. *Hum Mol Genet*. 2017; 26(13): 2451–2461.

9.2. Pranešimai disertacijos tema

1. Žukauskaitė K, Daniūnaitė K, Bakavičius A, Jarmalaitė S. Promoter methylation analysis of *RARβ*, *RASSF1* and *GSTP1* in prostate cancer. The Coins 2018. 2018 m. vasario 28 d.–kovo 2 d. Vilnius, Lietuva.
2. Bakavičius A, Daniūnaitė K, Jarmalaitė S, Jankevičius F. Epigenetic markers to overcome limitations in prostate cancer diagnostics. 5th EAU Baltic Meeting 2018. 2018 m. gegužės 25–26 d. Ryga, Latvija. (*Antrosios vietos „Berlin Chemie Award“ apdovanojimas*)

3. Žukauskaitė K, Daniūnaitė K, Bakavičius A, Jarmalaitė S. Promoter methylation analysis of tumor suppressor genes in prostate cancer tissue and urine. XVth International conference of the Lithuanian Biochemical Society. 2018 m. birželio 26–29 d. Dubingiai, Lietuva
4. Bakavičius A, Daniūnaitė K, Ulys A, Jarmalaitė S, Jankevičius F. *GSTP1* as promising diagnostic tool for more precise prostate cancer diagnosis. 38th Congress of SIU. 2018 m. spalio 4–7 d. Seulas, Pietų Korėja.
5. Bakavičius A, Daniūnaitė K, Jarmalaitė S, Jankevičius F. Epigenetic markers to overcome limitations in prostate cancer diagnostics. 34th Annual EAU Congress 2019. 2019 m. kovo 15–19 d. Barselona, Ispanija.
6. Bakavičius A, Daniūnaitė K, Jarmalaitė S, Jankevičius F. Urinary 3-gene methylation test for prostate cancer risk assessment. 6th EAU Baltic Meeting 2019. 2019 m. gegužės 24–25 d. Talinas, Estija.

10. FINANSINĖ PARAMA

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (Nr. LIG-14/2012 ir Nr. SEN-9/2016), Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas (Nr. C03/2007-09) ir Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas. Stažuotės metu *L'Institut Mutualiste Montsouris* klinikoje Paryžiuje skirta *Erasmus+* ir Prancūzijos vyriausybės (Nr. 913108F) stipendijos. Už akademinis pasiekimus 2019 m. doktorantui Arnei Bakavičiui skirta Lietuvos mokslo tarybos stipendija (Nr. V-108).

11. CURRICULUM VITAE

Asmeniniai duomenys:

Vardas	Arnas
Pavardė	Bakavičius
Gimimo data	1986-06-10
Lytis	Vyras
Pilietybė	Lietuvis
Adresas	M. Bukšos g. 14-3, Vilnius 08431, Lietuva
Telefono nr.	+370 698 83 048
El. paštas	<i>arnas.bakavicius@gmail.com</i>

Išsilavinimas:

2015–2019	Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, Doktorantūros studijos
2017–2018	Specializacija robotinės ir minimaliai invazyvios urologijos srityje „L’Institut Mutualiste Montsouris“ klinikoje Paryžiuje (Prancūzija)
2011–2016	Vilniaus universitetas, Urologijos rezidentūra
2005–2011	Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, Medicina
2001–2005	Kuršėnų Lauryno Ivinskio gimnazija

Profesinė patirtis:

2018–dabar	Jaunesnysis asistentas; Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, M. K. Čiurlionio g. 21, Vilnius 03101, Lietuva
2018–dabar	Jaunesnysis mokslo darbuotojas; Nacionalinis vėžio institutas, Mokslinių tyrimų centras, P. Baublio g. 3b, Vilnius 08406, Lietuva
2016–dabar	Urologas; Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos, Urologijos skyrius, Santariškių g. 2, Vilnius 08661, Lietuva

Kvalifikacijos kėlimas:

2020 m. sausio 15–16 d.	Young Experts in Science (YES) Meeting 2020; Karolinska Institutas, Stokholmas, Švedija
2019 m. lapkričio 14–17 d.	11 th European Multidisciplinary Congress on Urological Cancers (EMUC19); Viena, Austrija
2019 m. gegužės 25–26 d.	6 th EAU Baltic Meeting 2019; Talinas, Estija

2019 m. kovo 15–19 d.	34 th Annual EAU Congress; Barselona, Ispanija
2018 m. gegužės 25–26 d.	5 th EAU Baltic Meeting 2018; Ryga, Latvija
2018 m. gegužės 18–21 d.	AUA Annual Meeting 2018; San Fransiskas, JAV
2017 m. gruodžio 7–8 d.	2 nd ESU-ESUT-ESUI Masterclass on Focal therapy for localized prostate cancer; Paryžius, Prancūzija
2017 m. gegužės 26–27 d.	4 th EAU Baltic Meeting 2017; Vilnius, Lietuva
2017 m. sausio 27–28 d.	Nordic Advanced Prostate Cancer (NAPC) Camp, Stokholmas, Švedija
2016 m. gruodžio 4–6 d.	Advances in the Armamentarium of CRPC; Growing Radium-223 Dichloride Understanding and Treatment Expertise; <i>Guy's and St Thomas'</i> ligoninė, Londonas, Anglija
2016 m. gegužės 27–28 d.	3 rd EAU Baltic Meeting 2016; Talinas, Estija
2016 m. kovo 21–23 d.	EUREP Advanced HOT Follow-up; Olympus EndoClub akademija, Hamburgas, Vokietija
2015 m. rugsėjo 8 d.	The European Training in Basic Laparoscopic Urological Skills (E-BLUS) egzaminas; 13 th European Urology Residents Education Programme (EUREP); Praha, Čekija
2015 m. rugsėjo 4–9 d.	13 th European Urology Residents Education Programme (EUREP); Praha, Čekija
2015 m. gegužės 5–11 d.	ESU-Weill Cornell Masterclass in Urology; Zalcburgas, Austrija
2015 m. kovo 1–gegužės 31 d.	Stažuotė onkourologijos srityje; <i>Fundació Puigvert</i> klinika, Barselona, Ispanija
2015 m. vasario 1–6 d.	ESU Hands-on training course on Endourology and Laparoscopy; Minimally Invasive Surgery Centre Jesús Usón, Kaseresas, Ispanija
2014 m. spalio 30–31 d.	1 st ESU Masterclass on Lasers in urology, in collaboration with the EAU Section of Uro-Technology (ESUT); Barselona, Ispanija
2014 m. spalio 10–12 d.	14 th EAU Central European Meeting 2014; Krokva, Lenkija
2014 m. gegužės 23–25 d.	1 st EAU Baltic Meeting 2014; Vilnius, Lietuva
2014 m. balandžio 11–15 d.	29 th Annual EAU Congress; Stokholmas, Švedija
2013 m. kovo 15–19 d.	28 th Annual EAU Congress; Milanai, Italija

Geros klinikinės praktikos mokymai:

1. Geros klinikinės praktikos pagrindų mokymai, UAB „Biomapas“, 2017 m. birželio 18 d., Nr. e-627.
2. ASCLS P.A.C.E.® pavojingų medžiagų transportavimo sertifikatas, Mayo Clinic Laboratories, 2019 m. gruodžio 22 d., programos Nr. 058/024/19, įmonės Nr. 058.

Moksliniai tyrimai:

2016–2018	Biomedicininė studija, metastatinio kastracijai atsparaus prostatos vėžio diagnostiniai žymenys, tyrėjas.
2015–2018	Biomedicininė studija, prostatos vėžio diagnostiniai žymenys, tyrėjas.

Apdovanojimai:

1. Pirmosios vietos „Young Urologists Competition“ apdovanojimas. Pranešimas „Sentinel lymph node mapping as an option in prostate cancer“, 3rd EAU Baltic Meeting, 2016 m. gegužės 27–28 d., Talinas, Estija.
2. Antrosios vietos „Berlin Chemie“ apdovanojimas. Pranešimas „Epigenetic markers to overcome limitations in prostate cancer diagnostics“, 5th EAU Baltic Meeting 2018, 2018 m. gegužės 25–26 d., Ryga, Latvija.
3. Pirmosios vietos „Berlin Chemie“ apdovanojimas. Pranešimas „Predicting Abiraterone acetate treatment resistance from blood-circulating androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer“, 6th EAU Baltic Meeting 2019, 2019 m. gegužės 24–25 d., Talinas, Estija.

Narystės:

2014–dabar	Lietuvos urologų draugijos (LUD) narys
2012–dabar	Europos urologų asociacijos (EAU) narys

Domėjimosi sritys:

Onkourologija, robotinė ir minimaliai invazyvi chirurgija urologijoje, molekuliniai prostatos vėžio žymenys.

12. PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo moksliniam vadovui ir mokytojui prof. dr. Feliksui Jankevičiui už atrastą urologiją ir kelią į mokslą. Kaip kartą Profesorius yra sakęs: „Reikia tik pasibelsti ir durys bus atidarytos“. Taip pat ačiū už pasitikėjimą, nuolatinį palaikymą ir visapusišką pagalbą. Esu sutikęs daug gydytojų ir mokslininkų, tačiau tik nedaugelis jų tapo man pavyzdžiu. Profesorius Feliksas Jankevičius – ryškus ir ypač svarbus pavyzdys mano gyvenime.

Nuoširdžiai dėkoju prof. dr. Sonatai Jarmalaitei už pažintį su genetika ir galimybę dirbti kartu. Ačiū už idėjas, vertingus patarimus, laiką, skirtą publikacijų ir rankraščio taisymams, bei šypsenas ir nuoširdų bendravimą.

Norėčiau padėkoti Kristinai Stuopelytei už nuolatinės konsultacijas disertacijos rašymo metu, už ypač vertingas pastabas ir pataisymus bei nuolatinę gerą nuotaiką.

Labai ačiū dr. Kristinai Daniūnaitei už pažintį su laboratorija, atliktus molekulinis tyrimus, molekulinį duomenų analizę ir indėlių rengiant mokslines publikacijas.

Ačiū Kristinai Žukauskaitei už praktinę pažintį su laboratorija, kantrybę mokant atlikti molekulinis tyrimus, nuolatinę priežiūrą šių tyrimų metu ir pagalbą tiriant biologinę medžiagą.

Dėkoju recenzentams – prof. dr. Algirdui Utkui, doc. dr. Arūnui Želviui, dr. Mariui Kinčiui – už laiką, skirtą disertacijos peržiūrai, ir vertingas pastabas.

Esu dėkingas Lietuvos mokslo tarybai, Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui ir Vilniaus universiteto Medicinos fakultetui už suteiktą finansavimą ir stipendijas.

Iš visos širdies dėkoju savo žmonai Aurelijai Kundrotaitei ir dukrai Onai Bakavičiūtei už supratingumą ir kantrybę. Nuoširdžiai atsiprašau už kiekvieną atskirai praleistą minutę.

13. LITERATŪROS SARAŠAS

1. European Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization [elektroninis išteklius]. Prieiga internete: <<https://gco.iarc.fr/today/>>. Žiūrėta 2019-09-01.
2. Aihara M, Wheeler TM, Ohori M, Scardino PT. Heterogeneity of Prostate Cancer in Radical Prostatectomy Specimens. *Urology* 1994; 43(1): 60–66.
3. Ruijter ET, van de Kaa CA, Schalken JA, Debruyne FM, Ruiter DJ. Histological Grade Heterogeneity in Multifocal Prostate Cancer. Biological and Clinical Implications. *J Pathol.* 1996; 180(3): 295–299.
4. Cooperberg MR, Pasta DJ, Elkin EP, Litwin MS, Latini DM, DuChane J, et al. The UCSF Cancer of the Prostate Risk Assessment (CAPRA) Score: A Straightforward and Reliable Preoperative Predictor of Disease Recurrence After Radical Prostatectomy. *J Urol.* 2005; 173(6): 1938–1942.
5. Derweesh IH, Kupelian PA, Zippe C, Levin HS, Brainard J, Magi-Galluzzi C, et al. Continuing Trends in Pathological Stage Migration in Radical Prostatectomy Specimens. *Urol Oncol.* 2004; 22(4): 300–306.
6. Kovac E, Vertosick EA, Sjoberg DD, Vickers AJ, Stephenson AJ. Effects of Pathological Upstaging or Upgrading on Metastasis and Cancer-specific Mortality in Men with Clinical Low-risk Prostate Cancer. *BJU Int.* 2018; 122(6): 1003–1009.
7. Brassetti A, Lombardo R, Emiliozzi P, Cardi A, Antonio V, Antonio I, et al. Prostate-specific Antigen Density Is a Good Predictor of Upstaging and Upgrading, according to the New Grading System: The Keys We Are Seeking May Be Already in Our Pocket. *Urology* 2018; 111: 129–135.
8. Muralidhar V, Dinh KT, Mahal BA, Ziehr DR, Chen YW, Viswanathan VB, et al. Differential Post-prostatectomy Cancer-specific Survival of Occult T3 vs. Clinical T3 Prostate Cancer: Implications for Managing Patients Upstaged on Prostate Magnetic Resonance Imaging. *Urol Oncol.* 2015; 33(7): 330. e19-25.
9. Caster JM, Falchook AD, Hendrix LH, Chen RC. Risk of Pathologic Upgrading or Locally Advanced Disease in Early Prostate Cancer Patients Based on Biopsy Gleason Score and PSA: A Population-Based Study of Modern Patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015; 92(2): 244–251.

10. Park J, Yoo S, Cho MC, Cho MH, Jeong CW, Ku JH, et al. The Impact of Pathologic Upgrading of Gleason Score 7 Prostate Cancer on the Risk of the Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 4510149.
11. Hessels D, Verhaegh GW, Schalken JA, Witjes JA. Applicability of Biomarkers in the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004; 4(4): 513–526.
12. Schuebel KE, Chen W, Cope L, Glöckner SC, Suzuki H, Yi JM, et al. Comparing the DNA Hypermethylome with Gene Mutations in Human Colorectal Cancer. *PLoS Genet.* 2007; 3(9): 1709–1723.
13. Singal R, Van Wert J, Bashambu M. Cytosine Methylation Represses Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) Gene Expression in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* 2001; 61(12): 4820–4826.
14. Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Pookot D, et al. Ethnic Group-related Differences in CpG Hypermethylation of the GSTP1 Gene Promoter Among African-American, Caucasian and Asian Patients with Prostate Cancer. *Int J Cancer.* 2005; 116(2): 174–181.
15. 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; 192(6): 1849–1855.
16. 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* 2016; 115(6): 707–715.
17. Moreira-Barbosa C, Barros-Silva D, Costa-Pinheiro P, Torres-Ferreira J, Constâncio V, Freitas R, et al. Comparing Diagnostic and Prognostic Performance of Two-gene Promoter Methylation Panels in Tissue Biopsies and Urines of Prostate Cancer Patients. *Clin Epigenetics.* 2018; 10(1): 1–11.
18. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The Worldwide Epidemiology of Prostate Cancer: Perspectives from Autopsy Studies. *Can J Urol.* 2008; 15(1): 3866–3871.
19. Bell KJL, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of Incidental Prostate Cancer: A Systematic Review of Autopsy Studies. *Int J Cancer* 2015; 137(7): 1749–1757.
20. Jansson KF, Akre O, Garmo H, Bill-Axelsson A, Adolfsson J, Stattin P, et al. Concordance of Tumor Differentiation Among Brothers with Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2012; 62(4): 656–661.

21. Hemminki K. Familial Risk and Familial Survival in Prostate Cancer. *World J Urol.* 2012; 30(2): 143–148.
22. Cartter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian Inheritance of Familial Prostate Cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(8): 3367–3371.
23. Eeles RA, Olama AA, Benlloch S, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, et al. Identification of 23 New Prostate Cancer Susceptibility Loci Using the iCOGS Custom Genotyping Array. *Nat Genet.* 2013; 45(4): 385–391.
24. Almin AI, Olama A, Dadaev T, Hazelett DJ, Li Q, Leongamornlert D, Saunders E, et al. Multiple Novel Prostate Cancer Susceptibility Signals Identified by Fine-mapping of Known Risk Loci among Europeans. *Hum Mol Genet.* 2015; 24(19): 5589–5602.
25. Dickerman BA, Markt SC, Koskenvuo M, Pukkala E, Mucci A, Kaprio J, et al. Alcohol Intake, Drinking Patterns, and Prostate Cancer Risk and Mortality: A 30-year Prospective Cohort Study of Finnish Twins. *Cancer Causes Control.* 2016; 27(9): 1049–1058.
26. Zhao J, Stockwell T, Roemer A, Chikritzhs T. Is Alcohol Consumption a Risk Factor for Prostate Cancer? A Systematic Review and Meta-analysis. *BMC Cancer* 2016; 16(1): 1–13.
27. Key TJ. Nutrition, Hormones and Prostate Cancer Risk: Results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Recent Results Cancer Res.* 2014; 202: 39–46.
28. Islami F, Moreira DM, Boffetta P, Freedland SJ. A Systematic Review and Meta-analysis of Tobacco Use and Prostate Cancer Mortality and Incidence in Prospective Cohort Studies. *Eur Urol.* 2014; 66(6): 1054–1064.
29. Lian WQ, Luo F, Song XL, Lu YJ, Zhao SC. Gonorrhoea and Prostate Cancer Incidence: An Updated Meta-Analysis of 21 Epidemiologic Studies. *Med Sci Monit.* 2015; 21: 1895–1903.
30. Kristal AR, Till C, Song X, Tangen CM, Goodman PJ, Neuhauser ML, et al. Plasma Vitamin D and Prostate Cancer Risk: Results from the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23(8): 1494–1504.
31. Nyame YA, Murphy AB, Bowen DK, Jordan G, Batai K, Dixon M, et al. Associations Between Serum Vitamin D and Adverse Pathology in Men

- Undergoing Radical Prostatectomy. *J Clin Oncol.* 2016; 34(12): 1345–1349.
32. Zhang M, Wang K, Chen L, Yin B, Song Y. Is Phytoestrogen Intake Associated with Decreased Risk of Prostate Cancer? A Systematic Review of Epidemiological Studies Based on 17,546 Cases. *Andrology* 2016; 4(4): 745–756.
 33. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate: Implications for Prostatic Carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999; 155(6): 1985–1992.
 34. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, Atrophy, and Prostate Carcinogenesis. *Urol Oncol.* 2007; 25(5): 398–400.
 35. McNeal JE, Bostwick DG. Intraductal Dysplasia: A Premalignant Lesion of the Prostate. *Hum Pathol.* 1986; 17(1): 64–71.
 36. Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A. Molecular Biology of Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Prostate* 1996; 29(2): 117–134.
 37. Häggman MJ, Macoska JA, Wojno KJ, Oesterling JE. The Relationship Between Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Prostate Cancer: Critical Issues. *J Urol.* 1997; 158(1): 12–22.
 38. Erbersdobler A, Augustin H, Schlomm T, Henke RP. Prostate Cancers in the Transition Zone: Part 1; Pathological Aspects. *BJU Int.* 2004; 94(9): 1221–1225.
 39. Epstein JI, Woodruff JM. Adenocarcinoma of the Prostate with Endometrioid Features – A Light Microscopic and Immunohistochemical Study of Ten Cases. *Cancer* 1986; 57(1): 111–119.
 40. Bohman KD, Osunkoya AO. Mucin-producing Tumors and Tumor-like Lesions Involving the Prostate: A Comprehensive Review. *Adv Anat Pathol.* 2012; 19(6): 374–387.
 41. Osunkoya AO, Nielsen ME, Epstein JI. Prognosis of Mucinous Adenocarcinoma of the Prostate Treated by Radical Prostatectomy: A Study of 47 Cases. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32(3): 468–472.
 42. Guo CC, Epstein JI. Intraductal Carcinoma of the Prostate on Needle Biopsy: Histologic Features and Clinical Significance. *Mod Pathol.* 2006; 19(12): 1528–1535.
 43. Marcus DM, Goodman M, Jani AB, Osunkoya AO, Rossi PJ. A Comprehensive Review of Incidence and Survival in Patients with Rare

- Histological Variants of Prostate Cancer in the United States from 1973 to 2008. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2012; 15(3): 283–288.
44. Arora R, Koch MO, Eble JN, Ulbright TM, Li L, Cheng L. Heterogeneity of Gleason Grade in Multifocal Adenocarcinoma of the Prostate. *Cancer* 2004; 100(11): 2362–2366.
 45. Gandaglia G, Abdollah F, Schiffmann J, Trudeau V, Shariat SF, Kim SP, et al. Distribution of Metastatic Sites in Patients with Prostate Cancer: A Population-based Analysis. *Prostate* 2014; 74(2): 210–216.
 46. Gallee MP, Ten Kate FJ, Mulder PG, Blom JH, van der Heul RO. Histological Grading of Prostatic Carcinoma in Prostatectomy Specimens. Comparison of Prognostic Accuracy of Five Grading Systems. *Br J Urol.* 1990; 65(4): 368–375.
 47. Gleason DF, Mellinger GT, Arduino LJ, Bailer JC, Becker LE, Berman HI, et al. Prediction of Prognosis for Prostatic Adenocarcinoma by Combined Histological Grading and Clinical Staging. *J Urol.* 1974; 111(1): 58–64.
 48. Utz DC, Farrow GM. Pathologic Differentiation and Prognosis of Prostatic Carcinoma. *JAMA* 1969; 209(11): 1701–1703.
 49. Gaeta JF, Asirwatham JE, Miller G, Murphy GP. Histologic Grading of Primary Prostatic Cancer: A New Approach to an Old Problem. *J Urol.* 1980; 123(5): 689–693.
 50. Brawn PN, Ayala AG, von Eschenbach AC, Hussey DH, Johnson DE. Histologic Grading Study of Prostate Adenocarcinoma: The Development of a New System and Comparison with Other Methods – A Preliminary Study. *Cancer* 1982; 49(3): 525–532.
 51. Gleason DF. Histologic Grading and Clinical Staging of Prostatic Carcinoma. In: Tannenbaum M. (ed.) *Urologic Pathology: The Prostate.* Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1977: 171–197.
 52. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelsonc JB, Egevadd L, Magi-Galluzzie C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol.* 2016; 69(3): 428–435.
 53. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th Edition. Wiley-Blackwell; 2016.
 54. D’Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Fondurulia J, Chen MH, Kaplan I, et al. Pretreatment Nomogram for Prostate-Specific Antigen

- Recurrence After Radical Prostatectomy or External-Beam Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17(1): 168–172.
55. Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Cornford P, De Santis M, Fanti S, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer; 2019.
 56. Mohler JL, Antonarakis ES, Armstrong AJ, D’Amico AV, Davis BJ, Dorff T, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®), Prostate Cancer; Version 1.2019; 2019.
 57. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2016; 40(2): 244–252.
 58. Gulati R, Cheng HH, Lange PH, Nelson PS, Etzioni R. Screening Men at Increased Risk for Prostate Cancer Diagnosis: Model Estimates of Benefits and Harms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017; 26(2): 222–227.
 59. Park JY. Promoter Hypermethylation as a Biomarker in Prostate Adenocarcinoma. In: Verma M. (ed.) *Cancer Epigenetics: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* 1238. Humana Press, New York, NY, 2015: 607–625.
 60. Henrique R, Jerónimo C, Teixeira MR, Hoque MO, Carvalho AL, Pais I, et al. Epigenetic Heterogeneity of High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia: Clues for Clonal Progression in Prostate Carcinogenesis. *Mol Cancer Res.* 2006; 4(1): 1–8.
 61. Tomlins SA, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Integrative Biology of Prostate Cancer Progression. *Annu Rev Pathol.* 2006; 1(1): 243–271.
 62. Ehrlich M. DNA Methylation in Cancer: Too Much, but also too Little. *Oncogene* 2002; 21(35): 5400–5413.
 63. Pogribny IP, Beland FA. DNA Hypomethylation in the Origin and Pathogenesis of Human Diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(14): 2249–2261.
 64. Benbrahim-Tallaa L, Waterland RA, Styblo M, Achanzar WE, Webber MM, Waalkes MP. Molecular Events Associated with Arsenic-induced Malignant Transformation of Human Prostatic Epithelial Cells: Aberrant Genomic DNA Methylation and K-ras Oncogene Activation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 206(3): 288–298.

65. Kanai Y. Alterations of DNA Methylation and Clinicopathological Diversity of Human Cancers. *Pathol Int.* 2008; 58(9): 544–558.
66. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. *Adv Genet.* 2010; 70(C): 27–56.
67. Aithal MGS, Rajeswari N. Role of Notch Signalling Pathway in Cancer and its Association with DNA Methylation. *J Genet.* 2013; 92(3): 667–675.
68. Deaton AM, Bird A. CpG Islands and the Regulation of Transcription. *Genes Dev.* 2011; 25(10): 1010–1022.
69. Allis CD, Jenuwein T. The Molecular Hallmarks of Epigenetic Control. *Nat Rev Genet.* 2016; 17(8): 487–500.
70. Dakubo GD. *Cancer Biomarkers in Body Fluids.* Springer International Publishing, 2017: 342.
71. Hayes JD, Pulford DJ. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30(6): 445–520.
72. Chatterjee A, Gupta S. The Multifaceted Role of Glutathione S-transferases in Cancer. *Cancer Lett.* 2018; 433: 33–42.
73. Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ, Lee BH, Veeraswamy R, et al. GSTP1 CpG Island Hypermethylation is Responsible for the Absence of GSTP1 Expression in Human Prostate Cancer Cells. *Am J Pathol.* 2001; 159(5): 1815–1826.
74. Li QF, Li QY, Gao AR, Shi QF. Correlation Between Promoter Methylation in the GSTP1 Gene and Hepatocellular Carcinoma Development: A Meta-analysis. *Genet Mol Res.* 2015; 14(2) :6762–6772.
75. Fang C, Wei XM, Zeng XT, Wang FB, Weng H, Long X. Aberrant GSTP1 Promoter Methylation is Associated with Increased Risk and Advanced Stage of Breast Cancer: A Meta-analysis of 19 Case-control Studies. *BMC Cancer* 2015; 15(1): 4–11.
76. Liu WZ, Sun Y, Feng X, Bi XH, Liu T, Zhou HF. An Updated Meta-analysis for Association of Glutathione S-transferase P1 Gene Polymorphism with the Susceptibility of Lung Cancer. *J Cancer Res Ther.* 2018; 14(12): S1084–1090.

77. Shen X, Wang J, Yan X, Ren X, Wang F, Chen X, et al. Predictive Value of GSTP1 Ile105Val Polymorphism in Clinical Outcomes of Chemotherapy in Gastric and Colorectal Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016; 77(6): 1285–1302.
78. Costa VL, Henrique R, Jerónimo C. Epigenetic Markers for Molecular Detection of Prostate Cancer. *Dis Markers* 2007; 23(1–2): 31–41.
79. Goering W, Kloth M, Schulz WA. DNA Methylation Changes in Prostate Cancer. *Methods Mol Biol.* 2012; 863: 47–66.
80. Gonzalzo ML, Nakayama M, Lee SM, De Marzo AM, Nelson WG. Detection of GSTP1 Methylation in Prostatic Secretions Using Combinatorial MSP Analysis. *Urology* 2004; 63(2): 414–418.
81. Suh CI, Shanafelt T, May DJ, Shroyer KR, Bobak JB, Crawford ED, et al. Comparison of Telomerase Activity and GSTP1 Promoter Methylation in Ejaculate as Potential Screening Tests for Prostate Cancer. *Mol Cell Probes* 2000; 14(4): 211–217.
82. Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H, Miller K. DNA-Based Detection of Prostate Cancer in Blood, Urine, and Ejaculates. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 945(1): 51–58.
83. Van Neste L, Herman JG, Otto G, Bigley JW, Epstein JI, Van Criekinge W. The Epigenetic Promise for Prostate Cancer Diagnosis. *Prostate* 2012; 72(11): 1248–1261.
84. Brooks JD, Weinstein M, Lin X, Sun Y, Pin SS, Bova GS, et al. CG Island Methylation Changes Near the GSTP1 Gene in Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7(6): 531–536.
85. Henrique R, Jerónimo C, Teixeira MR, Hoque MO, Carvalho AL, Pais I, et al. Epigenetic Heterogeneity of High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia: Clues for Clonal Progression in Prostate Carcinogenesis. *Mol Cancer Res.* 2006; 4(1): 1–8.
86. Steiner I, Jung K, Schatz P, Horns T, Wittschieber D, Lein M, et al. Gene Promoter Methylation and its Potential Relevance in Early Prostate Cancer Diagnosis. *Pathobiology* 2010; 77(5): 260–266.
87. Hashad DI, Hashad MM, Talaat IM, Ibrahim MA. Role of Glutathione-S-transferase P1 Hypermethylation in Molecular Detection of Prostate Cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011; 15(10): 667–670.
88. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG Island Hypermethylation of Multiple Genes in Prostate Cancer and Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *J Pathol.* 2004; 202(2): 233–240.

89. Richiardi L, Fiano V, Grasso C, Zugna D, Delsedime L, Gillio-Tos A, et al. Methylation of APC and GSTP1 in Non-Neoplastic Tissue Adjacent to Prostate Tumour and Mortality from Prostate Cancer. *PLoS One*. 2013; 8(7): 1–7.
90. Hanson JA, Gillespie JW, Grover A, Tangrea MA, Chuaqui RF, Emmert-Buck MR, et al. Gene Promoter Methylation in Prostate Tumor-Associated Stromal Cells. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98(4): 255–261.
91. Jentzmik F, Krause H, Reichelt U, Schrader AJ, Schrader M, Baumunk D, et al. GSTP1 CpG Island Hypermethylation for DNA-based Detection of Occult Tumor Cells in Surgical Margins after Radical Prostatectomy. *World J Urol*. 2012; 30(4): 541–546.
92. Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO, Mambo E, Ribeiro FR, Varzim G, et al. A Quantitative Promoter Methylation Profile of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(24): 8472–8478.
93. Woodson K, O'Reilly KJ, Hanson JC, Nelson D, Walk EL, Tangrea JA. The Usefulness of the Detection of GSTP1 Methylation in Urine as a Biomarker in the Diagnosis of Prostate Cancer. *J Urol*. 2008; 179(2): 508–511.
94. Jatkoe TA, Karnes RJ, Freedland SJ, Wang Y, Le A, Baden J. A Urine-based Methylation Signature for Risk Stratification Within Low-risk Prostate Cancer. *Br J Cancer* 2015; 112(5): 802–808.
95. Devaney J, Stirzaker C, Qu W, Song JZ, Statham AL, Patterson KI, et al. Epigenetic Deregulation Across Chromosome 2q14.2 Differentiates Normal from Prostate Cancer and Provides a Regional Panel of Novel DNA Methylation Cancer Biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011; 20(1): 148–159.
96. Litovkin K, Van Eynde A, Joniau S, Lerut E, Laenen A, Gevaert T, et al. DNA Methylation-guided Prediction of Clinical Failure in High-risk Prostate Cancer. *PLoS One*. 2015; 10(6): 11–22.
97. Mahon KL, Qu W, Lin HM, Spielman C, Cain D, Jacobs C, et al. Serum Free Methylated Glutathione S-transferase 1 DNA Levels, Survival, and Response to Docetaxel in Metastatic, Castration-resistant Prostate Cancer: Post Hoc Analyses of Data from a Phase 3 Trial. *Eur Urol*. 2019; 76(3): 306–312.
98. Cairns P, Esteller M, Herman JG, Sidransky D, Schoenberg M, Sidransky D, et al. Molecular Detection of Prostate Cancer in Urine by GSTP1 Hypermethylation. *Clin Cancer Res*. 2001; 7(9): 2727–2730.

99. Jerónimo C, Usadel H, Henrique R, Silva C, Oliveira J, Lopes C, et al. Quantitative GSTP1 Hypermethylation in Bodily Fluids of Patients with Prostate Cancer. *Urology* 2002; 60(6): 1131–1135.
100. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, Farinas AJ, et al. Aberrant Promoter Methylation Profile of Prostate Cancers and Its Relationship to Clinicopathological Features. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(2): 514–519.
101. Yamanaka M, Watanabe M, Yamada Y, Takagi A, Murata T, Takahashi H, et al. Altered Methylation of Multiple Genes in Carcinogenesis of the Prostate. *Int J Cancer* 2003; 106(3): 382–387.
102. Singal R, Ferdinand L, Reis IM, Schlesselman JJ. Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease. *Oncol Rep.* 2004; 12(3): 631–637.
103. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, et al. Hypermethylation of CpG Islands in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2004; 64(6): 1975–1986.
104. Bastian PJ, Ellinger J, Schmidt D, Wernert N, Wellmann A, Müller SC, et al. GSTP1 Hypermethylation as a Molecular Marker in the Diagnosis of Prostatic Cancer: is There a Correlation with Clinical Stage, Gleason Grade, PSA Value or Age? *Eur J Med Res.* 2004; 9(11): 523–527.
105. Tokumaru Y, Harden SV, Sun D, Yamashita K, Epsiein JI, Sidransky D. Optimal Use of a Panel of Methylation Markers with GSTP1 Hypermethylation in the Diagnosis of Prostate Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(16): 5518–5522.
106. Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Li LC, et al. Multigene Methylation Analysis for Detection and Staging of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(18): 6582–6588.
107. Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N, Heukamp LC, Müller SC, et al. Diagnostic and Prognostic Information in Prostate Cancer with the Help of a Small Set of Hypermethylated Gene Loci. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(11): 4097–4106.
108. Bastian PJ, Ellinger J, Heukamp LC, Kahl P, Müller SC, von Rücker A. Prognostic Value of CpG Island Hypermethylation at PTGS2, RAR-beta, EDNRB, and Other Gene Loci in Patients Undergoing Radical Prostatectomy. *Eur Urol.* 2007; 51(3): 665–674.

109. Richiardi L, Fiano V, Vizzini L, De Marco L, Delsedime L, Akre O, et al. Promoter Methylation in APC, RUNX3, and GSTP1 and Mortality in Prostate Cancer Patients. *J Clin Oncol.* 2009; 27(19): 3161–3168.
110. Zon G, Barker MA, Kaur P, Groshen S, Jones LW, Imam SA, et al. Formamide as a Denaturant for Bisulfite Conversion of Genomic DNA: Bisulfite Sequencing of the GSTP1 and RAR β 2 Genes of 43 Formalin-fixed Paraffin-embedded Prostate Cancer Specimens. *Anal Biochem.* 2009; 392(2): 117–125.
111. Lan VTT, Trang NT, Van DTH, Thuan TB, Van To T, Linh VD, et al. A Methylation-specific Dot Blot Assay for Improving Specificity and Sensitivity of Methylation-specific PCR on DNA Methylation Analysis. *Int J Clin Oncol.* 2015; 20(4): 839–845.
112. Zhang W, Jiao H, Zhang X, Zhao R, Wang F, He W, et al. Correlation Between the Expression of DNMT1, and GSTP1 and APC, and the Methylation Status of GSTP1 and APC in Association with their Clinical Significance in Prostate Cancer. *Mol Med Rep.* 2015; 12(1): 141–146.
113. Martignano F, Gurioli G, Salvi S, Calistri D, Costantini M, Gunelli R, et al. GSTP1 Methylation and Protein Expression in Prostate Cancer: Diagnostic Implications. *Dis Markers* 2016; 2016: 4358292.
114. Vo TT, Ta BT, Ta VT, Vuong DL, Nguyen QU. Promoter Methylation Profile of GSTP1 and RASSF1A in Prostate Cancer and Benign Hyperplasia in Vietnamese Men. *Turk J Med Sci.* 2016; 46(1): 228–235.
115. Sánchez BE, Aguayo A, Martínez B, Rodríguez F, Marmolejo M, Svyryd Y, et al. Using Genetic and Epigenetic Markers to Improve Differential Diagnosis of Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia by Noninvasive Methods in Mexican Patients. *Clin Genitourin Cancer* 2018; 16(4): e867–877.
116. Hoque MO, Topaloglu O, Begum S, Henrique R, Rosenbaum E, Van Criekinge W, et al. Quantitative Methylation-specific Polymerase Chain Reaction Gene Patterns in Urine Sediment Distinguish Prostate Cancer Patients from Control Subjects. *J Clin Oncol.* 2005; 23(27): 6569–6575.
117. Rouprêt M, Hupertan V, Yates DR, Catto JW, Rehman I, Meuth M, et al. Molecular Detection of Localized Prostate Cancer Using Quantitative Methylation-specific PCR on Urinary Cells Obtained Following Prostate Massage. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(6): 1720–1725.

118. Dimitriadis E, Kalogeropoulos T, Velaeti S, Sotiriou S, Vassiliou E, Fasoulis L, et al. Study of Genetic and Epigenetic Alterations in Urine Samples as Diagnostic Markers for Prostate Cancer. *Anticancer Res.* 2013; 33(1): 191–198.
119. Chuang CK, Chu DC, Tzou RD, Liou SI, Chia JH, Sun CF. Hypermethylation of the CpG Islands in the Promoter Region Flanking GSTP1 Gene is a Potential Plasma DNA Biomarker for Detecting Prostate Carcinoma. *Cancer Detect Prev.* 2007; 31(1): 59–63.
120. Rouprêt M, Hupertan V, Catto JW, Yates DR, Rehman I, Proctor LM, et al. Promoter Hypermethylation in Circulating Blood Cells Identifies Prostate Cancer Progression. *Int J Cancer* 2008; 122(4): 952–956.
121. Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF Proteins in Cancer; from Epigenetic Silencing to Functional Characterization. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796(2): 114–128.
122. Volodko N, Gordon M, Salla M, Ghazaleh HA, Baksh S. RASSF Tumor Suppressor Gene Family: Biological Functions and Regulation. *FEBS Lett.* 2014; 588(16): 2671–2684.
123. Markulin D, Vojta A, Samaržija I, Gamulin M, Bečeheli I, Jukić I, et al. Association between RASSF1A Promoter Methylation and Testicular Germ Cell Tumor: A Meta-analysis and a Cohort Study. *Cancer Genomics Proteomics* 2017; 14(5): 363–372.
124. Huang YQ, Guan H, Liu CH, Liu DC, Xu B, Jiang L, et al. Association between RASSF1A Promoter Methylation and Renal Cell Cancer Susceptibility: A Meta-analysis. *Huang Genet Mol Res.* 2016; 15(2): 1–13.
125. Zhan L, Zhang B, Tan Y, Yang C, Huang C, Wu Q, et al. Quantitative Assessment of the Relationship between RASSF1A Gene Promoter Methylation and Bladder Cancer (PRISMA). *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(7): e6097.
126. Niu H, Yang J, Yang K, Huang Y. The Relationship between RASSF1A Promoter Methylation and Thyroid Carcinoma: A Meta-Analysis of 14 Articles and a Bioinformatics of 2 Databases (PRISMA). *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(46): e8630.
127. Huang YZ, Wu W, Wu K, Xu XN, Tang WR. Association of RASSF1A Promoter Methylation with Lung Cancer Risk: A Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(23): 10325–10328.

128. Shi H, Li Y, Wang X, Lu C, Yang L, Gu C, et al. Association between RASSF1A Promoter Methylation and Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2013; 8(10): 4–10.
129. Pan J, Chen J, Zhang B, Chen X, Huang B, Zhuang J, et al. Association between RASSF1A Promoter Methylation and Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013; 8(9): 1–8.
130. Aitchison A, Warren A, Neal D, Rabbitts P. RASSF1A Promoter Methylation is Frequently Detected in both Pre-Malignant and Non-Malignant Microdissected Prostatic Epithelial Tissues. *Prostate* 2007; 67(6): 638–644.
131. Mehrotra J, Varde S, Wang H, Chiu H, Vargo J, Gray K, et al. Quantitative, Spatial Resolution of the Epigenetic Field Effect in Prostate Cancer. *Prostate* 2008; 68(2): 152–160.
132. Kawamoto K, Okino ST, Place RF, Urakami S, Hirata H, Kikuno N, et al. Epigenetic Modifications of RASSF1A Gene Through Chromatin Remodeling in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(9): 2541–2548.
133. Liu L, Yoon JH, Dammann R, Pfeifer GP. Frequent Hypermethylation of the RASSF1a Gene in Prostate Cancer. *Oncogene* 2002; 21(44): 6835–6840.
134. Cho NY, Kim BH, Choi M, Yoo EJ, Moon KC, Cho YM, et al. Hypermethylation of CpG Island Loci and Hypomethylation of LINE-1 and Alu Repeats in Prostate Adenocarcinoma and Their Relationship to Clinicopathological Features. *J Pathol*. 2007; 211(2): 269–277.
135. Syeed N, Sameer AS, Hamid A, Shah ZA, Afroze D, Rasool R, et al. Promoter Methylation Profile of GSTP1 and RASSF1A in Benign Hyperplasia and Metastatic Prostate Cancer Patients in a Kashmiri Population. *Mol Med Rep*. 2010; 3(5): 883–887.
136. Vasiljević N, Wu K, Brentnall AR, Kim DC, Thorat MA, Kudahetti SC, et al. Absolute Quantitation of DNA Methylation of 28 Candidate Genes in Prostate Cancer Using Pyrosequencing. *Dis Markers* 2011; 30(4): 151–161.
137. Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, et al. Retinoic Acid Receptors and Retinoid X Receptors: Interactions with Endogenous Retinoic Acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(1): 30–34.

138. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Islands in Vertebrate Genomes. *J Mol Biol.* 1987; 196(2): 261–282.
139. Di Masi A, Leboffe L, De Marinis E, Pagano F, Cicconi L, Rochette-Egly C, et al. Retinoic Acid Eeceptors: From Molecular Mechanisms to Cancer Therapy. *Mol Aspects Med.* 2015; 41: 111–115.
140. Walter RFH, Rozynek P, Casjens S, Werner R, Mairinger FD, Speel EJM, et al. Methylation of L1RE1, RARB, and RASSF1 Function as Possible Biomarkers for the Differential Diagnosis of Lung Cancer. *PLoS One* 2018; 13(5): 1–17.
141. Fang C, Jian ZY, Shen XF, Wei XM, Yu GZ, Zeng XT. Promoter Methylation of the Retinoic Acid Receptor Beta2 (RAR β 2) is Associated with Increased Risk of Breast Cancer: A PRISMA Compliant Meta-analysis. *PLoS One* 2015; 10(10): 1–14.
142. Lenko V, Bialesova L, Macejova D, Bujdak P, Breza J, Brtko J. The Relationship between Renal Cell Carcinoma and Nuclear Retinoid/rexinoid Receptors. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013; 157(4): 316–324.
143. Gao T, He B, Pan Y, Li R, Xu Y, Chen L, et al. The Association of Retinoic Acid Receptor Beta2 (RAR β 2) Methylation Status and Prostate Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2013; 8(5): 1–7.
144. Dou M, Zhou X, Fan Z, DIng X, Li L, Wang S, et al. Clinical Significance of Retinoic Acid Receptor Beta Promoter Methylation in Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 45(6): 2497–2505.
145. Tang D, Kryvenko ON, Mitrache N, Do KC, Jankowski M, Chitale DA, et al. Methylation of the RARB Gene Increases Prostate Cancer Risk in Black Americans. *J Urol.* 2013; 190(1): 317–324.
146. Nakayama T, Watanabe M, Yamanaka M, Hirokawa Y, Suzuki H, Ito H, et al. The Role of Epigenetic Modifications in Retinoic Acid Receptor β 2 Gene Expression in Human Prostate Cancers. *Lab Invest.* 2001; 81(7): 1049–1057.
147. Zhang J, Liu L, Pfeifer GP. Methylation of the Retinoid Response Gene TIG1 in Prostate Cancer Correlates with Methylation of the Retinoic Acid Receptor Beta Gene. *Oncogene* 2004; 23(12): 2241–2249.
148. Ameri A, Alidoosti A, Hosseini Y, Parvin M, Emranpour MH, Taslimi F, et al. Prognostic Value of Promoter Hypermethylation of Retinoic Acid


- Receptor Beta (RAR β) and CDKN2 (p16/MTS1) in Prostate Cancer. *Chin J Cancer Res.* 2011; 23(4): 306–311.
149. Dumache R, Puiu M, Minciu R, Bardan R, David D, Tudor A, et al. Retinoic Acid Receptor β 2 (RAR β 2): Noninvasive Biomarker for Distinguishing Malignant versus Benign Prostate Lesions from Bodily Fluids. *Chir.* 2012; 109(6): 780–784.
 150. Epstein JI, William CAJ, Amin MB, Egevad LL. Grading Committee (2005) The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(9): 1228–1242.
 151. Eifler JB, Feng Z, Lin BM, Partin MT, Humphreys EB, Han M, et al. An Updated Prostate Cancer Staging Nomogram (Partin Tables) Based on Cases from 2006 to 2011. *BJU Int.* 2013; 111(1): 1–14.
 152. Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, et al. Epigenetic Inactivation of RASSF1A in Lung and Breast Cancers and Malignant Phenotype Suppression. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(9): 691–699.
 153. Costa VL, Henrique R, Ribeiro FR, Pinto M, Oliveira J, Lobo F, et al. Quantitative Promoter Methylation Analysis of Multiple Cancer-related Genes in Renal Cell Tumors. *BMC Cancer* 2007; 7: 133.
 154. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of Aberrant Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Serum DNA from Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Res.* 1999; 59(15): 3853.
 155. Lehmann U, Länger F, Feist H, Glöckner S, Hasemeier B, Kreipe H. Quantitative Assessment of Promoter Hypermethylation During Breast Cancer Development. *Am J Pathol.* 2002; 160(2): 605–612.
 156. Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, et al. Epigenetic Patterns in the Progression of Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2001; 61(8): 3410–3418.
 157. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402–408.
 158. Tolkach Y, Kristiansen G. The Heterogeneity of Prostate Cancer: A Practical Approach. *Pathobiology* 2018; 85(1–2): 108–116.

159. Imnadze M, Sjoberg DD, Vickers AJ. Adverse Pathologic Features at Radical Prostatectomy: Effect of Preoperative Risk on Oncologic Outcomes. *Eur Urol.* 2016; 69(1): 143–148.
160. Jeldres C, Suardi N, Walz J, Hutterer GC, Ahyai S, Lattouf JB, et al. Validation of the Contemporary Epstein Criteria for Insignificant Prostate Cancer in European Men. *Eur Urol.* 2008; 54(6): 1306–1313.
161. Beauval JB, Ploussard G, Soulié M, Pfister C, Van Agt S, Vincendeau S, et al. Pathologic Findings in Radical Prostatectomy Specimens from Patients Eligible for Active Surveillance with Highly Selective Criteria: A Multicenter Study. *Urology* 2012; 80(3): 656–660.
162. Epstein JI, Feng Z, Trock BJ, Pierorazio PM. Upgrading and Downgrading of Prostate Cancer from Biopsy to Radical Prostatectomy: Incidence and Predictive Factors using the Modified Gleason Grading System and Factoring in Tertiary Grades. *Eur Urol.* 2012; 61(5): 1019–1024.
163. Sehdev AE, Pan CC, Epstein JI. Comparative Analysis of Sampling Methods for Grossing Radical Prostatectomy Specimens Performed for Nonpalpable (Stage T1c) Prostatic Adenocarcinoma. *Hum.* 2001; 32(5): 494–499.
164. Kuroiwa K, Shiraishi T, Naito S. Gleason Score Correlation between Biopsy and Prostatectomy Specimens and Prediction of High-grade Gleason Patterns: Significance of Central Pathologic Review. *Urology* 2011; 77(2): 407–411.
165. Orosco RK, Tapia VJ, Califano JA, Clary B, Cohen EEW, Kane C, et al. Positive Surgical Margins in the 10 Most Common Solid Cancers. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 1–9.
166. Tan WS, Krimphove MJ, Cole AP, Marchese M, Berg S, Lipsitz SR, et al. Variation in Positive Surgical Margin Status after Radical Prostatectomy for pT2 Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2019; 17(5): e1060–1068.
167. Freedland SJ, Kane CJ, Amling CL, Aronson WJ, Terris MK, Presti JC. Upgrading and Downgrading of Prostate Needle Biopsy Specimens: Risk Factors and Clinical Implications. *Urology* 2007; 69(3): 495–499.
168. Ham WS, Chalfin HJ, Feng Z, Trock BJ, Epstein JI, Cheung C, et al. The Impact of Downgrading from Biopsy Gleason 7 to Prostatectomy Gleason 6 on Biochemical Recurrence and Prostate Cancer Specific Mortality. *J Urol.* 2017; 197(4): 1060–1067.

169. Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, et al. Risk of Prostate Cancer–Specific Mortality Following Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. *JAMA* 2005; 294(4): 433–439.
170. Moussa AS, Kattan MW, Berglund R, Yu C, Fareed K, Jones JS. A Nomogram for Predicting Upgrading in Patients with Low- and Intermediate-grade Prostate Cancer in the Era of Extended Prostate Sampling. *BJU Int.* 2010; 105(3): 352–358.
171. Truong M, Slezak JA, Lin CP, Iremashvili V, Sado M, Razmaria AA, et al. Development and Multi-institutional Validation of an Upgrading Risk Tool for Gleason 6 Prostate Cancer. *Cancer* 2013; 119(22): 3992–4002.
172. Qi F, Zhu K, Cheng Y, Hua L, Cheng G. How to Pick Out the “Unreal” Gleason 3 + 3 Patients: A Nomogram for More Precise Active Surveillance Protocol in Low-Risk Prostate Cancer in a Chinese Population. *J Invest Surg.* 2019: 1–8.
173. Goel S, Shoag JE, Gross MD, Al Hussein Al Awamlh B, Robinson B, Khani F, et al. Concordance Between Biopsy and Radical Prostatectomy Pathology in the Era of Targeted Biopsy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Oncol.* 2020; 3(1): 10–20.

14. PRIEDAI

1 priedas. Lietuvos bioetikos komiteto leidimo kopija



LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS
 Kodas 188710595, Didžioji g. 22, LT-01128 Vilnius, tel./faks. + (370-5) 212 45 65, www.sam.lt/bioetika

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2007-11-23 Nr.: 50


Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Molekulinį priešinės liaukos vėžio žymenų vertę prognozuojant ligos klinikinę eigą“	
Protokolo Nr.: 1 Versija: 2 Data: 2007 m. lapkričio 15 d.	
Asmens informavimo forma ir informuoto asmens sunkimo forma: Formos Nr.: 1 Versija: 1 Data: 2007 m. lapkričio 15 d.	
Pagrindinis tyrėjas: Prof. Feliksas Jankevičius	
Biomedicininio tyrimo vieta: Istaigos pavadinimas: VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė „Santariškių klinika“ Urologijos centras Istaigos adresas: Santariškių g. 2, Vilnius Istaigos pavadinimas: Vilniaus universitetas Gamtos mokslų fakultetas Ekologinės Genetikos laboratorija Istaigos adresas: Čiurlionio g. 21/27, Vilnius Istaigos pavadinimas: Valstybinis patologijos centras Istaigos adresas: P. Baublio g. 5, Vilnius	


Leidimas išduotas Lietuvos bioetikos komiteto posėdžio, įvykusio 2007 m. lapkričio 20 d., sprendimu.

Lietuvos bioetikos komiteto biomedicininių tyrimų ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1	Gyd. Gintarė Breivienė	Pediatrija	taip
2	Gyd. Vytautas Cepulis	Onkologija	taip
3	Doc. Eugenijus Gefenas	Bioetika	taip
4	Doc. Zita Liubarskienė	Filosofija	taip
5	Dr. Andrius Narbekovas	Teologija	taip
6	Prof. Algimantas Rausgalis	Pediatrija	taip
7	Doc. Krescentius Stoškus	Filosofija	taip
8	Gyd. Vytautas Turkus	Mikrochirurgija	ne
9	Dalia Zeleckienė	Teisė	ne

Lietuvos bioetikos komitetas dirba vadovaudamasis Geros Klinikinės Praktikos taisyklėmis, kurias siūloma priimti Europos Sąjungos, Ispanijos ir JAV valdžios struktūroms

Pirmininkas





Eugenijus Gefenas

100/100
07/12 2007 11:58 FAX

2 priedas. Lietuvos bioetikos komiteto leidimo pratęsimo kopija



LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS

Valstybės biudžetinė įstaiga, Didžioji g. 22, LT-01128 Vilnius, tel. (8 5) 212 4565,
faks. (8 5) 260 8640, el. p. lbesk@sam.lt, <http://bioetika.sam.lt>
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 188710595

Pagrindiniam biomedicininio tyrimo tyrėjui 2011-09-07 Nr. 6B-11-
Prof. Feliksui Jankevičiui į 2011-09-01 Nr.

El. paštas: Feliksas.Jankevicius@santa.lt

kodas: 07-11-16

DĖL BIOMEDICININIO TYRIMO „MOLEKULINIŲ PRIEŠINĖS LIAUKOS VĖŽIO ŽYMENŲ VERTĖ PROGNOZUOJANT LIGOS KLINIKINĘ EIGĄ“

2011 m. rugsėjo 6 d. vykusiame Lietuvos bioetikos komiteto Biomedicininį tyrimų ekspertų grupės posėdyje buvo svarstomas Jūsų pateiktas prašymas dėl biomedicininio tyrimo „Molekulinių priešinės liaukos vėžio žymenų vertė prognozuojant ligos klinikinę eigą“ (Protokolo Nr. 1) pratęsimo bei papildomų biologinės medžiagos mėginių ištyrimo.

Atsižvelgiant į prašyme išdėstytus argumentus, posėdyje nutarta pritarti tyrimo trukmės pratęsimui iki 2012 metų sausio 1 dienos, papildomų 200 pacientų mėginių, surinktų iki 2011 m. rugsėjo 2 d. ištyrimo atleidžiant nuo reikalavimo gauti informuoto asmens sutikimą bei pacientų, kurie bus operuojami nuo 2011 m. rugsėjo 2 d. iki 2011 m. gruodžio 31 d. mėginių ištyrimui gaunant šių asmenų informuoto asmens sutikimą, numatytą šios studijos protokole.

Taip pat norėtume atkreipti dėmesį, kad vadovaujantis Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymu „Dėl leidimų atlikti biomedicininį tyrimą išdavimo tvarkos aprašo patvirtinimo“ (Žin., 2008, Nr. ~~6-225~~ 2010, Nr. ~~55-2706~~ 2011, Nr. ~~233-1570~~) 18¹ punktu biomedicininio tyrimo užsakovas, jo įgaliotas atstovas ar tyrimo pagrindinis tyrėjas per 30 kalendorinių dienų privalo raštu pranešti leidimą atlikti biomedicininį tyrimą išdavusiai institucijai (Lietuvos bioetikos komitetui ar regioniniam biomedicininį tyrimų etikos komitetui) apie tyrimo pabaigą ir per 90 kalendorinių dienų pateikti tyrimo vykdymo ataskaitos santrauką.

Direktorius

Eugenijus Gefenas

Asta Čekanauskaitė, 243 0009

3 priedas. Higienos instituto leidimo kopija

Originalas nebus stunžiamas



HIGIENOS INSTITUTAS

Budžetinė įstaiga, Didžioji g. 22, LT-01128 Vilnius, tel. (8 5) 262 4583, faks. (8 5) 262 4663, el. p. institutas@hi.lt, www.hi.lt
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 111958286

Arnui Bakavičiui

2019-10-24 Nr. (9-20) 01-517
| 2019-10-17 el. laiška

DĖL DUOMENŲ PATEIKIMO

Higienos institutas, atsakydamas į Jūsų 2019 m. spalio 17 d. prašymą, teikia duomenis apie mirusių asmenų mirties datą, pagrindinę mirties priežastį ir dauginę mirties priežastis (pagal Tarptautinę statistinę ligų ir sveikatos sutrikimų klasifikaciją (Australijos modifikacija, TLK-10-AM).

Duomenys bus pateikti atsakingam asmeniui Arnei Bakavičiui el. paštu arnas.bakavicius@gmail.com siunčiant elektroninį laišką su koduotu informacijos pateikimo dokumentu, papildomai išsiunčiant kitą elektroninį laišką su slaptažodžiu koduotam informacijos pateikimo dokumentui atrakinti.

PRIDEDAMA. Duomenys apie nurodytus mirusius asmenis, MS Excel failas (tik el. paštu).

Direktorius

Remigijus Jankauskas

R. Ustinavičienė, (8 5) 277 3305, el. p. ruta.ustinaviciene@hi.lt

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 30 egz.