

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.151>

<https://orcid.org/0000-0002-3751-1352>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Beata
VINCEL

Nenusileidusių sėklidžių histologijos ir genų raiškos koreliacija

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai,
Medicina (M 001)

VILNIUS 2021

Disertacija rengta 2016–2020 metais Vilniaus universitete.
Mokslinis tyrimas finansuotas Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto ir
Europos socialinio fondo lėšomis pagal Visuotinės dotacijos priemonę.

Mokslinis vadovas

Doc. dr. Gilvydas Verkauskas (Vilniaus universitetas, medicinos ir
sveikatos mokslai, medicina – M 001).

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.151>

<https://orcid.org/0000-0002-3751-1352>

VILNIUS UNIVERSITY

Beata

VINCEL

Correlation between Histology and Gene Expression in Cryptorchidism

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and health sciences,

Medicine (M 001)

VILNIUS 2021

This dissertation was written between 2016 and 2020 at Vilnius University. The research was supported by the Faculty of Medicine, Vilnius University and by the European Social Fund under the Global Grant measure.

Academic supervisor

Assoc. Prof. Dr. Gilvydas Verkauskas (Vilnius University, Medicine and health sciences, Medicine – M 001).

TURINYS

SANTRUMPOS IR SAŲOKOS	8
ĮVADAS.....	10
1. Tiriamoji problema.....	10
2. Darbo aktualumas.....	11
3. Darbo tikslas.....	12
4. Darbo uždaviniai	12
5. Darbo naujumas ir praktinė reikšmė	12
6. Disertacijos ginamieji teiginiai.....	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Kriptorchizmas	14
1.1.1. Epidemiologija	14
1.1.2. Etiologija	14
1.2. Mažasis lytinis brendimas	15
1.3. Sėklidžių biopsija	16
1.3.1. Nenusileidusių sėklidžių histologija.....	16
1.3.2. Preparatų paruošimo metodo reikšmė tiriant sėklidžių biopsijas	16
1.4. Genetiniai kriptorchizmo ir nevaisingumo tyrimai.....	17
1.4.1. Platūs genetiniai tyrimai.....	17
1.4.2. Genų raiška nenusileidusiose sėklidėse.....	19
1.4.3. Hormonų poveikis genų raiškai.....	20
1.5. Ilgos nekoduojančios RNR.....	21
2. DARBO METODOLOGIJA.....	24
2.1. Tyrimo etapai.....	24
2.2. Tyrimo eiga	25
2.2.1 Įtraukimo kriterijai	25
2.2.2 Neįtraukimo kriterijai.....	25
2.3. Tiriamoji medžiaga ir metodika	29

2.3.1	Sėklidės biopsija: atlikimas ir histologinis ištyrimas	29
2.3.2	RNR gryninimas.....	33
2.3.3	RNR sekoskaitos bibliotekų ruošimas.....	33
2.3.4	RNR sekoskaita	33
2.3.5	RNR sekoskaitos duomenų analizė	34
2.3.6	RNR raiškos lygio kiekybinis įvertinimas.....	34
2.4.	Statistinė analizė	34
2.4.1	Duomenų ir diferencinė genų raiškos analizė	35
2.4.2	nkRNR duomenų analizė	37
3.	REZULTATAI.....	38
3.1.	GnRHa poveikis vyrų vaisingumo potencialo atkūrimui	38
3.2.	Genų raiška nenusileidusiose sėklidėse (34)	40
3.3.	Hormoninio gydymo poveikis nenusileidusių sėklidžių genų raiškai	41
3.3.1	GnRHa poveikis genų, dalyvaujančių testosterono sintezėje, raiškai	43
3.4.	nkRNR raiška nenusileidusiose sėklidėse, jų funkcijos ir GnRHa poveikis jų raiškai	46
4.	REZULTATŲ APTARIMAS	54
4.1.	GnRHa atkuria vyrų vaisingumo potencialą.....	55
4.2.	GnRHa padidina genų, dalyvaujančių centrinės nervų sistemos vystymesi ir LH sekrecijoje, raišką.....	56
4.3.	GnRHa nenusileidusiose sėklidėse sužadina genus, dalyvaujančius testosterono sintezėje	58
4.4.	GnRHa nenusileidusiose sėklidėse sužadina alternatyvius kelius ir genų šeimas.....	59
4.5.	nkRNR raiška nenusileidusiose sėklidėse	60
4.5.1.	GnRHa veikia nkRNR, dalyvaujančias X chromosomos inaktyvacijos procese	60
4.5.2.	GnRHa veikia signalų perdavimo kelius.....	61
4.5.3.	GnRHa veikia epigenetinius faktorius	62
4.5.4.	GnRHa veikia genus, susijusius su normaliu ir pataloginiu ląstelių dalijimusi.....	64

4.5.5. <i>TINCR</i> raiška ir jos ryšys su epigenetinių modifikatorių raiška nenusileidusiose sėklidėse	66
4.6. GnRH α sužadina genus, dalyvaujančius ląstelių diferenciacijoje, morfogenezeje ir palaikančius genomo stabilumą	68
IŠVADOS.....	71
REKOMENDACIJOS.....	72
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	73
PRIEDAI	91
PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS	98
PADĖKA.....	100
<i>CURRICULUM VITAE</i>	101

SANTRUMPOS IR SAŲVOKOS

Ad/T	– Ad spermatogonijų kiekis tubulėje
AR	– androgenų receptorius
bp	– bazių pora – vienetas, sudarytas iš dviejų nukleobazių
DNR	– deoksiribonukleino rūgštis
Filtro pralaidumas klasteriams	– angl. <i>Clusters Passing Filter</i> , klasterių procentas, kuris praeina pro filtrą (% PF), parodo signalo iš kiekvieno klasterio švarumą
FC	– absoliutus raiškos pokytis kartais (angl. <i>fold-change</i>)
FDR	– kriterijaus reikšmingumo lygmuo (angl. <i>false discovery rate</i>)
GCNIS	– germinacinių ląstelių neoplazija in situ (angl. <i>germ cell neoplasia in situ</i>)
GnRH	– gonadotropinus atpalaiduojantis hormonas
GnRHα	– gonadotropinus atpalaiduojančio hormono analogas
GnRHR	– gonadotropinus atpalaiduojančio hormono receptorius
HCA	– hierarchinė klasterinė analizė (angl. <i>hierarchical cluster analysis</i>)
HIR	– didelė nevaisingumo rizika (angl. <i>hight infertility risk</i>)
HPG ašis	– pagumburio-hipofizės-lytinių liaukų ašis (angl. <i>HPG axis</i>)
LH	– liuteinizuojantis hormonas
LHRHα	– liuteinizuojančio hormono atpalaiduojančio hormono analogas
LIR	– maža nevaisingumo rizika (angl. <i>low infertility risk</i>)
log₂FC	– absoliutaus raiškos pokyčio kartais binarinis logaritmas
M	– molinės koncentracijos matavimo vienetas, moliarumas (molekulių arba molekulių molių skaičius tūrio vienetė (moliai/litre); μ M – mikro moliarumas (1×10^{-6} molių litre), nM – nano moliarumas (1×10^{-9} molių litre), pM – piko moliarumas (1×10^{-12} molių litre)
MAD	– vidutinis absoliutus nuokrypis (angl. <i>median absolute deviation</i>)
Md	– mediana
NAT	– natūralus antiprasminis transkriptas (angl. <i>natural antisense transcript</i>)
PCA	– pagrindinio komponento analizė (angl. <i>principal component analysis</i>)
RNR	– ribonukleino rūgštis: <ul style="list-style-type: none">· ainkRNR – antiprasminė ilga nekoduojanti RNR (angl. <i>antisense long non-coding RNA, AS-lncRNA</i>)· iinkRNR – ilga intergeninė nekoduojanti RNR (angl. <i>long intergenic non-coding RNA, lincRNA</i>)

- **inkRNR** – ilga nekoduojanti RNR (angl. *long non-coding RNA, lncRNA*)
 - **mRNR** – informacinė RNR
 - **nkRNR** – nekoduojanti RNR
- RPKM** – fragmentų skaičius kilobazėje iš milijono kartografuotų fragmentų (angl. *reads per kilo base per million mapped reads*)
- S/T** – spermatogonijų kiekis tubulėje
- TFI** – tubulių fertilumo indeksas
- VUL SK** – Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

ĮVADAS

1. Tiriamoji problema

Nenusileidusios sėklidės yra dažniausias įgimtas sutrikimas, diagnozuojamas naujagimiams berniukams. Lietuvoje kriptorchizmo dažnis tarp naujagimių siekia 5,7 % (1). Neišnešiotiems naujagimiams nenusileidusios sėklidės diagnozuojamos dažniau, iki 18,1 % atvejų (1). Per pirmuosius gyvenimo metus daliai berniukų sėklidės savaime nusileidžia į kapšelį, todėl kriptorchizmo dažnis tarp vienerių metų amžiaus vaikų sumažėja ir yra 1,4 % (1). Tai yra glaudžiai susiję su problema teisingai nustatant diagnozę mažiems berniukams. Pasaulyje nenusileidusių sėklidžių dažnis svyruoja tarp 2–9 %, o tarp neišnešiotų naujagimių siekia iki 45,3 % (2–4). 30 % berniukų diagnozuojamas abipusis kriptorchizmas (5). Kriptorchizmo išsivystymui turi įtakos anatomiciniai, hormoniniai, genetiniai, aplinkos veiksniai, t. y. ligos etiologija yra daugiaveiksmė. Ši liga gali pasireikšti kaip atskiras, nepriklausomas sutrikimas, vadinamasis izoliuotas kriptorchizmas, arba būti kitų ligų, sindromų ar būklių dalimi – sindrominis kriptorchizmas (pvz., Prader-Willi, Kallmann sindromai, lytinio vystymosi sutrikimai) (6, 7). Iki šiol daugelio nenusileidusių sėklidžių atvejų etiologija yra nežinoma. Yra nustatyta, kad mažas gimimo svoris, motinos rūkymas ir gestacinis diabetas, nutukimas iki pastojimo yra kriptorchizmo rizikos veiksniai (1, 8–10). Pastaruoju metu literatūroje hipogonadotropinis hipogonadizmas nurodomas kaip viena iš pagrindinių kriptorchizmo priežasčių (11–13). 70 % atvejų nenusileidusiose sėklidėse aptinkama pakitimų, būdingų hipogonadotropiniam hipogonadizmui: germinacinių ląstelių stoka, įvairaus laipsnio gonocitų į Ad spermatogonijas virsmo sutrikimai, Leydig ląstelių atrofija (11, 14). Kriptorchizmas siejamas su vyrų nevaisingumu ir iki 5–10 kartų padidėjusia sėklidžių vėžio išsivystymo rizika (15–19). Nenusileidusios sėklidės yra viena iš pagrindinių vyrų neobstrukcinės azoospermijos priežasčių (20). Šiuolaikinė kriptorchizmo gydymo taktika yra operacija – sėklidės (-ių) nuleidimas pirmaisiais gyvenimo metais (geriausia 6–9 mėnesių amžiuje) (21–24). Tačiau vien operacinis gydymas negarantuoja vyrų neobstrukcinio nevaisingumo dėl nenusileidusių sėklidžių išgydymo (17, 18, 25–27). Sumažėjęs vaisingumo potencialas siejamas su endokrininės sistemos pažeidimais, kuriuos lemia genų, valdančių pagumburio-hipofizės-lytinių liaukų (HPG) ašį ir genų, dalyvaujančių lytinių ląstelių vystymesi, raiškos sumažėjimas ar išnykimas (28–36). Tarp 30-os ir 90-os dienos po gimimo yra aktyvuojama HPG ašis. Tai lemia trumpalaikį gonadotropinų ir testosterono kiekių padidėjimą

kraujyje (37, 38). Šis laikotarpis vadinamas mažuoju lytiniu brendimu (angl. *mini-puberty*). Jį pirmą kartą 1973 m. aprašė Forest ir kt. (39). Mažajo lytinio brendimo metu gonocitai virsta į Ad spermatogonijas – spermatogenezės kamienines ląsteles. Ši transformacija priklauso nuo testosterono koncentracijos (40). Kriptorchizmo atveju testosterono koncentracijos padidėjimas mažajo lytinio brendimo metu yra sutrikęs (13, 41–43). Tai lemia sutrikusį gonocitų virsmą į Ad spermatogonijas ir, galiausiai, vyrų nevaisingumą (40, 44). Šių vystymosi pakitimų sėklidėse svarba mažajo lytinio brendimo metu buvo nustatyta atlikus ilgalaikį prospektyvinių tyrimų. Tyrimas parodė, kad po sėkmingos sėklidžių nuleidimo operacijos vaisingumo atkūrimas priklauso nuo normalaus mažajo lytinio brendimo ir Ad spermatogonijų buvimo (11).

2. Darbo aktualumas

Mokslinėje literatūroje yra aprašyta tyrimų apie mažajo lytinio brendimo ir Ad spermatogonijų svarbą vyrų vaisingumui (11, 25, 26, 40, 45–48). Taip pat yra atliktų tyrimų, atskleidžiančių kriptorchizmo adjuvantinio hormoninio gydymo reikšmę atstatant vaisingumo potencialą, kai yra atkuriamas normalus mažasis lytinis brendimas ir gonocitų virsmas į Ad spermatogonijas (44, 49–55). Tačiau trūksta prospektyvinių randomizuotų tyrimų, įrodančių hormoninio gydymo veiksmingumą.

Siekiant nuodugniau išsiaiškinti kriptorchizmo sukeliama vyrų nevaisingumo priežastis, pasaulyje pradėti vykdyti platūs genetiniai tyrimai (56, 57). Lietuvoje kriptorchizmo genetinių tyrimų iniciatoriumi, bendradarbiaudamas bendrame Lietuvos mokslo tarybos (Europos socialinio fondo) projekte, tapo prof. F. Hadziselimovič (Listalis, Šveicarija) su Kriptorchizmo tyrimo instituto mokslininkų komanda (29, 30, 60, 61, 31–36, 58, 59). Palyginus kriptorchizmo didelės (HIR) ir mažos (LIR) nevaisingumo rizikos grupes, nustatyta, kad tarp jų yra nemažai genų raiškos skirtumų, kurie pabrėžia nepažeistos HPG ašies svarbą vykstant normaliai spermatogenezei (29, 31). HIR grupėje nustatyta sumažėjusi *PROK2*, *CHD7*, *FGFR1* ir *SPRY4* genų raiška, kuri sukelia nepakankamą liuteinizuojančio hormono (LH) sekreciją, dėl ko sutrinka mažasis lytinis brendimas ir išsivysto nevaisingumas (34). Kaip minėta, yra nustatyta, kad adjuvantinis hormoninis gydymas padeda atstatyti vaisingumo potencialą. Be to, pastaruoju metu atlikti tyrimai padeda atskleisti šio proceso molekulinis mechanizmus, adjuvantinio hormoninio gydymo poveikį genų raiškai (58, 62). Taip pat tai atveria duris naujoms mokslinėms kriptorchizmo etiologijos hipotezėms.

3. Darbo tikslas

Nustatyti histologinį sėklidžių atsaką į hormoninį gydymą ir įvertinti genų raiškos pokyčių santykį su histologija.

4. Darbo uždaviniai

1. Ištirti kriptorchizmo adjuvantinio hormoninio gydymo gonadotropinus atpalaiduojančio hormono analogu (GnRHa) poveikį Ad spermatogonijų atsiradimui.
2. Palyginti skirtingų nevaisingumo rizikos grupių sėklidžių histologinius duomenis su genų raiška jose.
3. Apžvelgti genų, dalyvaujančių HPG ašies hormoniniame valdyme ir vaisingume, raiškos pokyčius priklausomai nuo nevaisingumo rizikos, nustatytos histologiškai, bei taikant adjuvantinį hormoninį kriptorchizmo gydymą.
4. Apžvelgti galimai spermatogenezės reguliavime dalyvaujančių nekoduojančių RNR (nkRNR) raišką skirtingose nevaisingumo rizikos grupėse ir jų atsaką į gydymą GnRHa.

5. Darbo naujumas ir praktinė reikšmė

Mokslininkai iki šiol diskutuoja dėl kriptorchizmo adjuvantinio hormoninio gydymo naudos. Nepaisant nemažai paskelbtų darbų apie adjuvantinio hormoninio gydymo teigiamą poveikį vaisingumo potencialo atkūrimui (44, 49–55), Šiaurės šalių konsensusas 2007 metais į kriptorchizmo gydymo rekomendacijas hormoninio gydymo neįtraukė (21), o Europos urologų asociacijos ir Europos vaikų urologų asociacijos gairės rekomenduoja jį taikyti tik berniukams su abipus nenusileidusiomis sėklidėmis (22), (https://uroweb.org/guideline/paediatric-urology/#3_2). 2010 m. Biers ir Malone atliko publikuotų studijų, skirtų hormoninio kriptorchizmo gydymo įtakai vaisingumui, analizę ir priėjo prie išvados, kad adjuvantinis gydymas gonadotropinus atpalaiduojančiu hormonu (GnRH) yra saugus ir veiksmingas, ypač berniukams su abipus nenusileidusiomis sėklidėmis (63). Atliktas perspektyvinis randomizuotas tyrimas patvirtino mokslininkų išvadas. Tai laikytina dar vienu argumentu „už“ tai, kad, siekiant sumažinti vyrų nevaisingumo rodiklius, adjuvantinį hormoninį kriptorchizmo gydymą reikėtų įtraukti į tarptautines kriptorchizmo gydymo gaires ir konsensuą. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VUL SK) Vaikų chirurgijos skyriuje yra laikomasi tokios taktikos: tėvus supažindinus ir jiems pasirašius sutikimą,

atliekamas nevaisingumo rizikos vertinimas remiantis Ad spermatogonijų buvimu nenusileidusių sėklidžių biopsijose, o nustačius didelę nevaisingumo riziką, ligoniui skiriamas adjuvantinis gydymas GnRHa. Tikslingi tolimesni tyrinėjimai šioje srityje keičiant chirurginio ir hormoninio gydymo skyrimo gaires.

Vienas iš vyrų reprodukcinės biologijos srityje keliamų tikslų – išsiaiškinti kriptorchizmą grindžiančius molekulinis mechanizmus ir nustatyti efektyvų jo sukeliamų ilgalaikių padarinių gydymą. Remiantis mažojo lytinio brendimo hipoteze, ekspozicija lytiniais hormonams, vykstanti anksti gyvenime, tam tikru specifiniu lytiniais hormonams jautrumo laikotarpiu, sužadina lyties-specifinius vystymosi procesus. Labai svarbu, kad po pradinio stimulo transkripcijos pakitimai, sukelti išorinių ar vidinių signalų, tęstųsi, kad būtų išsaugoti molekuliniai diferencijuotų ląstelių bruožai. Atliktas tyrimas, vadovaujant prof. F. Hadziselimovič, rėmėsi anksčiau atliktais genetinėmis tyrimais, kuriuose nagrinėti molekuliniai mechanizmai, nulemiantys nevaisingumą sergant kriptorchizmu (29, 31, 32, 34). Kriptorchizmo tyrimo instituto (Listalis, Šveicarija) atlikti tyrimai taip pat analizavo nenusileidusių sėklidžių adjuvantinio hormoninio gydymo molekulinis mechanizmus, grindžiančius vaisingumo atkūrimą. Skirtingų šalių mokslininkų bendradarbiavimas leido atlikti ne tik prospektyvinį histologinį įvertinimą, bet ir pasiaiškinti patologinių radinių molekulinis mechanizmus. Tyrimo metu taip pat buvo pastebėta ilgų nekuoduojančių RNR (inkRNR) raiška, kurios galimai dalyvauja formuojant vyrų spermatogenezę ir vaisingumo potencialą. Pateikti rezultatai suteikia informacijos tolimesnei funkciniai inkRNR analizei nevaisingumo išsivystymo srityje (60).

6. Disertacijos ginamieji teiginiai

1. Adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa turi teigiamą poveikį vyrų vaisingumo potencialo atkūrimui, skatindamas gonocitų virsmą į Ad spermatogonijas.
2. Genų raiška nenusileidusiose sėklidėse koreliuoja su histologija: ji reikšmingai skiriasi didelės ir mažos nevaisingumo rizikos grupių sėklidėse.
3. Adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa gerina genų, dalyvaujančių HPG ašies hormoniniame valdyme ir vaisingume, raišką.
4. Nekoduojančios RNR atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant spermatogenezę.
5. GnRHa teigiamai veikia nekoduojančių RNR raišką nenusileidusiose sėklidėse.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kriptorchizmas

1.1.1. Epidemiologija

Nenusileidusios sėklidės yra dažniausias įgimtas sutrikimas, diagnozuojamas naujagimiams berniukams. Lietuvoje tarp naujagimių bendras kriptorchizmo dažnis siekia 5,7 % (1). Nenusileidusių sėklidžių dažni veikia gestacinis amžius gimstant ir gimimo svoris bei susijusios patologijos. Neišnešiotiems naujagimiams nenusileidusios sėklidės nustatomos dažniau, iki 18,1 % atvejų (1). Naujagimiams, gimimo metu sveriantiems iki 2 500 g, kriptorchizmas diagnozuojamas 21,6–50 % atvejų (1). Berniukai, kuriems diagnozuota kapšelio hipoplazija, hipospadija, mikropenis, sėklidės vandenė, kirkšnies išvarža, taip pat dažniau gali turėti nenusileidusias sėklides. Per pirmuosius gyvenimo metus daliai berniukų sėklidės savaime nusileidžia į kapšelį, todėl tarp vienerių metų vaikų kriptorchizmo dažnis sumažėja ir yra 1,4 % (1). Sijstermans ir kt. atliko literatūros apžvalgą apie kriptorchizmo paplitimą pasaulyje 1934–2006 metais. Mokslininkai nustatė, kad tarp gimimo metu neišnešiotų ir / ar sveriančių < 2 500 g naujagimių nenusileidusios sėklidės pasitaiko 1,1–45,3 % atvejų, o vienerių metų amžiuje šis dažnis sumažėja iki 1,9–7,3 % (2). Išnešiotiems ir / arba sveriantiems > 2 500 g naujagimiams kriptorchizmas diagnozuojamas 1–4,6 % atvejų tik gimus, o vienerių metų amžiuje – 1–1,5 % (2). Remiantis šiuo ir vėliau atliktais tyrimais, pasaulyje nenusileidusių sėklidžių dažnis svyruoja nuo 2 iki 9 % (2–4), o tarp neišnešiotų naujagimių siekia iki 45,3 % (2). Trečdaliui berniukų diagnozuojamas abipusis kriptorchizmas (5).

1.1.2. Etiologija

Kriptorchizmo etiologija yra daugiaveiksmė. Ligos išsivystymui turi įtakos anatominiai, hormoniniai, genetiniai ir aplinkos veiksniai. Ligos ir būklės, kurių metu yra sumažėjusi hormonų, dalyvaujančių sėklidžių nusileidime, koncentracija arba jų poveikis bei ligos, susijusios su anatominėmis malforacijomis, gali sukelti vadinamą sindrominį kriptorchizmą (64, 65). Nemažai genetinių sutrikimų siejama su nenusileidusiomis sėklidėmis. Kriptorchizmas diagnozuojamas ligoniams, turintiems tokius sindromus: Klinefelter (27–37 %) (66, 67), Kallmann (38–69,6 %) (68, 69), Prader-Willi (92,7 %) (70), Noonan (77 %) (71), esant lytinio vystymosi sutrikimams (6, 7). Tačiau dažniausiai laikoma, kad nenusileidusios sėklidės – tai atskiras,

nepriklausomas sutrikimas, vadinamasis izoliuotas kriptorchizmas (7, 72). Taip pat yra nustatyta keletas genų, svarbių sėklidžių nusileidimui. Kriptorchizmo atveju buvo nustatytos *INSL3* bei *RXFP2* mutacijos (73), sumažėjusi *FGFR1*, *RAFI* ir *SOS1* raiška (30), *AXINI* vieno nukleotido polimorfizmai (74). Kriptorchizmo rizikos veiksniams priskiriama: mažas gimimo svoris, motinos rūkymas ir gestacinis diabetas, nutukimas iki pastojimo (1, 8–10). Nepaisant aktyviai vykdomų tyrimų, iki šiol daugelio nenusileidusių sėklidžių atvejų etiologija yra nežinoma. Pastaruoju metu literatūroje hipogonadotropinis hipogonadizmas nurodomas kaip viena iš pagrindinių kriptorchizmo priežasčių. Yra nustatyta, kad sergant kriptorchizmu yra sumažėjusi gonadotropinų koncentracija (11–13). Taip pat 70 % atvejų nenusileidusiose sėklidėse aptinkama germinacinių ląstelių stoka, įvairaus laipsnio gonocitų į Ad spermatogonijas virsmo sutrikimai, Leydig ląstelių atrofija (11, 14). Išvardyti hormonų ir ląstelių pakitimai yra hipogonadotropinio hipogonadizmo požymiai. Endokrininės sistemos pažeidimai siejami su sumažėjusiu vyrų vaisingumo potencialu. Juos lemia genų, valdančių HPG ašį, bei genų, dalyvaujančių lytinių ląstelių vystymesi, raiškos sumažėjimas ar išnykimas (28–36). Pavyzdžiui, nustatyta, kad berniukams su nenusileidusiomis sėklidėmis yra sumažėjusi *PROK2*, *CHD7*, *FGFR1* ir *SPRY4* genų raiška, todėl vyksta nepakankama LH sekrecija ir sutrinka mažasis lytinis brendimas, dėl ko išsivysto nevaisingumas (34).

1.2. Mažasis lytinis brendimas

Pirmą kartą mažąjį lytinį brendimą 1973 m. aprašė Forest ir kt. (39). Tai yra laikotarpis, kai 30–90 dienų po gimimo yra aktyvuojama HPG ašis ir trumpam kraujyje padidėja gonadotropinų (LH, FSH) bei testosterono kiekiai (37, 38). Šiuo laikotarpiu iš gonocitų formuojasi kamieninės spermatogenezės ląstelės – Ad spermatogonijos, kurios išlieka iki gyvenimo pabaigos (75). Ši transformacija tiesiogiai priklauso nuo testosterono koncentracijos (40). Berniukams su kriptorchizmu testosterono koncentracijos padidėjimas mažojo lytinio brendimo metu yra sumažėjęs, palyginti su berniukais, kurių sėklidės yra nusileidusios (13, 41–43). Todėl jų atveju yra stebimas sutrikęs gonocitų virsmas į Ad spermatogonijas, kuris lemia nevaisingumą (40, 44). Atliktas ilgalaikis perspektyvinis tyrimas parodė, kad 84 % atvejų yra nustatomas normalus spermatozoidų skaičius, jeigu nuleidžiant sėklides abiejose yra randama Ad spermatogonijų (11). Priešingai nei vienam tiriamajam, kurio abi sėklidės stokojo Ad spermatogonijų, lytiškai subrendus nebuvo nustatytas normalus spermatozoidų skaičius ($p < 0,001$) (11). Tačiau ligoniai su abipusiu kriptorchizmu, kuriems Ad spermatogonijos buvo rastos

vienoje ar abiejose sėklidėse, lytiškai subrendę 55 % atvejų turėjo normalų spermatozoidų skaičių (11). Atliktas tyrimas parodė, kad sėkminga sėklidžių nuleidimo operacija nėra vyrų neobstrukcinio nevaisingumo išgydymo garantas. Vaisingumo potencialo atkūrimas priklauso nuo normalaus mažojo lytinio brendimo ir Ad spermatogonijų buvimo.

1.3. Sėklidžių biopsija

1.3.1. Nenusileidusių sėklidžių histologija

Normali žmogaus sėklidė yra sudaryta iš įvairių vystymosi stadijų germinacinių ląstelių, sėkliniuose kanalėliuose esančių Sertoli ląstelių ir peritubuliniame jungiamajame audinyje esančių Leydig ląstelių. Kalbant apie kriptorchizmo nulemtą vyrų nevaisingumą, ypatingas dėmesys skiriamas Ad spermatogonijoms – spermatogenezės kamieninėms ląstelėms. Pirmą kartą šių germinacinių ląstelių skiriamuosius bruožus 1974 m. aprašė Seguchi ir Hadziselimovič (75). Ad spermatogonijos yra plokščios ląstelės su pailgu, ovaliu branduoliu. Jų skiriamasis bruožas – branduolyje randamas prašviesėjimas, vadinamoji praretėjimo zona. Taip pat, palyginus su Ap spermatogonijomis ar embrioninėmis kamieninėmis ląstelėmis, Ad spermatogonijų citoplazma yra tamsesnė (75).

Nenusileidusiose sėklidėse aptinkamas sumažėjęs Ad spermatogonijų skaičius ar visiškai jų nebuvimas, kuris nulemia sumažėjusį vyrų vaisingumo potencialą arba nevaisingumą (11, 25, 40, 45–48, 76). Be to, sergant kriptorchizmu, yra nustatytas germinacinių ląstelių vystymosi sulėtėjimas, kuris gali nulemti navikų vystymąsi (45, 76). Tiriant nenusileidusias sėklides nustatyta, kad jose yra sumažėjęs Leydig ir Sertoli ląstelių skaičius. Nustatyti ir sėklinių kanalėlių pakitimai: jų tūris, diametras ir bendras ilgis, palyginti su sveikomis sėklidėmis, irgi yra sumažėjęs (77, 78). Sergant kriptorchizmu, be sėklidėse nustatomo pakitusio ląstelių skaičiaus, gali būti pažeista ir jų funkcija. Zivkovic ir kt. nustatė, kad dalis ligonių su nenusileidusiomis sėklidėmis turi sumažėjusią Leydig ląstelių ekskrecinę galią. Tokios Leydig ląstelės turi blogesnę atsaką į hormoninę stimuliaciją ir išskiria nepakankamai testosterono. Dėl to sėklidėse susiformuoja mažiau Ad spermatogonijų (44).

1.3.2. Preparatų paruošimo metodo reikšmė tiriant sėklidžių biopsijas

Histologijoje auksiniu standartu, tiriant įvairius audinius ir navikinius pakitimus, laikomi 5- μ m storio, hematoksilinu ir eozinu dažyti preparatai,

pagaminti iš biopsinės medžiagos, kuri fiksuota 10 % formaline bei impregnuota parafinu (79). Tačiau tiriant sėklidžių biopsijas, šis metodas turi trūkumų. Mėginiams fiksuoti naudojamas formalinas sukelia sėklidės audinio susitraukimą, todėl, preparatus tiriant mikroskopu, stebimi artefaktai ir kyla sunkumų nustatyti įvairių rūšių germinacines ląsteles bei germinacinių ląstelių neoplaziją in situ (angl. *germ cell neoplasia in situ, GCNIS*) (80). Todėl, tiriant sėklidžių biopsinę medžiagą, mėginiams fiksuoti rekomenduojama naudoti Bouin arba gliutaraldehido tirpalą ir impregnuoti juos Epon derva (80). Impregnavimas Epon derva leidžia pagaminti pusiau-plonus preparatus. Tokie preparatai yra žymiai geresnės raiškos ir leidžia nagrinėti ląstelių detales šviesiniu mikroskopu (81). 1974 m. Seguchi ir Hadziselimovič aprašė kriterijus, kurie leidžia geriau nustatyti Ad spermatogonijas bei GCNIS, kai biopsinė medžiaga yra fiksuota 3 % gliutaraldehido tirpale, vėliau impregnuota Epon derva ir iš jos pagaminti 1- μ m storio (pusiau-ploni) preparatai, dažyti toluidino mėliu (75). Deja, šis biopsinės medžiagos paruošimo metodas ne itin tinka atlikti imunohistochemiją (80).

1.4. Genetiniai kriptorchizmo ir nevaisingumo tyrimai

Pasaulyje atlikti tyrimai parodė, kad, taikant vien operacinį nenusileidusių sėklidžių gydymą, vyrai nėra išgydomi nuo kriptorchizmo sukeliama neobstrukcinio nevaisingumo (17, 18, 25–27). Todėl siekiant išsiaiškinti molekulinės kriptorchizmo sukeliama vyrų nevaisingumo priežastis bei gydymo galimybes, pradėta vykdyti genetinius tyrimus.

1.4.1. Platūs genetiniai tyrimai

2012 m. Chalmel ir kt. atliko sėklidžių genų analizę iš 47 biopsijų, paimtų iš berniukų su nenusileidusiomis sėklidėmis, nevaisingų suaugusių vyrų ir sveikų, vaisingų kontrolių (56). Tyrėjai siekė klasifikuoti nustatytus transkriptus, remdamiesi didžiausia jų koncentracija somatinėse ir germinacinėse sėklidžių ląstelėse prieš ir po lytinio brendimo, kad galėtų ląstelių lygyje sukurti kuo platesnį žmogaus sėklidžių baltymus koduojantį transkriptomą. Siekdami nustatyti transkriptus, kurių raiška vyksta spermatogonijų ląstelių populiacijoje prepubertatinėse sėklidėse, tyrėjai (Chalmel ir kt.) papildomai įtraukė ligonių, kurių nenusileidusiose sėklidėse nebuvo Ad spermatogonijų, mėginius (52). Tokiu būdu mokslininkams pavyko identifikuoti transkriptus, kurių raiška vyksta sėklidėse su Ad spermatogonijomis ir kurie nėra ekspresuojami sėklidėse be Ad spermatogonijų. Nustatytos raiškos modelis taip pat buvo palygintas su

suaugusiųjų germinacinių ląstelių genų raiška. Vienas iš nustatytų genų, turintis aukščiau aprašyto pobūdžio ekspresiją, yra *UTF1* (angl. *undifferentiated embryonic cell transcription factor 1*). *UTF1* raiška nustatyta tik mėginiuose su Ad spermatogonijomis. Geno koduojamas baltymas buvo aptiktas spermatogonijų kamieninėse ląstelėse ir iškelta prielaida, kad jis yra svarbus šių ląstelių atsinaujinimui (82). Chalmel ir kt. gauti rezultatai aprašė žmogaus sėklidžių transkriptomą ląstelių lygyje. Mokslininkų sukaupta ir aprašyta informacija sudarė galimybių toliau ieškoti genetinių vyrų nevaisingumo priežasčių ir identifikuoti naujus vėžio / sėklidžių genus, kuriuos būtų galima panaudoti kaip taikinius navikų imunoterapijoje (56).

Jan ir kt. 2017 m. atliko platus genetinį tyrimą, nagrinėjančią žmogaus spermatogenezės transkriptomo dinamiką (57). Pagrindinis tyrėjų iškeltas tikslas – sukurti visokeriopą ir kuo išsamesnį transkriptomo duomenų rinkinį iš gerai apibrėžtų ir skirtingų germinacinių ląstelių potipių, randamų žmogaus sėklidėse. Medžiagai rinkti buvo panaudota atskirų ląstelių išskyrimo lazerinė mikrodisekcija (angl. *individual-cell laser capture microdissection, LCM*). Dėl LCM tyrėjams pavyko išskirti šešis specifinius germinacinių ląstelių potipius, tarp jų ir Ad spermatogonijas. Atliekant tyrimą, Ad ir Ap spermatogonijos buvo pasirinktos kaip premejotinės fazės atstovai, trys spermatocitų potipiai (leptotena / zigotena, ankstyva pachitena ir vėlyva pachitena) – mejozės, apvalios spermatidės – postmejotinės fazės. Nustatyti 2 544 genai, kurių raiška skirtinga tarp premejotinės ir mejozės fazių, bei 4 607 – tarp mejozės ir postmejotinės fazių. Taip pat buvo atlikta germinacinių ląstelių potipių analizė, palyginus besikeičiančius transkriptomo profilius tarp paėiliui besivystančių germinacinių ląstelių potipių kiekvienos dalijimosi fazės metu ir tarp kiekvienos spermatogenezės fazės. Nustatyta, kad vykstant spermatogenezei, aptinkamų transkriptų skaičius mažėja. Atskiri transkriptų klasteriai buvo identifikuoti Ad ir Ap spermatogonijoms, leptotena / zigotena spermatocitams, ankstyvos ir vėlyvos pachitena spermatocitams ir apvaliosiomis spermatidėms. Tyrėjai nenustatė statistiškai reikšmingų genų raiškos pokyčių tarp Ad ir Ap spermatogonijų. Tai reiškia, kad, viena vertus, Ad spermatogonijos, esančios ramybės būsenoje, transkriptomo lygyje yra identiškose Ap spermatogonijoms ir gali greitai pereiti į aktyvią būseną, tuo pat metu palaikant tapačią genų raiškos paletę. Kita vertus, Ad ir Ap spermatogonijų populiacijose stebėta genų raiškos variacija buvo didesnė nei kitose germinacinių ląstelių potipiuose. Remdamiesi šiuo radiniu, tyrėjai galėjo paaiškinti, kodėl nebuvo aptikta genų raiškos skirtumų tarp Ad ir Ap spermatogonijų, ir iškelti prielaidą, kad nediferencijuotos ląstelės biologiškai yra labiau skirtingos nei jų diferencijuoti atitikmenys. Taip pat tyrimo metu buvo aptikti nauji RNR prijungiančių

baltymų genai. Nustatytos 137 inkRNR, kurių raiška spermatogenezės metu skiriasi. Vykdamas tyrimą, buvo palyginti žmogaus ir pelės sėklidžių transkriptomai. Jan ir kt. gautas duomenų rinkinys yra laisvai prieinamas mokslo bendruomenei. Jis sudaro pagrindą vykdyti tolimesnius tyrimus ir bioinformatikos analizes, nagrinėjant spermatogeninio nepakankamumo etiologijos, vyrų kontraceptikų kūrimo, žmogaus spermatogenezės pagrindų klausimus (57).

1.4.2. Genų raiška nenusileidusiose sėklidėse

Genų raišką nenusileidusiose sėklidėse aktyviai tyrinėja prof. F. Hadziselimovič su Kriptorchizmo tyrimo instituto mokslininkų komanda. Jis nustatė, kad genų raiška, palyginus berniukų, sergančių kriptorchizmu, skirtingas nevaisingumo rizikos grupes, skiriasi ir dažniausiai HIR grupėje yra sumažėjusi arba išnykusi (29, 31, 34). Tirti genai dalyvauja valdant HPG ašį ir vystantis germinacinėms ląstelėms (34).

EGR4 (angl. *early growth response 4*) yra atsakingas už LH sekrecijos reguliaciją. Nustatyta, kad berniukų su HIR sėklidėse *EGR4* neekspresuojamas, o LIR ir sveikų kontrolių sėklidėse šio geno raiška nesiskiria (29). Tai leido iškelti prielaidą, kad *EGR4* – pagrindinis reguliacinis genas, dalyvaujantis vystantis vaisingumui (29). Taip pat tiriamųjų HIR grupėje nustatyta sumažėjusi *PROK2*, *CHD7*, *FGFR1* ir *SPRY4* genų raiška (34). Ji sukelia nepakankamą LH sekreciją, dėl ko sutrinka mažasis lytinis brendimas ir išsivysto nevaisingumas (34). Be to, HIR grupėje nustatytas pagrindinių spermatogenezės reguliatorių – *CREM*, *DAZL*, *PIWIL2*, *RHOXF1*, *RNF17*, *TAF7L*, *TEX14* – raiškos sumažėjimas (29). Toliau tęsdami pradėtus genetinius tyrimus, Hadziselimovič ir kt. nustatė, kad dėl kriptorchizmo išsivystę azospermija ir nevaisingumas priklauso nuo sutrikusio mažojo lytinio brendimo, kurio reguliavime dalyvauja *CDC20*, *DAZ*, *DAZL*, *SYCP3*, *RBMY* ir *RBMY1A1* (31). Taip pat buvo nustatyta, kad prepubertatinėse sėklidėse, kuriose aptinkamos Ad spermatogonijos, vyksta šešių genų raiška: *FGFR3*, *DSG2*, E3 ubikvitino ligazės c-CBL genas, *CTAG1A/B*, *UTF1* ir *SNAP91* (31). Minėti genai yra siūloni kaip specifiniai suaugusiųjų spermatogonijų biomarkeriai (83). Sėklidėse be Ad spermatogonijų keturių iš jų raiška yra sumažėjusi (*CBL*, *SNAP91*) arba neaptinkama (*FGFR3*, *UTF1*) (31). Šis radinys parodo, kad kai kurie molekuliniai procesai, inicijuojantys sėklidžių genų raiškos programą lytinio brendimo pradžioje, iš tikrųjų prasideda anksti, dar kūdikių sėklidėse, ir ši programa berniukų su HIR yra pažeista. Azospermijos išsivystymui reikšmės turi sutrikusi genų *DDX4*, *MAEL*, *MOV10L1*, *PIWIL2*, *PIWIL4*, *TDRD9* ir

GTSF1, dalyvaujančių piRNR-Piwi kelyje, raiška, kuri parodo genomo nestabilumą, sukeltą sutrikusio transpozonų nutildymo (33, 60). Yra nustatyta, kad kriptorchizmu sergančių berniukų su HIR, kurių HPG ašis yra pažeista, séklidėse *PIWIL4* bei dvylikos *TDRD* šeimos genų, svarbių spermatogenezei, raiška yra sumažėjusi (31, 33). Kartu stebimas ir genų *DDX4* bei *DDX25*, priklausančių nuo gonadotropinų ir testosterono stimuliacijos, raiškos sumažėjimas (31). Sutrikusi šių genų raiška kartu su L1 retrotranspozonų slopinimu ir sumažėjusia *PIWIL4* baltymo sinteze dalyvauja vystantis nevaisingumui, nulemtam kriptorchizmo (33). Taip pat nevaisingumas gali būti siejamas su nepakankama *GTSF1* raiška HIR séklidėse, kuri sukelia padidėjusią L1 ekspresiją (33).

Atlikti genetiniai tyrimai patvirtina teoriją, kad, sergant kriptorchizmu, sutrikęs mažasis lytinis brendimas sukelia azoospermiją ir nevaisingumą. Genų raiškos skirtumai, palyginus HIR ir LIR grupes, pabrėžia nepažeistos HPG ašies svarbą vystantis vaisingumui ir vykstant spermatogenezei. Procesai, lemiantys sklandžią vaisingumo raidą, prasideda žymiai anksčiau negu lytinis brendimas. Taip pat vaisingumui yra svarbus genomo stabilumas.

1.4.3. Hormonų poveikis genų raiškai

Yra nustatyta, kad adjuvantinis hormoninis gydymas padeda atstatyti vaisingumo potencialą atkuriant normalųjį mažąjį lytinį brendimą ir gonocitų virsmą į Ad spermatogonijas (44, 49–55). Palyginus kriptorchizmo HIR ir LIR grupes, nustatyta, kad tarp jų yra nemažai genų raiškos skirtumų. Todėl pradėti tyrimai, nagrinėjantys adjuvantinio hormoninio gydymo poveikį genų raiškai, siekiant išgelbėti vyrų, sergančių kriptorchizmu, vaisingumą.

Tęsdami savo genetinius tyrimus, Hadziselimovič ir kt. išnagrino atrinktus gonocitų ir Ad spermatogonijų genus-žymenis, siekdami išsiaiškinti molekulinis procesus, grindžiančius vyrų germinacinių ląstelių vystymąsi ir susitelkdami į nuo testosterono priklausomą gonocitų virsmą į Ad spermatogonijas bei hormoninio gydymo poveikį. Palyginus HIR ir LIR tiriamųjų grupes, buvo nustatyta sumažėjusi *DMRTC2*, *PAX7*, *BRACHYURY/T* ir *TERT* raiška (35). GnRHa teigiamai paveikė šių genų raišką. Taip pat hormoninis gydymas iš visų tiriamų genų stipriausiai paveikė minėtus genus. Atliktas tyrimas išryškino *DMRTC2*, *PAX7*, *BRACHYURY/T* ir *TERT* svarbą Ad spermatogonijų vystymesi bei GnRHa gydomąjį poveikį (35).

PRDM šeimos nariai valdo genų raišką, modifikuodami chromatiną genų-taikinių promoterių vietoje. PRDM faktoriai veikia kaip tiesioginės histonų metiltransferazės arba pritraukia papildomus histonus modifikuojančius

fermentus prie specifinių promoterių-taikinių. Jie vienu metu veikia daugelyje geno vietų ir jų aktyvumas priklauso nuo aplinkybių konkrečiu laiku. *PRDM* genai yra svarbūs formuojantis ligoms ir įvairiems vystymosi procesams (84, 85). HIR grupėje, palyginti su LIR, nustatyta reikšmingai sumažėjusi penkių *PRDM* genų raiška: *PRDM1*, *PRDM6*, *PRDM9*, *PRDM13* ir *PRDM14*. Po gydymo GnRHa keturių *PRDM* genų raiška reikšmingai padidėjo: *PRDM7*, *PRDM9*, *PRDM12* ir *PRDM16* (36). Tarp jų išskiriamas *PRDM9*, kuris yra esminis germinacinių ląstelių vystymuisi ir vaisingumui. Rezultatas parodė, kad chromatiną modifikuojantys fermentai dalyvauja sėklidžių leidimosi reguliavime ir yra susiję su gydomuoju hormonų poveikiu (36).

Savo naujausiame darbe prof. F. Hadziselimovič su komanda išnagrinėjo genų, svarbių vystantis idiopatiniam hipogonadotropiniam hipogonadizmui ir kriptorchizmui, raišką HIR ir LIR grupėse bei jų atsaką į gydymą GnRHa. Tarp 31 atrinktų genų buvo nustatyta sumažėjusi *NHLH2* ekspresija HIR grupėje, palyginti su LIR, kuri padidėjo po hormoninio gydymo (86). Tai leido iškelti prielaidą, kad šis genas kartu su kitais idiopatinio hipogonadotropinio hipogonadizmo genais galimai atlieka naujus vaidmenis lytinėse, Leydig ir Sertoli ląstelėse. GnRHa taip pat gali paveikti *NHLH2* raišką ne tik sėklidėse, bet ir neuronuose, veikdamas per transkripcijos faktorius, kurie randami vyriškose lytinėse liaukose ir smegenyse. Tai galėtų paaiškinti, kodėl po hormoninio gydymo yra atkurama HPG ašis (86).

1.5. Ilgos nekoduojančios RNR

Ilgos nekoduojančios RNR – tai nekoduojančių baltymų RNR molekulių klasė, kurių transkriptai yra ilgesni nei 200 nukleotidų. InkRNR sudaro ženklią žmogaus transkriptomo dalį (87). Branduolyje esančios inkRNR reguliuoja genų raišką bei geno stabilumą (88). Taip pat jos atlieka pagrindinių reguliatorių vaidmenį embriono vystymosi (89), DNR pažeidimų atsako (90), paveldimų ligų (pvz., Prader-Willi sindromas) (91), navikiniuose (92, 93) procesuose. Embrioninėse kamieninėse ląstelėse šių RNR valdymas genetiniame lygyje vyksta per transkripcijos faktorius, kurie prisijungia prie inkRNR promoterių. Pagrindinė inkRNR funkcija – specifinės genų raiškos reguliavimas, kuris vyksta keliais etapais, įskaitant pamatinio transkripcijos aparato sutelkimą ir ekspresiją, potranskripcinę modifikaciją ir epigenetiką (94). Taip pat buvo pasiūlyta, kad inkRNR, prisijungdamos prie tam tikrų metiltransferazių ir demetilazių, nukreipia jas į specifines geno vietas, t. y. nurodo taikinius. Priklausomai nuo biologinio konteksto, kai kurie metilinimo procesai yra stabiliai palaikomi (pvz., metilinimas, dalyvaujantis

paveldimume, vykstant nutildytos būsenos chromatino mitozei). O kiti turi prisitaikyti prie vykstančių pokyčių (pvz., kai ląstelės dalijasi ar atsako į aplinkos pokyčius) (95–98). Natūralūs antiprasminiai transkriptai (angl. *natural antisense transcripts, NATs*) reguluoja genų raišką, veikdami transkripciją ir mRNR stabilumą (95–98). Beveik 80 % žinduolių genomo yra nurašoma ir daug genomo lokusų gamina RNR iš abiejų DNR grandinių (87, 99), tačiau daugumos šių nuorašų funkcinė svarba yra menkai apibūdinta.

XIST ir *TSIX* – tai du su X chromosoma susieti (angl. *X-linked*) ilgi nekoduojantys genai, dalyvaujantys X chromosomos inaktyvacijos procese (angl. *X chromosome inactivation, XCI*) žinduolių moteriškos lyties individų ląstelėse. Taip yra sukuriamas genų ekvivalentas tarp moteriškos ir vyriškos lyties organizmų (100). Šį procesą reguliuoja keli faktoriai, taip pat regionas ant X chromosomos – vadinamasis X chromosomos inaktyvacijos centras (angl. *X chromosome inactivation center, XIC*) (101). *XIST* dalyvauja nutildant vieną iš X chromosomų ir yra ekspresuojama tik neaktyvioje X chromosomoje (102, 103). *TSIX* yra atvirkštinė *XIST* RNR. Ji yra ekspresuojama abiejose X chromosomose iki vienos iš X chromosomų inaktyvacijos pradžios, o vėliau – tik aktyvioje X chromosomoje, apsaugodama ją nuo ektočinio nutildymo (104, 105). Savo tyrime Loos ir kt. sukūrė *Xist* ir *Tsix* pelių reporterių (angl. *reporter mouse*) embrioninių kamieninių ląstelių linijas, kad ištirtų genetinį ir dinaminį *Xist* ir *Tsix* reguliavimą diferenciacijos metu. Tyrimo rezultatai parodė, kad *Xist* ir *Tsix* yra antagonistai vienas kitam, o *Xic* lokusas turi pusiau stabilias transkripcijos būsenas, kurios numato XCI išeitį (106). Dėl šio proceso žinduolių moteriškos ir vyriškos lyties individų ląstelėse yra vienodas aktyvių genų skaičius.

Pastaruoju metu mokslinėje literatūroje kalbama apie inkRNR vaidmenis vėžio patologijoje ir vystantis paveldimoms ligoms (91, 93, 107, 108). Tai parodo, kad inkRNR valdo ne tik genų reguliavimo kelius normaliose ląstelėse bei audiniuose, bet ir navikų vystymosi metu. Vėžio atsiradimas ir progresavimas yra daugelio faktorių sąveikos rezultatas. Palyginus su baltymus koduojančiais genais, vėžiui specifinių inkRNR raiškos pobūdis yra labiau specifiškas audiniams ir vėžio stadijai. Ši inkRNR savybė leidžia vystyti inkRNR kaip potencialius veiksmingus biomarkerius ir terapinius taikinius (93, 108).

TINCR (angl. *Terminal differentiation-induced non-coding RNA*) – tai inkRNR, reikalinga esminių diferenciacijos genų indukcijai (109). Ji dalyvauja tokiuose ląstelinuose procesuose kaip proliferacija, apoptozė, autofagija, migracija, invazija ir metastazavimas (110–114). Neseniai atlikta mokslinės literatūros apžvalga atskleidė, kad *TINCR* vaidmuo kancerogenezeje yra labai svarbus, atkreipiant dėmesį į tai, kad ši inkRNR

atlieka skirtingas funkcijas navikų patogenezėje (slopinimas arba aktyvinimas), priklausomai nuo jų rūšies (115).

2. DARBO METODOLOGIJA

Tyrimas atliktas 2016–2020 metais VUL SK Vaikų chirurgijos, ortopedijos ir traumatologijos centro Vaikų chirurgijos skyriuje. Buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas (Nr. 158200-16-883-390) ir papildymas (Nr. 158200-16-883-PP1-112) atlikti biomedicininį tyrimą (Priedai Nr. 1 ir Nr. 2). Visi molekuliniai tyrimai buvo atlikti Kriptorchizmo tyrimo institute (*Cryptorchidism Research Institute*, Listalis, Šveicarija), bendradarbiaujant su Bazelio universiteto Molekulinės gyvybės mokslo centru „Biozentrum“ (*Biozentrum, The Center for Molecular Life Sciences, University of Basel*, Bazelis, Šveicarija) ir Friedrich Miesner biomedicininų tyrimų institutu (*Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research*, Bazelis, Šveicarija). Tyrimui atlikti iš tiriamųjų tėvų arba globėjų buvo gautas sutikimas ir pasirašyta Informuoto asmens sutikimo forma. Tyrimą sudarė penki etapai.

Naudoti ir analizuoti ligonių su nenusileidusiomis sėklidėmis, kurie buvo gydyti VUL SK Vaikų chirurgijos skyriuje 2012–2016 metais ir dalyvavo randomizuotame prospektyviniame tyrime (Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas Nr. 158200-580-PPI-17), duomenys bei biopsinė medžiaga.

Histologiniai biopsinės medžiagos tyrimai atlikti Valstybiniame patologijos centre, VšĮ VUL SK filiale. Vaizdų analizę ir aprašymą atliko gydytojas patologas Darius Dasevičius (DD), bendradarbiaudamas su prof. Faruk Hadziselimovič (FH) (Listalis, Šveicarija).

Molekulinius tyrimus atliko Philippe Demougin iš Bazelio universiteto Molekulinės gyvybės mokslo centro „Biozentrum“ (Bazelis, Šveicarija). Bioinformatikos tyrimus ir molekulinų tyrimų statistinę analizę atliko Michael B. Stadler iš Friedrich Miesner biomedicininų tyrimų instituto (Bazelis, Šveicarija).

2.1. Tyrimo etapai

1. Tiriamųjų atranka ir duomenų rinkimas.
2. GnRHa poveikio Ad spermatogonijų atsiradimui nenusileidusiose sėklidėse nustatymas, vertinant sėklidžių biopsijas.
3. Genų, dalyvaujančių HPG ašies hormoniniame valdyme ir vaisingume, raiškos pokyčių nustatymas skirtingose kriptorchizmo nevaisingumo rizikos grupėse bei taikant skirtingas kriptorchizmo gydymo schemas (tik chirurginis gydymas, chirurginis gydymas su adjuvantiniu hormoniniu gydymu).

4. NkRNR raiškos ir jos pokyčių nustatymas nenusileidusiose sėklidėse, taikant skirtingas kriptorchizmo gydymo schemas (tik chirurginis gydymas, chirurginis gydymas su adjuvantiniu hormoniniu gydymu).
5. Duomenų analizė ir gautų rezultatų interpretavimas.

2.2. Tyrimo eiga

Tiriamųjų atranka: 2012–2016 metais dalyvauti tyrime buvo kviečiami ligoniai, atvykę į VUL SK Konsultacinę polikliniką vaikų chirurgo arba vaikų urologo konsultacijai, kuriems vizito metu buvo diagnozuotas vienpusis arba abipusis kriptorchizmas ir kurie atitiko įtraukimo kriterijus bei buvo nukreipti operaciniam gydymui į VUL SK Vaikų chirurgijos skyrių. Klinikinis ištyrimas vykdytas remiantis STROBE kriterijais (116).

2.2.1 Įtraukimo kriterijai

- Amžius: iki 6 metų imtinai;
- ūmios ir / ar lėtinės ligos simptomų nebuvimas;
- sindromų, susijusių anomalijų nebuvimas;
- nebuvo diagnozuotas hipogonadotropinis hipogonadizmas;
- sisteminių ligų nebuvimas (pvz., hemochromatozė, sarkoidozė, histiocitozė X);
- hipofizės pažeidimo nebuvimas (navikai, granulioza, pūlinys);
- iki tyrimo nebuvo taikytas hormoninis gydymas;
- nebuvo nustatytos mobilios sėklidės.

2.2.2 Neįtraukimo kriterijai

- Vyresni nei 6 metų;
- pasireiškę ūmios ir / ar lėtinės ligos simptomai;
- diagnozuoti sindromai, susijusios anomalijos, hipogonadotropinis hipogonadizmas;
- sirgimas sisteminėmis ligomis;
- hipofizės pažeidimas;
- iki tyrimo taikytas hormoninis gydymas;
- mobilios sėklidės.

Sutikimas dalyvauti tyrime: abu į tyrimą planuojamų įtraukti ligonių tėvai arba globėjai buvo supažindinami su tyrimu, gaunamas jų sutikimas bei pasirašoma Informuoto asmens sutikimo forma.

Ligonių ištyrimas operacijos dieną:

1. Surinkta ligos ir gyvenimo anamnezė:
 - kada buvo pastebėta, jog kapšelyje nėra sėklidės (-ių);
 - ar ligonis neserga endokrininėmis ligomis, neturi sindromų;
 - ar iki šiol nebuvo taikytas hormoninis gydymas.
2. Bendras klinikinis ištyrimas: išmatuotas ūgis, svoris, įvertinti išoriniai lytiniai organai – kapšelio ir varpos išvaizda / išsivystymas.
3. Specialusis klinikinis ištyrimas:
 - Ligonis tirtas aukštiekninkas, palpaujant šiltomis rankomis.
 - Sėklidžių padėties nustatymas: kapšelyje, ties išoriniu kirkšnies kanalo žiedu, kirkšnies kanale ar pilve (nečiuopiama (-os)).
 - Čiuopiamų sėklidžių diferenciacija su mobiliomis sėklidėmis. Mobilias sėklides galima nutempti iki kapšelio dugno ir ramybės būsenoje jos kuriam laikui jame lieka. Nenusileidusių sėklidžių nepavyksta nuvesti iki kapšelio dugno, o nuvedus iki kapšelio vidurio ir paleidus, jos iškart grįžta į kirkšnį.
 - Pakartotinas sėklidžių padėties vertinimas prieš pat operaciją, bendroje nejautroje (svarbu pasirenkant operacijos taktiką – atvira ar laparoskopinė operacija, kai nepavyksta užčiuopti sėklidės (-ių) bendro ištyrimo metu).

Tyrimo eiga

Tyrimė dalyvauti buvo pakviesti 47 ligoniai, jie išskirti į dvi tiriamųjų grupes (1 pav.).

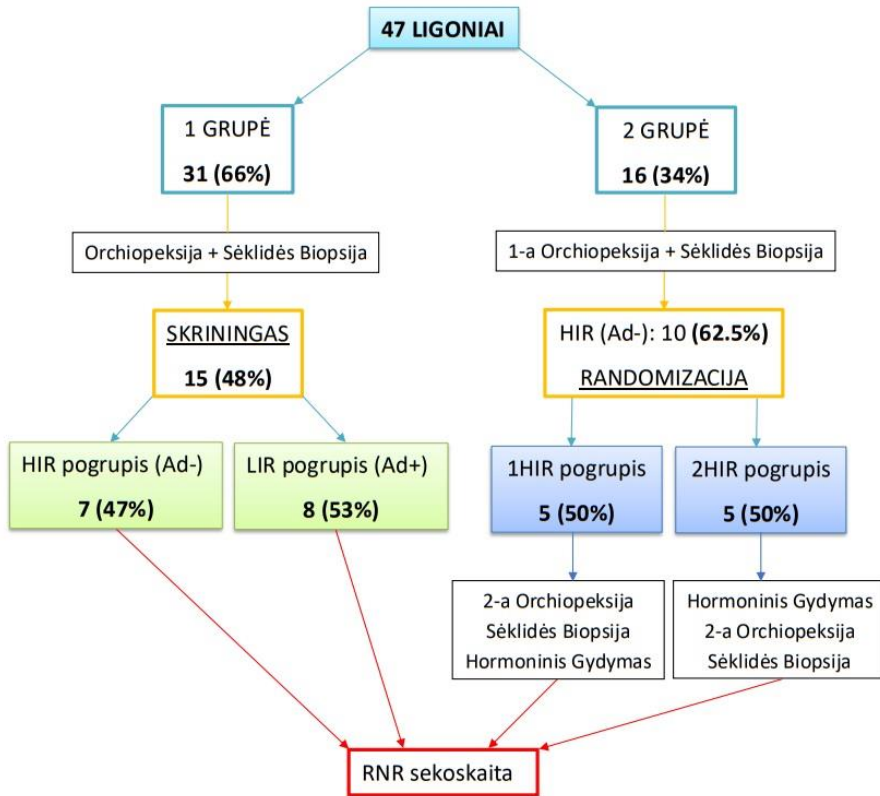
Pirmą grupę sudarė 31 (66 %) ligonis. Jie sirgo tiek vienu, tiek abipusiu kriptorchizmu. Po atrankos iš tyrimo pašalinus asmenis, kurie atsisakė toliau dalyvauti ir nesilaikė tyrimo protokolo, kurių atveju duomenų bazėje nebuvo visiškai užpildyti duomenys, tyrimas užbaigtas dalyvaujant 15 (48 %) ligonių. Orchiopeksijos metu buvo paimama sėklidės biopsija histologiniam ir molekuliniam ištyrimui. Iš kiekvieno tiriamojo buvo paimta tik po vieną sėklidės biopsiją. Histologinį ištyrimą ir aprašymą atliko du patologai (DD – pirminį vertinimą, FH – antrinį vertinimą ir tikrinimą). Remiantis sėklidžių biopsijų rezultatais (Ad spermatogonių buvimas / nebuvimas), tiriamieji buvo suskirstyti į du pogrupius: HIR

(7 (47 %)) – didelės nevaisingumo rizikos (be Ad spermatogonijų) ir LIR (8 (53 %)) – mažos nevaisingumo rizikos (su Ad spermatogonijomis).

Pirmos grupės tiriamųjų amžiaus mediana buvo 15 mėn. (7–55 mėn.). Šios grupės ligonių visos nenusileidusios sėklidės buvo čiupiamos kirkšnių srityse.

Antra tiriamųjų grupė buvo sudaryta iš 16 (34 %) ligonių, sergančių izoliuotu abipusiu kriptorchizmu. Pirmos orchiopeksijos metu buvo paimama sėklidės biopsija histologiniam ir molekuliniam ištyrimui. Biopsijos analizę ir aprašymą atliko du patologai: pirma vertino DD, po to tikrino FH. Remiantis histologiniais rezultatais, ligoniai buvo suskirstyti į du pogrupius: HIR (be Ad spermatogonijų) ir LIR (su Ad spermatogonijomis). Penki ligoniai, kurių sėklidžių biopsijoje aptiktos Ad spermatogonijos (LIR pogrupis), buvo pašalinti iš tolimesnio ištyrimo. Vieno berniuko, kuris priklausė HIR pogrupiui, tėvai dėl asmeninių priežasčių atsisakė toliau dalyvauti tyrime. Tyrimas sėkmingai pabaigtas dalyvaujant 10 (62,5 %) tiriamųjų. Atsižvelgus į adjuvantinio hormoninio gydymo skyrimo laiką, tiriamieji atsitiktinai buvo suskirstyti į du pogrupius, po penkis ligonius: 1HIR – antra orchiopeksija → hormoninis gydymas, 2HIR – hormoninis gydymas → antra orchiopeksija. Hormoniniam gydymui skirtas liuteinizuojančio hormono atpalaiduojančio hormono analogo (LHRHa) purškalas į nosį, kurį tiriamieji vartojo po 10 µg kas antrą dieną vakarais šešis mėnesius. Preparato dozė buvo parinkta remiantis farmakokinetikos tyrimo, atlikto Sandow ir kt., rezultatais (117). Kitos operacijos metu (antra orchiopeksija) buvo paimama antros sėklidės biopsija. Histologinių preparatų analizė ir aprašymo metodika buvo tokia pati, kaip ir pirmos biopsijos atveju. Tiriamieji iš 1HIR pogrupio, kuriems antroje biopsijoje neaptikta Ad spermatogonijų, gavo tokį patį adjuvantinį hormoninį gydymą, kaip ir tiriamieji iš 2HIR pogrupio prieš antrą operaciją. Pirmos operacijos metu randomizuotų ligonių amžius buvo 7–55 mėn., o antros operacijos metu – 10–62 mėn. Sėklidžių padėtyms pateiktos 1 lentelėje.

RNR sekoskaita atlikta iš mėginių, paimtų iš abiejų tiriamųjų grupių. Atlikta genų, dalyvaujančių HPG ašies hormoniniame valdyme ir vaisingume, nkRNR raiškos analizė.



1 pav. Tyrimo eiga ir tiriamųjų charakteristika.

1 lentelė. Antros tiriamųjų grupės sėklidžių padėtys operacijų metu.

SĖKLIDŽIŲ PADĖTIS	
Pirma operacija	Antra operacija
1HIR POGRUPIS	
Pilvo ertmė	Pilvo ertmė
Pilvo ertmė	Kirkšnies kanalas
Kirkšnies kanalas	Kirkšnies kanalas
Pilvo ertmė	Pilvo ertmė
Kirkšnies kanalas, viršutinis 1/3	Kirkšnies kanalas
2HIR POGRUPIS	
Kirkšnies kanalas, prie išorinio žiedo	Ektopinė padėtis: tarpvietė
Kirkšnies kanalas	Kirkšnies kanalas
Kirkšnies kanalas, viršutinis 1/3	Kirkšnies kanalas, viršutinis 1/3
Kirkšnies kanalas, viršutinis 1/3	Kirkšnies kanalas
Kirkšnies kanalas, prie išorinio žiedo	Kirkšnies kanalas

Tiriant GnRHa poveikį vyrų vaisingumo potencialo atkūrimui, buvo vertinti antros grupės randomizuotų tiriamųjų duomenys: lyginti 1HIR ir 2HIR pogrupiai. Abiejų operacijų metu 1HIR ir 2HIR pogrupiai buvo lygiaverčiai tiriamųjų amžiaus atžvilgiu ir statistiškai nesiskyrė (amžiaus medianos: pirmos operacijos: 20 ir 22 mėn., $p = 0,3173$; antros operacijos: 27 ir 30 mėn., $p = 0,1797$).

Siekiant nustatyti genų raišką nenusileidusiose sėklidėse, analizuoti pirmos tiriamųjų grupės sėklidžių mėginiai. Lyginti HIR ir LIR pogrupių mėginiai. Dispersinė analizė (ANOVA) taikyta siekiant įvertinti galimą lignonų amžiaus įtaką tiriamųjų pogrupiams (HIR, LIR) ir genų raiškos skirtumams. Nustatyta, kad amžius tarp tiriamųjų pogrupių reikšmingai nesiskyrė (vienfaktorė ANOVA, $p = 0,349$). Todėl amžius kaip veiksnys nebuvo įtrauktas į duomenų analizę (34).

Tiriant GnRHa poveikį genų raiškai, lyginti 29 mėginiai, surinkti iš 22 lignonų: 15 tiriamųjų priklausė pirmai grupei (15 mėginių), likę septyni – antrai grupei (14 mėginių) (1 pav.). Pradžioje iš pirmos tiriamųjų grupės mėginių buvo nustatyti genų raiškos skirtumai tarp HIR (7 mėginiai) ir LIR (8 mėginiai) pogrupių. Vėliau analizuotas adjuvantinio hormoninio gydymo poveikis nustatytų genų raiškai, palyginus 1HIR (3 tiriamieji, 6 mėginiai) ir 2HIR (4 tiriamieji, 8 mėginiai) pogrupius (61).

Tikslinė nkRNR raiškos analizė ir GnRHa poveikis raiškai vertinti antros tiriamųjų grupės sėklidžių mėginiuose (60).

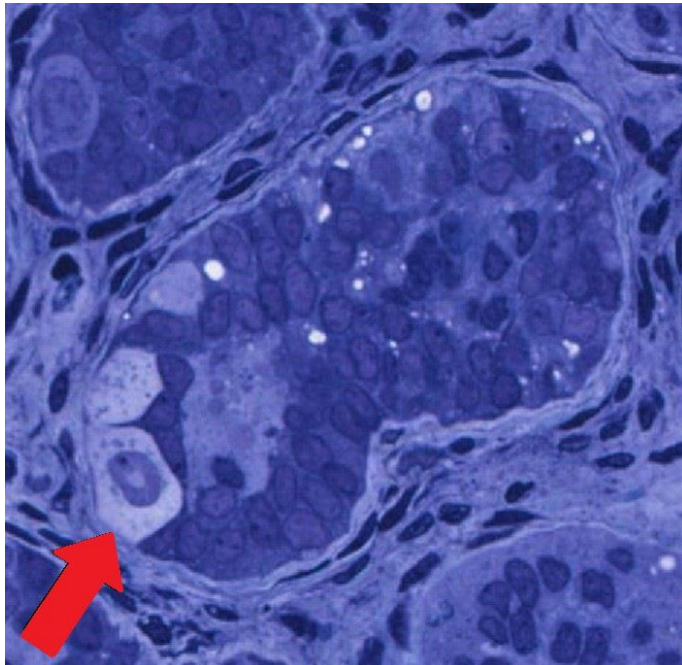
2.3. Tiriamoji medžiaga ir metodika

2.3.1 Sėklidės biopsija: atlikimas ir histologinis ištyrimas

Sėklidės biopsijos paėmimas ir histologinis ištyrimas buvo atliekamas pagal protokolą, įsisavintą ir pritaikytą gydytojo V. Biliaus doktorantūros metu (118).

Orchiopeksijos metu viršutiniame sėklidės poliuje padaromas iki 5 mm ilgio pjūvis ir paimamas apie ryžio grūdo dydžio sėklidės parenchimos fragmentas. Biopsinė medžiaga padalijama į dvi dalis: pusė fiksuojama 2 % gliutaraldehido tirpalu, kita iškart panardinama į stabilizavimo tirpalą *RNAlater*® (*ThermoFisher Scientific*, JAV) ir laikoma -25°C temperatūroje iki tolimesnio apdoravimo (RNR išskyrimo ir sekvenavimo). Mėginiai, fiksuoti gliutaraldehidu, buvo perduodami į Valstybinį patologijos centrą ištirti patologui. Sėklidės fragmentai, panardinti į *RNAlater*® tirpalą, buvo siunčiami į Kriptorchizmo tyrimo institutą (Listalis, Šveicarija) prof. F. Hadziselimovič.

Histologiniam ištyrimui paimti sėklidžių audinių fragmentai operacijos metu dedami į 2 % gliutaraldehido tirpalą ir fiksuojami ≥ 12 val. Fiksuoti mėginiai impregnuojami Epon derva. Vėliau iš jų atliekami pusiau ploni, 1 μm storio, pjūviai ultramikrotomu *Leica EM UC6* (*Leica microsystems*, Vokietija). Jie dedami ant standartinio objekcinio stiklelio ir dažomi 1 % toluidino mėliu. Gauti preparatai preliminariai tiriami (atliekamas pirminis įvertinimas) šviesiniu mikroskopu *Olympus BX40F4* (*Olympus Optical Co LTD*, Japonija) 400–600 kartų didinimu. Detali preparatų analizė atliekama vertinant skaitmeninius biopsijų vaizdus. Atliekant histologinį vertinimą, nagrinėta ne mažiau nei 50 tubulių skerspjūvių vienoje biopsijoje. Ypatingas dėmesys skirtas identifikuoti Ad spermatogonijas. Šių germinacinių ląstelių skiriamuosius bruožus pirmą kartą aprašė 1974 m. Seguchi ir Hadziselimovič (75). Ad spermatogonijų branduolyje randamas prašviesėjimas, vadinamoji praretėjimo zona (2 pav.). Palyginus su Ap spermatogonijomis ar embrioninėmis kamieninėmis ląstelėmis, Ad spermatogonijų citoplazma yra tamsesnė. Remiantis Ad spermatogonijų buvimu / nebuvimu histologiniuose sėklidžių preparatuose, buvo nustatoma tiriamųjų nevaisingumo rizikos grupė: LIR (Ad yra), HIR (Ad nėra).

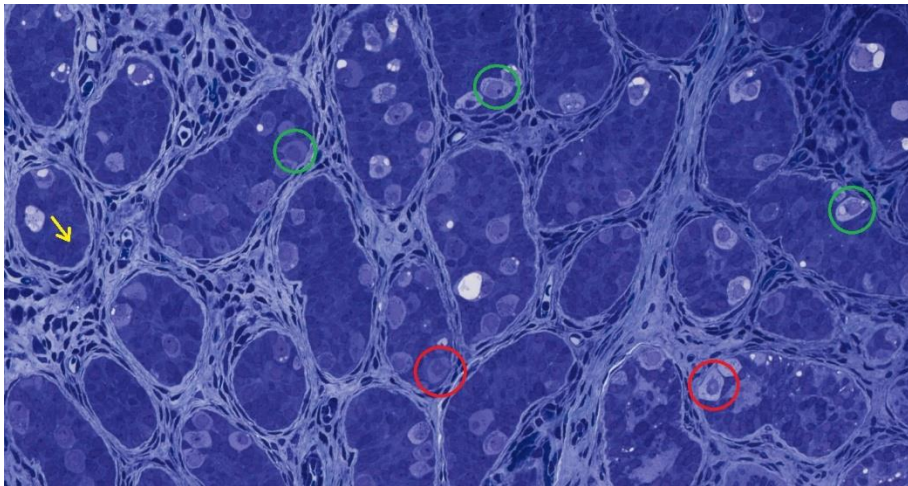


2 pav. Sėklidės biopsijos histologinis vaizdas. Tubulės skerspjūvis su Ad spermatogonija (raudona strėlė). Dažymas: toluidino mėliu, didinimas: 400x. Autorius patologas D. Dasevičius.

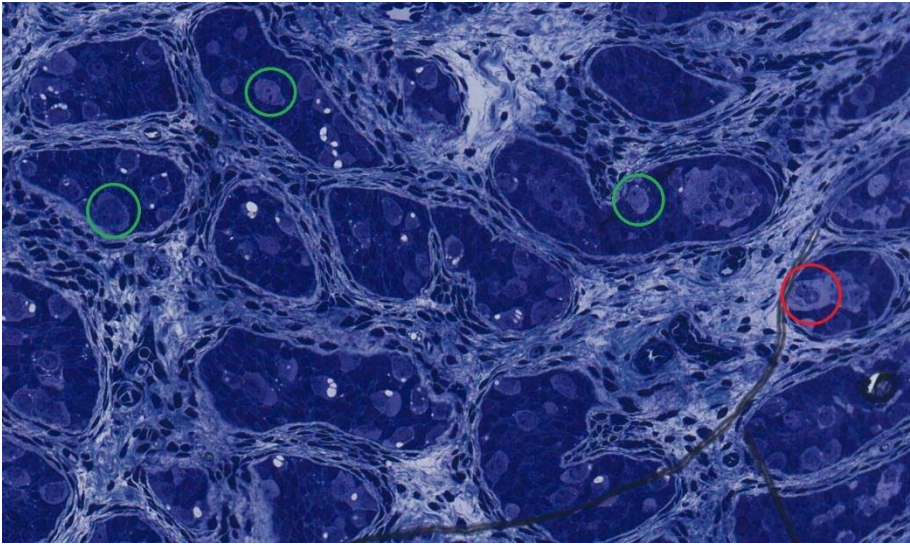
Histologiniuose sėklidžių preparatuose nagrinėti parametrai:

1. tubulių skerspjūvių kiekis histologiniame preparate;
2. tubulių su spermatogonijomis kiekis histologiniame preparate;
3. spermatogonijų kiekis histologiniame pjūvyje;
4. Ad spermatogonijų kiekis;
5. tubulių fertilumo indeksas (TFI) – tubulių su spermatogonijomis kiekio santykis su tubulių skerspjūvių kiekiu histologiniame preparate;
6. Ad spermatogonijų kiekis tubulėje (Ad/T) – Ad spermatogonijų kiekio santykis su tubulių skerspjūvių kiekiu histologiniame preparate;
7. spermatogonijų kiekis tubulėje (S/T) – spermatogonijų kiekio santykis su tubulių skerspjūvių kiekiu histologiniame preparate.

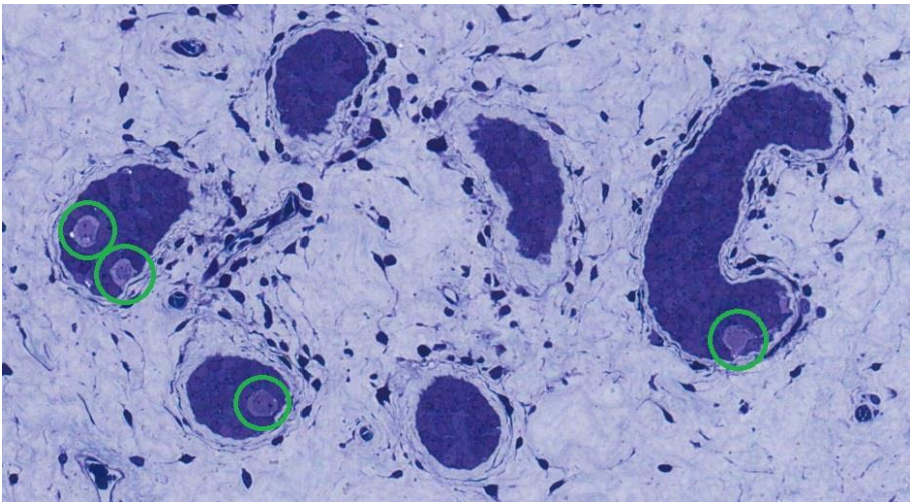
Taip pat vertinta tiriamųjų nenusileidusių sėklidžių architektūra: tubulių tankis sėklidės parenchimoje (normalus / sumažėjęs), tubulių išvaizda / forma (taisyklingos / netaisyklingos) ir spindžio buvimas / nebuvimas. Nenusileidusiose sėklidėse sėklinių kanalėlių tūris, diametras ir bendras ilgis, palyginti su sveikomis sėklidėmis, yra sumažėjęs (77, 78). Be to, pastebimi skirtumai palyginus LIR ir HIR vaizdus (3–5 pav.).



3 pav. Normalios sėklidės biopsijos histologinio vaizdo fragmentas. Normalus tubulių tankis, tubulės gan taisyklingos, be spindžių, su 8 Ad spermatogonijomis (raudonas apskritimas) visame preparate. Žalias apskritimas – spermatogonijos, geltona strėlė – Sertoli ląstelė. Dažymas: toluidino mėliu, didinimas: 250x. Autorius patologas D. Dasevičius.



4 pav. Mažos nevaisingumo rizikos (LIR) sėklidės biopsijos histologinio vaizdo fragmentas. Tubulių tankis difuziškai nežymiai sumažėjęs, tubulės gan taisyklingos, be spindžių su 2 Ad spermatogonijomis (raudonas apskritimas) visame preparate. Žalias apskritimas – spermatogonijos. Dažymas: toluidino mėliu, didinimas: 250x. Autorius patologas D. Dasevičius.



5 pav. Didelės nevaisingumo rizikos (HIR) sėklidės biopsijos histologinio vaizdo fragmentas. Tubulių tankis difuziškai ryškiai sumažėjęs, tubulės gan taisyklingos, be spindžių, be Ad spermatogonijų. Žalias apskritimas – spermatogonijos. Dažymas: toluidino mėliu, didinimas: 200x. Autorius patologas D. Dasevičius.

2.3.2 RNR gryninimas (34)

Visuminė RNR buvo išskirta iš į *RNAlater*© tirpalą panardintos sėklidžių biopsinės medžiagos. Biologinės medžiagos homogenizacija atlikta prietaisu *TissueLyser II* (*Qiagen*, Vokietija): ant mėginių pilama 500 µL tirpalo *TRI-Reagent* (*Ambion*, JAV) ir 2 min. veikiama 30 Hz dažniu. Vėliau į kiekvieną mėginį buvo įpilta 500 µL absoliutaus etanolio, išmaišyta ir gauti mišiniai perkelti į kolonėles *Zymo-Spin IIC* (*Zymo Research*, JAV). RNR išgryninimas tęstas naudojant rinkinį *Direct-Zol* (*Zymo Research*, JAV) su deoksiribonukleaze I, taip pašalinant galimą taršą genomine DNR. Išgrynintos RNR koncentracija nustatyta spektrofometru *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*, JAV), kokybė patikrinta bioanalizatoriumi *2100 BioAnalyzer* (*Agilent*, JAV), naudojant lustus *RNA 6000 Pico* (*Agilent*, JAV).

2.3.3 RNR sekoskaitos bibliotekų ruošimas (34)

RNR sekoskaitos bibliotekos buvo ruošiamos iš 300 ng visuminės RNR, naudojant rinkinį *TruSeq Stranded Total RNA* su *Ribo-Zero Gold* (*Illumina*, JAV), taip pašalinant ribosominę RNR ir palengvinant koduojančios ir nekoduojančios RNR sekvenavimą bei specifinių adapterių priligavimą. Bibliotekų kokybė buvo patikrinta analizatoriumi *Fragment Analyzer*, naudojant rinkinį *Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis* (viskas iš *Advanced Analytical*, JAV). Gautos aukštos kokybės bibliotekos: nustatyta vidutinė koncentracija 128 nmol/L, o vidutinis fragmento ilgis – 367 bp. Paruoštos sekoskaitos bibliotekos buvo sujungtos į du mišinius, kuriuose mėginių skaičius ir galutinė mėginių koncentracija buvo vienoda. Gautų mišinių koncentracija ir kokybė buvo vertinama analizatoriumi *Fragment Analyzer*.

2.3.4 RNR sekoskaita (34)

Gauti RNR bibliotekų mišiniai, kurių koncentracija atitinkamai buvo 1,3 ir 1,4 pM, buvo panaudoti formuoti klasterius prietaisu *NextSeq 500* (*Illumina*, JAV). Siekiant padidinti fragmentų kopijų skaičių, kiekvienas iš dviejų mėginių mišinių sekvenuotas dviejuose lustuose (angl. *flow cell*). Taip yra padidinama geba aptikti žemos raiškos transkriptus ir nekoduojančias RNR. Mėginiai sekvenuoti kaip 81 bazės dydžio fragmentai (angl. *singlereads*), naudojant rinkinį *NextSeq 500/550 High Output Kit v2* (75-ų ciklą) (*Illumina*, JAV). Mėginių mišinių nuskaitymas buvo 91–95 %, tai atitinka *Illumina Q30*

kokybės įvertį. Pirminių duomenų analizė atlikta naudojant programinę įrangą *Illumina RTA (Real Time Analysis) v.2.4.6* ir *bcl2fastq v2.17.1.14*.

2.3.5 RNR sekoskaitos duomenų analizė (34)

Fragmentų prilygiavimas atliktas genomo surinkimo platformoje *UCSC human genome browser hg19 assembly (GRCh37)*, naudojant prilygiavimo įrankį *STAR v.2.5.0a*. Iš vieno mėginio vidutiniškai kartografuota apie 60 milijonų fragmentų. Vidutiniškai 96 % fragmentų kartografuota su mažiau nei 10 % daugialypių fragmentų (angl. *multimappers*). Siekiant nustatyti potencialiai teršiančią ribosominę RNR ar kitų rūšių nukleino rūgštis, atsitiktinis kiekvieno mėginio fragmentų pogrupis buvo prilygiuotas prie alternatyvių referentinių sekų. Visuose mėginiuose aptiktos tik neribosominės žmogaus sekos ir tik keli bakterinės kilmės fragmentai (paprastai *E. coli*, ~1 %). Neapdoroti duomenys įkelti į duomenų bazę *Database of Genotypes and Phenotypes (dbGap)* (phs001275.v1.p1).

2.3.6 RNR raiškos lygio kiekybinis įvertinimas (34)

Siekiant įvertinti kiekybinę genų raišką, nuskaitymai skaičiuoti atskirai genui ir mėginiui, naudojant paketą *QuasR Bioconductor* (119) su žinomais genais iš lentelės *UCSC knownGene (TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene Bioconductor package)* ir su nekoduojančiomis RNR iš lentelės *UCSC lincRNAsTranscripts (TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.lincRNAsTranscripts Bioconductor package, v.3.2.2)*. Siekiant pašalinti sisteminę klaidą ir palyginti transkriptų raišką tarpusavyje, neapdoroti duomenys (kartografuotų fragmentų skaičius gene) buvo normalizuoti pagal RNR ilgį bei visą nuskaitytų fragmentų skaičių ir konvertuoti į RPKM dydį – fragmentų skaičių kilobazėje iš milijono kartografuotų fragmentų (angl. *reads per kilo base per million mapped reads, RPKM*):

$$\text{RPKM} = \text{numReads} / (\text{geneLength}/1000 * \text{totalNumReads}/1,000,000)$$

numReads – geno sekoje kartografuotas fragmentų skaičius

geneLength – geno sekos ilgis

totalNumReads – absoliutus kartografuotų fragmentų skaičius mėginyje (kb)

2.4. Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta naudojant *Microsoft Excel* ir atviro kodo R programinius paketus. Kokybinių kintamųjų aprašymui naudoti absoliutūs

duomenų dydžiai (n) ir jų procentinė išraiška (%). Kiekybiniai kintamieji aprašyti naudojant: vidurkį, medianą (Md), vidutinį absoliutų nuokrypį (MAD). Kadangi imtis buvo maža, buvo taikomi neparamestriniai statistiniai metodai. Vilkoksono ženklų kriterijus (angl. *Wilcoxon signed-rank test*) pasitelktas palyginti dviejų priklausomų imčių medianas. Kategorinės reikšmės palygintos tiksliau Fišerio testu (angl. *Fisher's exact test*). Dispersinė analizė (ANOVA) taikyta palyginti tiriamųjų pogrupius ir genų raiškos skirtumus. Skirtumai buvo statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

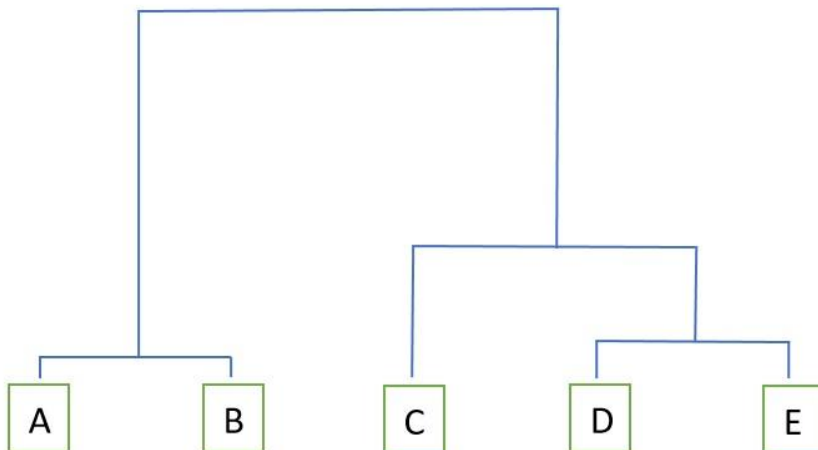
2.4.1 Duomenų ir diferencinė genų raiškos analizė

Nagrinėti normalizuoti visų mėginių duomenys (RPKM). Siekiant identifikuoti skirtingus modelius (angl. *patterns*) duomenų rinkinyje bei atskleisti panašumus ir skirtumus tarp mėginių, taikyta pagrindinio komponento analizė (angl. *Principal component analysis, PCA*) ir hierarchinė klasterinė analizė (angl. *Hierarchical cluster analysis, HCA*) (34).

Pagrindinio komponento analizė (PCA) – tai didelių duomenų rinkinių dimensijos mažinimo metodas, kuris padidina jų interpretacijos galimybes ir tuo pat metu mažina informacijos praradimą. Naudojant PCA, sukuriama nauji nekoreliuojantys kintamieji – pagrindiniai komponentai (angl. *Principal components, PC*). Didelių duomenų rinkinių kintamieji paverčiami mažesniais, kurie vis tiek sutalpina daugumą informacijos iš didelių duomenų rinkinių. Mažinant kintamųjų skaičių, prarandamas tikslumas, o mažinant dimensiją, prarandama labai nedaug tikslumo, bet įgyjama paprastumo – mažesnius duomenų rinkinius lengviau tyrinėti ir vizualizuoti. Mašininio mokymo algoritmuose (angl. *machine learning algorithms*) duomenys paprasčiau ir greičiau analizuojami, kadangi nereikia apdoroti pašalinių kintamųjų. Taigi, pagrindinis PCA tikslas yra sumažinti duomenų rinkinio kintamųjų skaičių išsaugant kiek įmanoma daugiau informacijos (120) (<https://builtin.com/data-science/step-step-explanation-principal-component-analysis>).

Hierarchinė klasterinė analizė (HCA) – duomenų tiriamosios analizės metodas, kurio tikslas yra sukurti klasterių hierarchiją. Panašūs objektai, sujungiami į grupes pasitelkus algoritmus, vadinami klasteriais. Baigtis yra klasterių rinkinys, kuriame kiekvienas klasteris skiriasi vienas nuo kito, o kiekvieno klasterio objektai yra labiau panašūs vienas į kitą, nei į kitų klasterių objektus. Hierarchinis klasterių formavimas atliekamas iš atstumų matricos (angl. *distance matrix*) arba neapdorotų duomenų, kuriems programine įranga atstumų matrica paskaičiuojama automatiškai. Hierarchinio klasterių suformavimo pradžioje kiekvienas objektas yra

laikomas atskiru klasteriu. Po to yra kartojami du žingsniai: 1 – dviejų arčiausiai esančių klasterių atpažinimas, ir 2 – dviejų panašiausių klasterių sujungimas. Šis interaktyvus procesas kartojamas tol, kol visi klasteriai sujungiami kartu. Grafinė HCA išraiška yra dendrograma (6 pav.) – dvejetainis suliejimo medis, kuris parodo hierarchinį ryšį tarp klasterių (121) (<https://www.displayr.com/what-is-hierarchical-clustering/>).



6 pav. Dendrogramos pavyzdys.

Siekiant nustatyti genus, kurių raiška skiriasi HIR ir LIR tiriamųjų pogrupiuose bei prieš ir po taikomo hormoninio gydymo GnRHa, naudotas atviro kodo R su *edgeR* programinis paketas (122), kiekvienam genui pritaikant *quasi-likelihood* neigiamą binominį generalizuotą log-linijinį modelį (123). Ieškant genų raiškos pokyčių, atsiradusių dėl hormoninio gydymo, buvo sukurtas statistinis modelis su dviem papildomais kategoriniais veiksniais: 1 – *ligonis* – nustato to paties ligonio mėginių matavimus prieš ir po gydymo GnRHa bei kontroliuoja genų raiškos skirtumus tarp individų; 2 – *gydymas* – modeliuoja genų raiškos pokyčius, sukeltus GnRHa (61).

Analizuoti genai su bent vienu nuskaitytu fragmentu iš milijono (angl. *one read per million*) bent dviejuose mėginiuose (34). Skirtingos raiškos genai apibrėžti kaip tie, kurių kriterijaus reikšmingumo lygmuo (angl. *false discovery rate*, FDR) $< 0,05$ ir bent dvigubai skiriasi absoliutus raiškos pokytis kartais (angl. *fold-change*, FC) (34). Genų raiškos pokyčiai pateikiami kaip absoliutaus raiškos pokyčio kartais binarinis logaritmas (\log_2FC). Binarinis logaritmas (\log_2) pritaikomas, siekiant palyginti sumažėjusios (angl. *down-regulated*) ir padidėjusios (angl. *up-regulated*)

raiškos genus tarpusavyje. Pavyzdžiui, santykiniai dydžiai 2 ir 0,5, parodantys dvigubą absoliutų raiškos pokytį ($FC = 2$) tarp padidėjusios ir sumažėjusios raiškos genų, skalėje atitinkamai tampa „+1“ ir „-1“.

FDR – statistinis metodas, taikomas kai hipotezė tikrinama kelis kartus. Paprastai yra pasitelkiamas eksperimentuose, kuriuose taikomi didelio našumo metodai, siekiant atmesti atsitiktinius įvykius, kurie klaidingai atrodo reikšmingi. FDR apibrėžiamas kaip I rūšies klaidos tikimybė, kai neteisingai atmetama nulinė hipotezė ir gaunamas klaidingai teigiamas rezultatas. Taikant FDR metodą, padidėja statistinė galia ir yra mažiau I rūšies klaidų. FDR skaičiuotas pagal Benjamini ir Hochberg metodą (124, 125) (<https://www.statisticshowto.com/false-discovery-rate/>).

2.4.2 nkRNR duomenų analizė (60)

Nagrinėta ilgų intergeninių nekoduojančių RNR (iinkRNR) ir antiprasminių ilgų nekoduojančių RNR (ainkRNR) raiška mėginiuose ligonių, sergančių kriptorchizmu, su HIR prieš ir po gydymo GnRHa. Į analizę įtrauktos visos iinkRNR ir ainkRNR, kurių $\log_2FC > 1,0$. Taip pat palyginta iinkRNR ir ainkRNR raiška tarp HIR ir LIR pogrupių ir tos inkRNR, kurių raiška HIR pogrupyje rasta mažesnė, buvo įtrauktos į analizę. IinkRNR ir ainkRNR atrinktos atsižvelgiant į RNR-RNR sąveikas, atskleidusias tas iinkRNR, ainkRNR ar mRNR (angl. *messenger RNA*, koduoja baltymus), kurios daro įtaką spermatogenezei ar vaisingumui, ir svarbias inkRNR bei mRNR, dalyvaujančias ląstelėms dalijantis ir augant, signalų perdavimo keliuose ir vystantis navikams. Taip pat įtrauktos 5 iinkRNR tiesiogiai susijusios su spermatogeneze, kurių $\log_2FC > 1,0$. Nustaćius galimas ainkRNR kandidatas, *PubMed* duomenų bazėje atlikta literatūros apie jas ir su jomis persidengiančių prasminių mRNR / baltymų analizė, renkantis pagal galimą įtaką spermatogenezei, vaisingumui, ląstelių dalijimuisi ir augimui, navikų vystymuisi bei dalyvavimą signalų perdavimo keliuose (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). RNR anotacija buvo patvirtinta naudojantis *Ensembl* duomenų baze (www.ensembl.org, 97 leidimas) (126). IinkRNR / mRNR raiška interpretuota naudojantis *GermOnline* (www.germonline.org, versija 4.0) (127), *Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org, versija 18) (128, 129), *Genevestigator*® (www.genevestigator.com, versija 7.3.1) (130). Eksperimentais patvirtintų RNR-RNR sąveikų duomenys paimti iš *RISE* duomenų bazės (<http://rise.life.tsinghua.edu.cn>, versija 1.0) (131).

3. REZULTATAI

3.1. GnRHa poveikis vyrų vaisingumo potencialo atkūrimui

Adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa (trukmė: 6 mėn. laiko; dozavimas: 10 µg kas antrą dieną vakare; vartojimo būdas: įpurškimai į nosį), kurį po pirmos sėklidės nuleidimo operacijos gavo 2HIR pogrupio tiriamieji, buvo gerai toleruojamas. Tik vienam ligoniui nepatiko įpurškimai į nosį dėl menamai jaučiamo deginimo. Dėl šios priežasties hormoninis gydymas buvo nutrauktas praėjus 1 mėnesiui. Nepaisant sutrumpinto gydymo laiko, šis turėjo teigiamą poveikį vaisingumo potencialui: S/T nuo 0,08 padidėjo iki 0,13 ir atsirado Ad spermatogonijos (2 lentelė).

Po pirmos operacijos S/T statistškai nesiskyrė tarp abiejų pogrupių ($p = 0,67$). 1HIR pogrupyje dviems tiriamiesiems S/T nežymiai padidėjo, kitiems dviems sumažėjo ir tik vienam ženkliai padidėjo (7 pav.). Priešingai, 2HIR pogrupyje S/T mediana reikšmingai padidėjo nuo 0,11 iki 0,42 ($p = 0,03$; porinis Vilkoksono testas, vienpusis) (8 pav.). Ad spermatogonijos atsirado tik ligoniams, kurie prieš antrą operaciją gavo adjuvantinį hormoninį gydymą ($p = 0,008$; dvipusis Fišerio testas) (2 lentelė).

2 lentelė. Antros tiramųjų grupės sėklidžių histologinių tyrimų duomenys.

Amžius, mėn.	Ad/T1	Ad/T2	S/T1	S/T2	TFI1	TFI2
1HIR POGRUPIS						
10	0	0	0,18	0,15	0,2428	0,1573
7	0	0	0,32	0,34	0,1346	0,3125
20	0	0	0,11	0,12	0,0833	0,1143
22	0	0	0,33	0,06	0,2367	0,0492
53	0	0	0,15	0,43	0,0413	0,6029
2HIR POGRUPIS						
13	0	0,0085	0,08	0,13	0,0933	0,2479
32	0	0,0109	0,47	0,77	0,6136	0,7717
55	0	0,0056	0,07	0,42	0,0612	0,3966
22	0	0,005	0,11	0,40	0,1419	0,2475
10	0	0,0208	0,13	0,79	0,8947	0,7917

Ad/T1: Ad spermatogonijų kiekis tubulėje pirmoje sėklidės biopsijoje

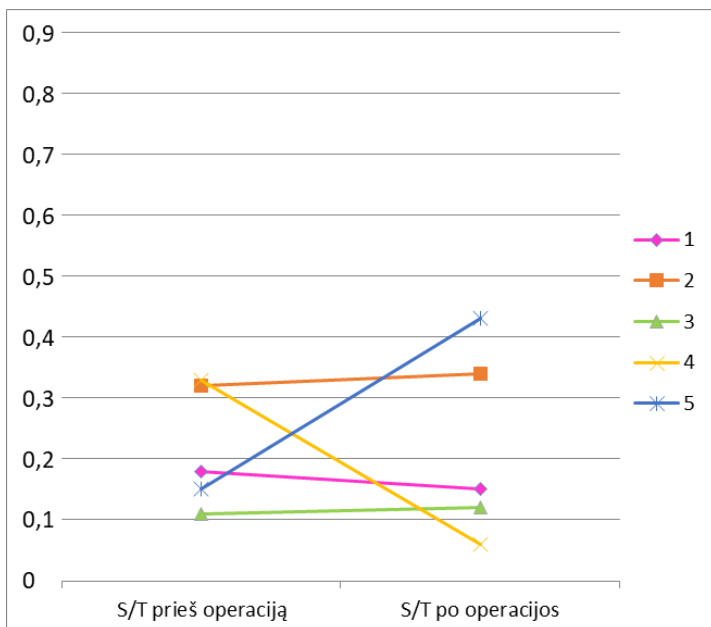
Ad/T2: Ad spermatogonijų kiekis tubulėje antroje sėklidės biopsijoje

S/T1: spermatogonijų kiekis tubulėje pirmoje sėklidės biopsijoje

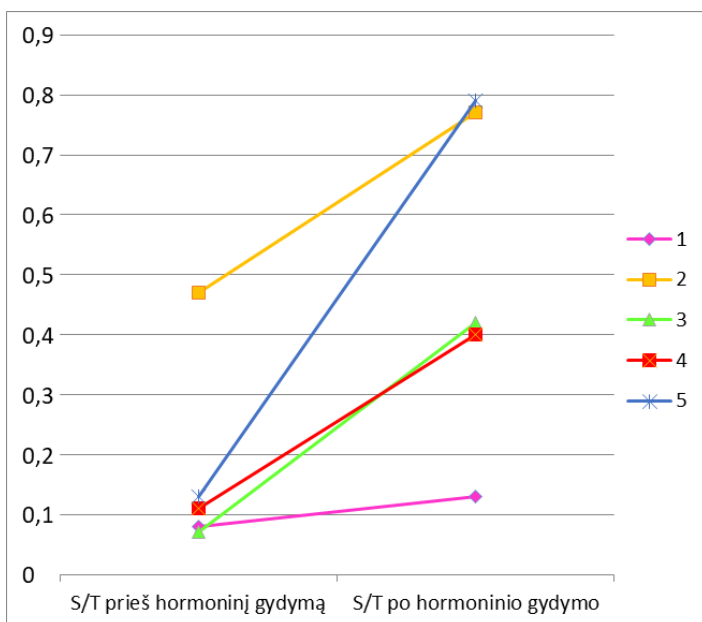
S/T2: spermatogonijų kiekis tubulėje antroje sėklidės biopsijoje

TFI1: tubulių fertilumo indeksas pirmoje sėklidės biopsijoje

TFI2: tubulių fertilumo indeksas antroje sėklidės biopsijoje



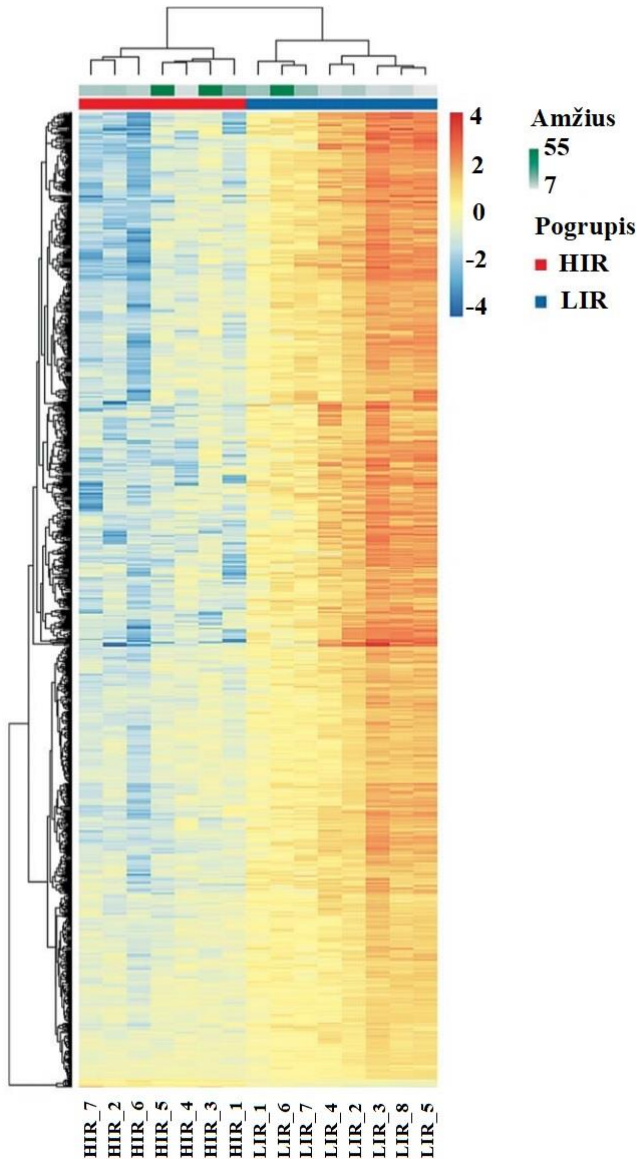
7 pav. S/T pokyčiai 1HIR pogrupyje. Kiekviena spalva vaizduoja vieną ligonį.



8 pav. S/T pokyčiai 2HIR pogrupyje. Kiekviena spalva vaizduoja vieną ligonį.

3.2. Genų raiška nenusileidusiose sėklidėse (34)

Iš pirmos tiriamųjų grupės mėginių nustatyta 23 737 genų raiška. 2 033 genų raiška reikšmingai skyrėsi tarp HIR ir LIR pogrupių ($FDR < 0,05$; $FC \geq 2$) (34). 97,7 % (1 986) genų raiška HIR pogrupyje buvo sumažėjusi ir tik 2,3 % (47) – padidėjusi, palyginti su LIR pogrupiu (3 priedas, 1P lentelė) (61). Raiškos intensyvumą vaizduojančiame grafike (angl. *heatmap*) pavaizduota 1 000-čio reikšmingiausiai besiskyriančių genų raiška (9 pav.)



tęsinys kitame puslapyje

9 pav. RNR raiškos profilis nenusileidusių sėklidžių audinyje. Grafikas parodo \log_2FC 1 000-čio reikšmingiausių genų raiškos vertes tarp mažo (LIR) ir didelio (HIR) nevaisingumo rizikos pogrupių tiriamųjų. Tiriamųjų pogrupiai ir amžius (mėn.) yra užkoduoti spalvomis ir pateikti grafiko viršuje. Skalė parodo raiškos intensyvumą: raudona spalva – didelė, mėlyna – maža raiška. Mėginiai ir genai surikiuoti pagal hierarchinius klasterius (dendrogramos viršuje ir kairėje, atitinkamai) (34).

3.3. Hormoninio gydymo poveikis nenusileidusių sėklidžių genų raiškai (61)

Antroje tiriamųjų grupėje iš 2HIR pogrupio mėginių nustatyta 28 645 genų raiška. 6 469 genų raiška skyrėsi lyginant prieš ir po hormoninio gydymo. 90 % atvejų genų raiška po gydymo GnRHa padidėjo ($FDR < 0,05$; $FC \geq 2$) (61) (3 priedas, 1P lentelė).

Atlikta diferencinė 1 000-čio statistiškai reikšmingiausiai besiskiriančių genų raiškos analizė. Taikytas mėginių poravimas ir hierarchinė klasterinė analizė. 1HIR pogrupyje suporuoti mėginiai prieš / po chirurginio gydymo (Operacija 1 / Operacija 2), o 2HIR pogrupyje – prieš / po adjuvantinio hormoninio gydymo (GnRHa- / GnRHa+). Rezultatai pateikti raiškos intensyvumą vaizduojančiu grafiku su dendrograma (10 pav.). Analizė parodė, kad vien chirurginis kriptorchizmo gydymas (1HIR pogrupis) sužadina labai mažai reikšmingų genų raiškos pokyčių (10 pav., lyginti 1 su 3 ir 2 su 4 juostas). O adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa (2HIR pogrupis) padidina daugelio genų raišką (10 pav., lyginti 5 su 7 ir 6 su 8 juostas).

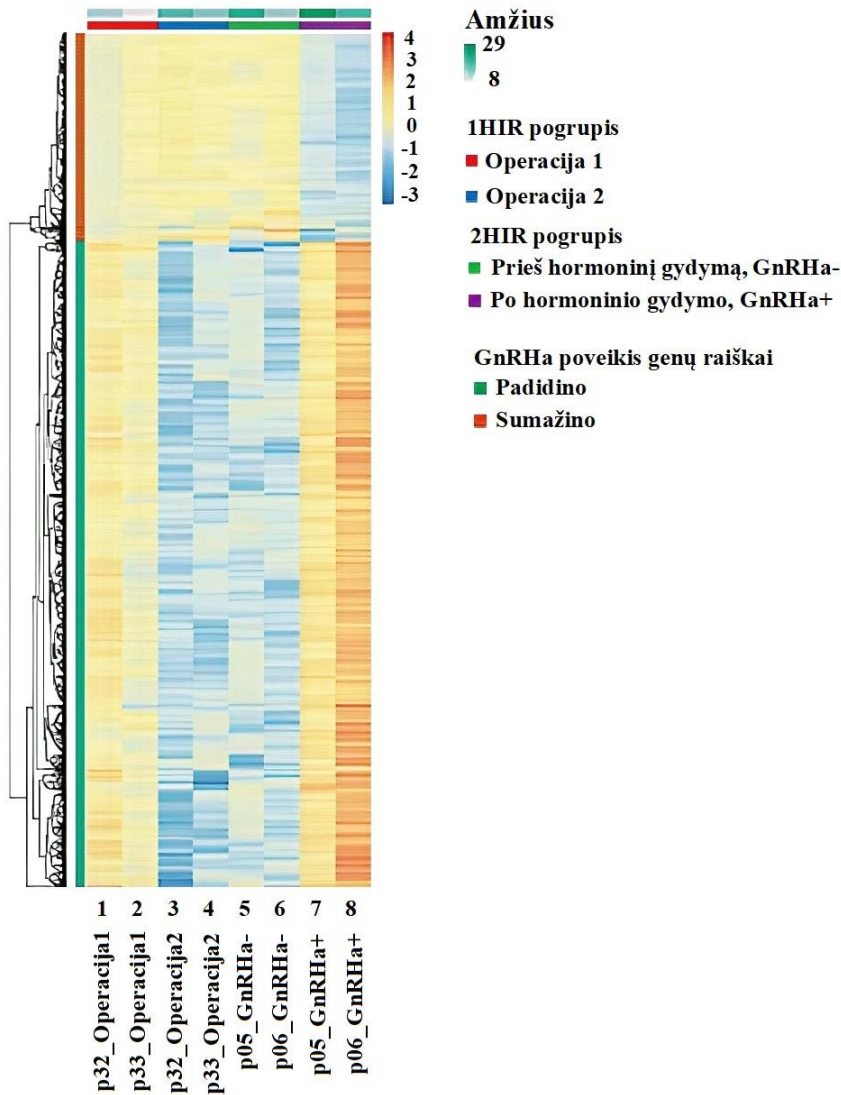
Nagrinėjant GnRHa poveikį genų raiškai, kuri HIR pogrupyje buvo sumažėjusi, nustatyta, kad hormoninis gydymas ją padidina (3 priedas, 1P lentelė) (61). Atsakas į gydymą GnRHa įtraukia lokusus, dalyvaujančius:

- genų raiškos reguliavime: *DLX3*, *DLX6*, *EGR2*, *FOXG1*, *ISL2*, *NHLH2*, *OTX2*, *PAX7*, *POU3F2*, *POU6F2*, *RGS7*, *SOX1*, *SOX30*;
- chromatino modifikacijoje: *PRDM9*;
- signalo perdavime: *NOS1*.

Analizuojant pirmos tiriamųjų grupės mėginių rezultatus, nustatyta, kad dalies transkriptų raiška tarp HIR ir LIR pogrupių nesiskyrė. Tačiau hormoninis gydymas vis vien padidino šių genų raišką (3 priedas, 1P lentelė):

- DNR / chromatino prijungimo reguliatoriai, svarbūs vystymuisi: *DLX1*, *EGR3*, *FGF5*, *LHX4*, *OTX1*, *PAX1*, *PAX2*, *PAX3*, *PAX4*, *PAX6*, *POU1F1*, *POU2AF1*, *POU2F2*, *POU2F3*, *POU4F2*, *PROPI*, *RUNX2*, *SOX2*;

- epigenetiniai faktoriai, dalyvaujantys histonų modifikacijoje: *PRDM12*, *PRDM16* (132–136).



10 pav. RNR raiškos profilis didelės (HIR) nevaisingumo rizikos grupės tiriamųjų nenusileidusių sėklidžių audinyje. Grafikas parodo \log_2FC 1 000-čio reikšmingiausių genų raiškos vertes prieš / po chirurginio gydymo (Operacija 1 / Operacija 2) ir prieš / po adjuvantinio hormoninio gydymo (GnRHa- / GnRHa+) Tiriamųjų pogrupiai ir amžius (mėn.) yra užkoduoti spalvomis ir pateikti grafiko viršuje. Skalė parodo raiškos intensyvumą: raudona spalva – didelė, mėlyna – maža raiška. Genai surikiuoti pagal hierarchinius klasterius (dendrograma kairėje) (61).

3.3.1 GnRHa poveikis genų, dalyvaujančių testosterono sintezėje, raiškai (61)

Po adjuvantinio gydymo GnRHa padidėjo G baltymo signalo perdavimo regulatoriaus 7 (angl. *regulator of G protein signaling 7, RGS7*), aldo-keto reduktazių 1 šeimos nario B15 (angl. *aldo-keto reductase family 1 member B15, AKR1B15*) ir aldo-keto reduktazių 1 šeimos nario D1 (angl. *aldo-keto reductase family 1 member D1, AKR1D1*) genų raiška (3 priedas, 1P lentelė; 3 lentelė) (61).

Palyginus pirmos tiriamųjų grupės mėginių rezultatus, nustatyta, kad dalies genų, dalyvaujančių ir reguliuojančių testosterono sintezę, raiška tarp HIR ir LIR pogrupių nesiskyrė. Vertinant ir analizuojant šių genų raišką po gydymo GnRHa, nustatyta, kad hormoninis gydymas padidino jų raišką. Tokiems genams priklauso: *GPRC6A, FGF23* (3 priedas, 1P lentelė) (61), *HSD3B1, HSD17B2, CYP19A1, CYP11B2, CYP11B1* (3 lentelė) (61).

Taip pat buvo aptiktas kelių genų, dalyvaujančių testosterono sintezėje, raiškos sumažėjimas po gydymo GnRHa (*CYP17A1, CYP11A1, CYPB5B, HSD17B1/B4/B11/B12*) (3 lentelė) (61).

3 lentelė. Skirtinga genų, dalyvaujančių testosterono sintezės kelyje, raiška nenusileidusiose sėklidėse (61).

Genas	$\log_2FC^{HIR/LIR}$	FDR ^{HIR/LIR}	GnRH ^{a-}	GnRH ^{a+}	$\log_2FC^{GnRH_{a+/-}}$	FDR ^{GnRH_{a+/-}}
<i>AKR1B15</i>	-1,04	0,05	0,13	0,82	1,63	0,00
<i>AKR1C1</i>	n.r.	n.r.	12,18	10,26	-0,75	0,00
<i>AKR1D1</i>	n.r.	n.r.	0,16	0,82	1,89	0,00
<i>CYB5B</i>	n.r.	n.r.	11,25	10,03	-0,77	0,00
<i>CYP11A1</i>	n.r.	n.r.	49,57	30,93	-1,13	0,00
<i>CYP11B1</i>	n.r.	n.r.	0,04	0,61	3,44	0,00
<i>CYP11B2</i>	n.r.	n.r.	0,04	0,41	2,59	0,00
<i>CYP17A1</i>	n.r.	n.r.	10,77	4,97	-1,40	0,00
<i>CYP19A1</i>	n.r.	n.r.	0,11	0,92	2,51	0,00
<i>HSD3B1</i>	n.r.	n.r.	0,17	0,82	1,83	0,01
<i>HSD3B2</i>	n.r.	n.r.	1,05	1,00	n.n.	n.n.
<i>HSD17B1</i>	n.r.	n.r.	0,92	1,26	-0,93	0,00
<i>HSD17B2</i>	n.r.	n.r.	0,11	0,94	2,37	0,01
<i>HSD17B3</i>	n.r.	n.r.	120,88	94,48	-0,91	0,00
<i>HSD17B4</i>	n.r.	n.r.	19,75	13,96	-0,95	0,00
<i>HSD17B6</i>	n.r.	n.r.	2,56	3,77	n.n.	n.n.
<i>HSD17B7</i>	n.r.	n.r.	7,20	7,44	n.n.	n.n.
<i>HSD17B8</i>	n.r.	n.r.	2,01	1,90	-0,57	0,02
<i>HSD17B10</i>	n.r.	n.r.	20,62	18,68	-0,57	0,02

Lentelės tęsinys.

Genas	log₂FC^{HIR/LIR}	FDR^{HIR/LIR}	GnRHa-	GnRHa+	log₂FC^{GnRHa+/-}	FDR^{GnRHa+/-}
<i>HSD17B11</i>	n.r.	n.r.	25,61	20,67	-0,89	0,00
<i>HSD17B12</i>	n.r.	n.r.	34,91	23,34	-0,93	0,00
<i>HSD17B13</i>	n.r.	n.r.	0,90	1,66	n.n.	n.n.
<i>HSD17B14</i>	n.r.	n.r.	1,22	1,00	n.n.	n.n.
<i>SRD5A1</i>	n.r.	n.r.	2,89	2,73	-0,57	0,03
<i>SRD5A2</i>	n.r.	n.r.	0,64	1,03	n.n.	n.n.
<i>SRD5A3</i>	-1,34	0,00	1,23	1,78	n.n.	n.n.

Santrumpos: paryškinta – padidėjusi raiška po gydymo GnRHa; HIR – didelės nevaisingumo rizikos pogrupio mėginiai; LIR – mažos nevaisingumo rizikos pogrupio mėginiai; GnRHa – gonadotropinus atpalaiduojančio hormono analogas; „-“ – 2HIR pogrupio mėginiai prieš hormoninį gydymą, „+“ – po hormoninio gydymo; log₂FC – absoliutaus raiškos pokyčio kartais binarinis logaritmas; FDR – kriterijaus reikšmingumo lygmuo; n.r. – nereikšminga; n.n. – nenustatyta.

3.4. nkRNR raiška nenusileidusiose sėklidėse, jų funkcijos ir GnRHa poveikis jų raiškai (60, 61)

Atliekant diferencinę genų raiškos analizę, buvo pastebėta, kad adjuvantinis gydymas GnRHa taip pat padidino kai kurių antiprasminių ir nekoduojančių RNR raišką (4 lentelė) (61). Tai įdomus preliminarus atradimas, kuris parodo potencialiai svarbų inkRNR vaidmenį, vertinant jų bendrą atsaką į gydymą GnRHa sėklidžių vystymosi priešpubertatiniu laikotarpiu.

GnRHa padidino inkRNR raišką, kurios dalyvauja:

- embriogenezėje: *FENDRR* (angl. *FOXF1 adjacent non-coding developmental regulatory RNA*) (137, 138);
- X chromosomos inaktyvacijos procese (angl. *X chromosome inactivation, XCI*): *TSIX* (*XIST* antiprasminė RNR) (100);
- histonų modifikacijose: *AIRN* (angl. *antisense of IGF2R non-protein coding RNA*), *HOX* transkripto antiprasminė RNR (angl. *HOX transcript antisense RNA, HOTAIR*) (139, 140).

4 lentelė. Skirtinga genų, priklausančių antiprasminių ir nekoduojančių baltymų RNR šeimoms, raiška nenusileidusiose sėklidėse (61).

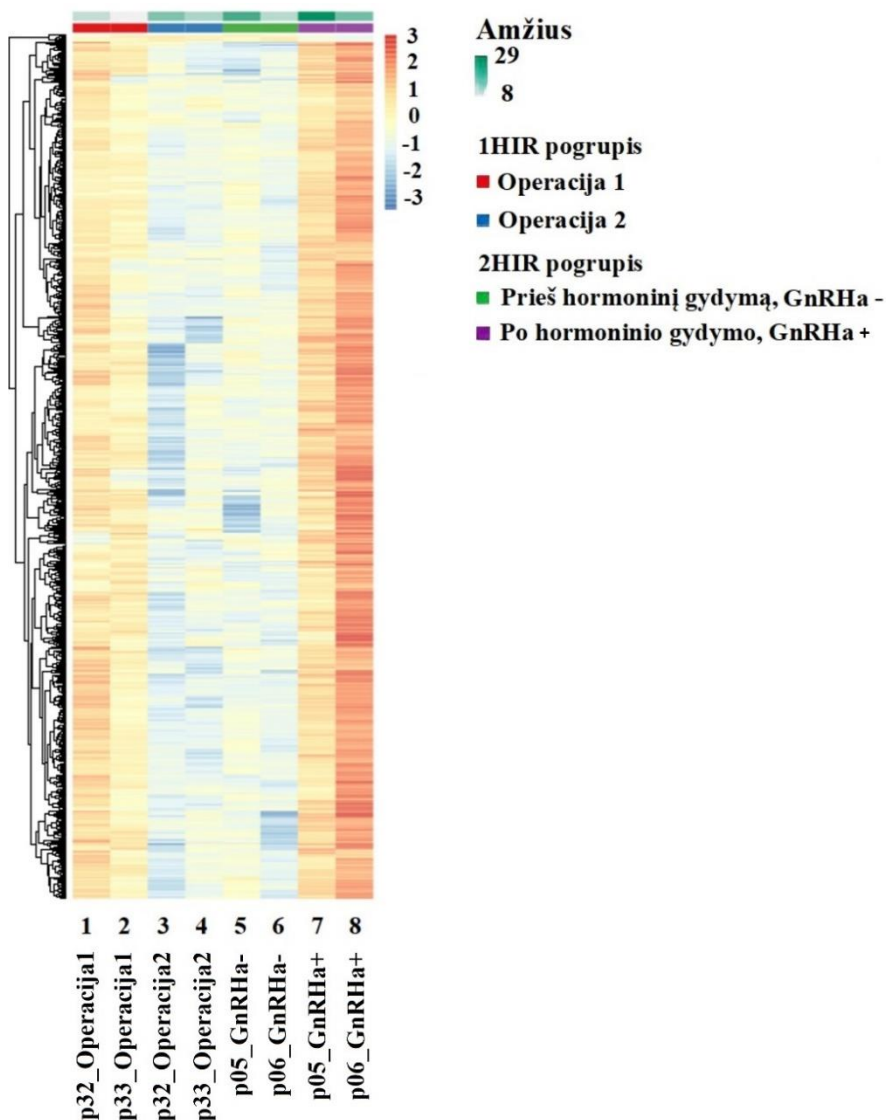
Genas	$\log_2FC^{HIR/LIR}$	$FDR^{HIR/LIR}$	$\log_2FC^{GnRHa+/-}$	$FDR^{GnRHa+/-}$
<i>ADORA2A-ASI</i>	-1,25263	0,01842	1,19387	0,01635
<i>ADPGK-ASI</i>	-1,06107	0,02694	1,17629	0,02663
<i>AIRN</i>	n.r.	n.r.	2,77998	0,00158
<i>ALKBH3-ASI</i>	n.r.	n.r.	2,14374	0,00138
<i>CDKN2B-ASI</i>	n.r.	n.r.	1,66151	0,00008
<i>DDX11-ASI</i>	n.r.	n.r.	-0,92499	0,01325
<i>DLX6-ASI</i>	-0,92209	0,04993	2,02703	0,00025
<i>DLGAP2</i>	-1,80691	0,00184	1,59393	0,00686
<i>FAM225A</i>	-1,73613	0,00496	1,00796	0,02212
<i>FAM225B</i>	-1,81635	0,00204	1,37314	0,00442
<i>FENDRR</i>	n.r.	n.r.	2,05852	0,00007
<i>FZD10-ASI</i>	-1,04454	0,03872	1,25925	0,01110
<i>HAGLR</i>	-2,08504	0,00040	n.n.	n.n.
<i>HNRNPU</i>	0,39289	0,01312	-0,89089	0,00046
<i>HOTAIR</i>	-1,74593	0,00296	1,11601	0,03492
<i>HOTTIP</i>	n.r.	n.r.	2,22094	0,00410

Lentelės tęsinys.

Genas	$\log_2FC^{HIR/LIR}$	FDR ^{HIR/LIR}	$\log_2FC^{GnRHa+/-}$	FDR ^{GnRHa+/-}
<i>HOXB-AS1</i>	-2,92909	0,00110	n.n.	n.n.
<i>HOXB-AS3</i>	-2,15764	0,00229	n.n.	n.n.
<i>IGF2-AS</i>	-1,05665	0,04738	n.n.	n.n.
<i>IGF2BP2-AS1</i>	n.r.	n.r.	3,69490	0,00024
<i>INHBA-AS1</i>	n.r.	n.r.	2,01676	0,00043
<i>LINC00221</i>	-1,20557	0,00965	1,23541	0,03583
<i>LINC00282</i>	-1,40372	0,00970	0,91075	0,04652
<i>LINC00485</i>	1,38444	0,03671	2,14570	0,00029
<i>LINC00922</i>	-1,47091	0,02234	1,41105	0,04728
<i>LINC01249</i>	-1,42369	0,01448	1,38636	0,01018
<i>LINC01277</i>	1,09364	0,01533	1,78653	0,00187
<i>LINC01446</i>	-1,21148	0,00428	1,14143	0,00317
<i>LY86-AS1</i>	-1,67054	0,00635	1,38562	0,00200
<i>OTX2-AS1</i>	n.r.	n.r.	2,37636	0,00009
<i>SLC7A11-AS1</i>	-1,53838	0,00556	1,58589	0,00053
<i>TINCR</i>	-1,07951	0,00522	n.r.	n.r.
<i>TSIX</i>	n.r.	n.r.	2,31620	0,00018
<i>XIST</i>	-2,17231	0,00188	n.r.	n.r.

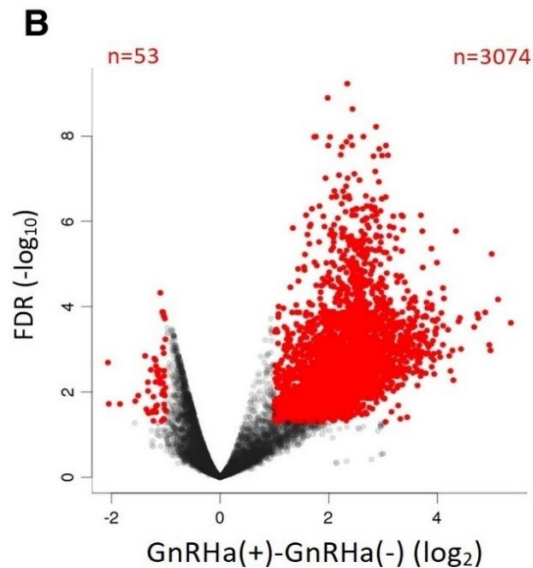
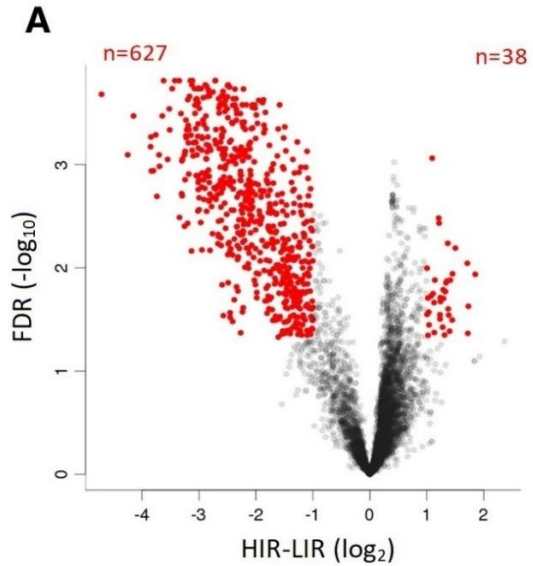
Santrumpos: HIR – didelės nevaisingumo rizikos pogrupio mėginiai; LIR – mažos nevaisingumo rizikos pogrupio mėginiai; GnRHa – gonadotropinus atpalaiduojančio hormono analogas; „-“ – 2HIR pogrupio mėginiai prieš hormoninį gydymą, „+“ – po hormoninio gydymo; \log_2FC – absoliutaus raiškos pokyčio kartais binarinis logaritmas; FDR – kriterijaus reikšmingumo lygmuo; n.r. – nereikšminga; n.n. – nenustatyta.

Remiantis gautais pirminiais diferencinės genų raiškos analizės duomenimis (4 lentelė) (61), buvo atlikta tikslinė inkRNR raiškos analizė. Pradžioje buvo nustatytos inkRNR, kurių raiška reikšmingai skyrėsi pirmoje tiriamųjų grupėje tarp HIR ir LIR pogrupių mėginių. Vėliau buvo palyginti antros tiriamųjų grupės mėginiai: nustatyti genų raiškos pokyčiai 1HIR pogrupyje – prieš (Operacija 1) ir po (Operacija 2) chirurginio gydymo, ir 2HIR pogrupyje – prieš (GnRHa-) ir po (GnRHa+) adjuvantinio hormoninio gydymo. Rezultatai pateikti raiškos intensyvumą vaizduojančiu grafiku su dendrograma (11 pav.) (60). Gauti rezultatai parodo, kad GnRHa padidina inkRNR raišką (11 pav., 5–8 juostos) (60), o vien chirurginis gydymas neturi reikšmingos įtakos jų raiškai (11 pav., 1–4 juostos) (60).



11 pav. *inkRNR* raiškos profilis didelės nevaisingumo rizikos (HIR) grupės tiriamųjų nenusileidusių sėklidžių audinyje. Grafikas parodo \log_2FC 1 000-čio reikšmingiausių genų raiškos vertes, palyginus keturias antros tiriamųjų grupės sėklidžių poras: 1HIR pogrupis – 1 ir 2 juostos – dviejų tiriamųjų mėginiai pirmos operacijos metu (Operacija 1), 3 ir 4 juostos – antros operacijos metu (Operacija 2); 2HIR pogrupis – 5 ir 6 juostos – dviejų tiriamųjų mėginiai pirmos operacijos metu prieš hormoninį gydymą (GnRHa-), 7 ir 8 juostos – antros operacijos metu po hormoninio gydymo (GnRHa+). Tiriamųjų pogrupiai ir amžius (mėn.) yra užkoduoti spalvomis ir pateikti grafiko viršuje. Skalė parodo raiškos intensyvumą: raudona spalva – didelė, mėlyna – maža raiška. Genai surikiuoti pagal hierarchinius klasterius (dendrograma kairėje) (60).

„Volcano“ diagramomis (angl. *volcano plots*) nustatyti genai, kurių raiška labiausiai (\log_2FC) ir reikšmingai (FDR) pasikeitė palyginus HIR ir LIR tiriamųjų pogrupius bei prieš ir po hormoninio gydymo (2HIR pogrupis). Nustatyta, kad 627 inkRNR raiška buvo sumažėjusi, palyginus HIR ir LIR pogrupius, o 38 – padidėjusi (12A pav.) (60). Palyginus 2HIR pogrupio mėginių duomenis, nustatytos 3 074 inkRNR, kurių raišką hormoninis gydymas padidino, ir 53, kurių – sumažino (12B pav.) (60).



tęsinys kitame puslapyje

12 pav. inkRNR raiškos profilis nenusileidusiose sėklidėse. A – tarp didelės (HIR) ir mažos (LIR) nevaisingumo rizikos pogrupių; B – 2HIR pogrupio prieš (GnRHa(-)) ir po (GnRHa(+)) adjuvantinio hormoninio gydymo. Genai, kurių raiška nesiskiria tarp pogrupių, atvaizduoti juoda spalva, genai, kurių skiriasi, – raudona. Genai, kurių raiška didžiausia ir mažiausia, yra pateikti atitinkamai diagramų dešinėje ir kairėje. Genai, kurių raiškos pokytis reikšmingiausias, – diagramų viršuje (60).

Remiantis inkRNR vieta genome, ryšiais su baltymus koduojančiais genais prasminėse / antiprasminėse porose, RNR-RNR sąveikomis, literatūroje pateiktais duomenimis, buvo nustatyti galimi inkRNR, atsakančių į GnRHa poveikį, vaidmenys. Iš nustatytų 77 iinkRNR ir 46 ainkRNR atitinkamai buvo atrinktos 11 ir 4, kurių FC po gydymo GnRHa > 2 (5 lentelė) (60). Šių inkRNR raiškos pokyčio pobūdis leido išskirti hipotezę, kad jos yra svarbios Ad spermatogonijų vystymuisi, dalyvauja atsinaujinant kamieninėms ląstelėms, perduodant signalą ir diferencijuojantis ląstelėms. Taip pat buvo atrinktos 7 inkRNR, siejamos su vėžio patologija ir Ad spermatogonijų virsmu, kurių raiška HIR pogrupyje buvo sumažėjusi, palyginti su LIR pogrupiu, o adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa ją padidino (6 ir 7 lentelės) (60).

5 lentelė. Sėklidžių iinkRNR ir ainkRNR, dalyvaujančios kamieninių ląstelių atsinaujinime ir diferenciacijoje, kurių raiška padidėja po gydymo GnRHa (60).

Genas	RPKM GnRHa- Mediana / MAD	RPKM GnRHa+ Mediana / MAD	log ₂ FC ^{GnRHa+/-}	p reikšmė	FDR
<i>LINC-ROR</i>	0,044 / 0,06	0,40 / 0,24	2,68	0,0004	0,002
<i>LINC00261</i>	0,11 / 0,04	1,11 / 0,68	2,60	3,588E-08	4,35E-06
<i>LINC00293</i>	0,05 / 0,04	0,66 / 0,49	2,80	0,0001	0,001
<i>LINC00303</i>	0,22 / 0,07	1,25 / 0,45	2,57	0,0001	0,0008
<i>LINC00520</i>	0,15 / 0,07	0,79 / 0,64	2,76	0,0002	0,001
<i>LINC00898</i>	0,04 / 0,03	0,35 / 0,25	2,72	0,0002	0,001
<i>LINC00974</i>	0,07 / 0,04	0,48 / 0,46	3,9	0,0008	0,003
<i>LINC00994</i>	0,20 / 0,10	1,41 / 0,81	2,73	5,773E-06	0,0001
<i>LINC01016</i>	0,15 / 0,03	1,32 / 0,70	3,36	2,078E-09	6,43E-07

Lentelės tęsinys.

Genas	RPKM GnRH ^{a-} Mediana / MAD	RPKM GnRH ^{a+} Mediana / MAD	log ₂ FC ^{GnRH^a±}	p reikšmė	FDR
<i>LINC01121</i>	0,25 / 0,04	1,84 / 0,45	2,89	2,049E-09	6,43E-07
<i>LINC01553</i>	0,09 / 0,06	1,26 / 0,67	3,60	0,0002	0,001
<i>EGFR-ASI</i>	0,03 / 0,05	0,58 / 0,30	2,99	3,850E-07	2,28E-05
<i>HOTTIP</i>	0,04 / 0,03	0,47 / 0,37	2,22	0,0010	0,004
<i>mTOR-ASI</i>	0,21 / 0,19	1,90 / 1,33	4,96	6,67E-06	0,0001
<i>OTX2-ASI</i>	0,09 / 0,007	0,91 / 0,45	2,37	2,95E-06	8,83E-05

Santrumpos: iinkRNR – ilga intergeninė nekoduojanti RNR; ainkRNR – antiprasminė ilga nekoduojanti RNR; RPKM – fragmentų skaičius kilobazėje iš milijono kartografuotų fragmentų; MAD – vidutinis absoliutus nuokrypis; GnRH^a – gonadotropinus atpalaiduojančio hormono analogas; „-“ – 2HIR pogrupio mėginiai prieš hormoninį gydymą, „+“ – po hormoninio gydymo; log₂FC – absoliutaus raiškos pokyčio kartais binarinis logaritmas; FDR – kriterijaus reikšmingumo lygmuo.

6 lentelė. *Sėklidžių inkRNR, siejamos su vėžio patologija ir Ad spermatogonijų virsmu, kurių raiška yra sumažėjusi HIR pogrupyje, palyginus su LIR grupiu (60).*

Genas	LIR (RPKM) Mediana / MAD	HIR (RPKM) Mediana / MAD	log ₂ FC ^{HIR/LIR}	p reikšmė	FDR
<i>LINC00221</i>	0,64 / 0,27	0,27 / 0,07	-1,20	0,0007	0,008
<i>LINC00701</i>	0,29 / 0,03	0,11 / 0,06	-0,84	0,002	0,02
<i>LINC00922</i>	0,47 / 0,17	0,10 / 0,07	-1,47	0,002	0,01
<i>LINC01249</i>	0,43 / 0,28	0,15 / 0,08	-1,42	0,001	0,01
<i>LINC01446</i>	0,57 / 0,09	0,31 / 0,08	-1,21	0,0002	0,003
<i>HOTAIR</i>	0,49 / 0,23	0,13 / 0,09	-1,74	0,0001	0,002
<i>DLX6-ASI</i>	0,42 / 0,09	0,20 / 0,06	-0,92	0,006	0,003

Santrumpos: inkRNR – ilgos nekoduojančios RNR; LIR – maža nevaisingumo rizika; HIR – didelė nevaisingumo rizika; RPKM – fragmentų skaičius kilobazėje iš milijono kartografuotų fragmentų; MAD – vidutinis absoliutus nuokrypis; log₂FC – absoliutaus raiškos pokyčio kartais binarinis logaritmas; FDR – kriterijaus reikšmingumo lygmuo.

7 lentelė. Sėklidžių inkRNR, siejamos su vėžio patologija ir Ad spermatogonijų virsmu, kurių raiška yra sumažėjusi HIR pogrupyje ir padidėja po gydymo GnRHa (60).

Genas	RPKM GnRHa- Mediana / MAD	RPKM GnRHa+ Mediana / MAD	log ₂ FC ^{GnRHa+/-}	p reikšmė	FDR
<i>LINC00221</i>	0,27 / 0,07	1,12 / 0,42	1,23	0,01	0,03
<i>LINC00701</i>	0,11 / 0,06	0,72 / 0,48	1,28	0,0009	0,003
<i>LINC00922</i>	0,10 / 0,07	0,85 / 0,40	1,41	0,02	0,04
<i>LINC01249</i>	0,15 / 0,08	0,92 / 0,56	1,38	0,003	0,01
<i>LINC01446</i>	0,31 / 0,08	1,49 / 0,82	1,14	0,0007	0,003
<i>HOTAIR</i>	0,13 / 0,09	1,04 / 0,87	1,14	0,01	0,03
<i>DLX6-AS1</i>	0,20 / 0,06	1,13 / 0,81	2,02	1,55E-05	0,0002

Santrumpos: inkRNR – ilgos nekoduojančios RNR; RPKM – fragmentų skaičius kilobazėje iš milijono kartografuotų fragmentų; MAD – vidutinis absoliutus nuokrypis; GnRHa – gonadotropinus atpalaiduojančio hormono analogas; „-“ – 2HIR pogrupio mėginiai prieš hormoninį gydymą, „+“ – po hormoninio gydymo; log₂FC – absoliutaus raiškos pokyčio kartais binarinis logaritmas; FDR – kriterijaus reikšmingumo lygmuo.

Taip pat buvo nustatyta, kad HIR sėklidėse, palyginti su LIR, *TINCR* (angl. *Terminal differentiation-induced non-coding RNA*) raiška yra sumažėjusi (4 lentelė: $\log_2FC = -1,07$; $FDR = 0,002$) (61), o adjuvantinis gydymas GnRHa reikšmingai jos nepadidina. Atvirkščiai yra su epigenetiniais modifikatoriais, kurie prijungia *TINCR* (131): nustatyti septyni, kurių raiška HIR pogrupyje buvo padidėjusi, o po hormoninio gydymo – sumažėjo (8 lentelė) (60).

8 lentelė. Epigenetinių modifikatorių, kurie prijungia *TINCR*, raiška nenusileidusiose sėklidėse (60).

Genas	$\log_2FC^{HIR/LIR}$	$FDR^{HIR/LIR}$	$\log_2FC^{GnRHa+/-}$	$FDR^{GnRHa+/-}$
<i>ARID4B</i>	+0,18	0,041	-0,63	0,008
<i>ARID5B</i>	+0,35	0,004	-0,49	0,003
<i>BPTF</i>	+0,19	0,055	-0,61	0,01
<i>CHD6</i>	+0,21	0,040	-0,54	0,03
<i>KDM6A</i>	+0,20	0,017	-0,81	0,0009
<i>MBD2</i>	+0,23	0,029	-0,68	0,004
<i>SETD7</i>	+0,22	0,042	-0,85	0,0006

Santrumpos: HIR – didelės nevaisingumo rizikos pogrupio mėginiai; LIR – mažos nevaisingumo rizikos pogrupio mėginiai; GnRHa – gonadotropinus atpalaiduojančio hormono analogas; „-“ – 2HIR pogrupio mėginiai prieš hormoninį gydymą, „+“ – po hormoninio gydymo; \log_2FC – absoliutaus raiškos pokyčio kartais binarinis logaritmas; FDR – kriterijaus reikšmingumo lygmuo.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Sėklidžių biopsijos atlikimo technika tobulinta dešimtmečiais, tačiau iki šiol dažnai diskutuojama apie galimą sėklidės pažeidimą jos metu. Atlikti tyrimai nustatė, kad sėklidės biopsijos paėmimas prepubertatiniu laikotarpiu nepažeidžia besivystančios lytinės liaukos, o atvirksčiai – gali būti naudinga nustatant didelio nevaisingumo riziką ir aptinkant GCNIS (141, 142).

Imtis yra svarbi tyrimo sudedamoji dalis, ypač atliekant duomenų, gautų iš žmogaus audinių ar ląstelių mėginių, analizę. Kalbant apie genų raiškos tyrimus, gautas fragmentų kopijų skaičius paveikia statistinio reikšmingumo lygį. Taip pat mėginiams būdinga įvairovė (angl. *variability*), kuri reikalauja kontrolės ir duomenų suvienodinimo. Tiriant GnRHa poveikį gonocitų į Ad spermatogonijas virsmui bei RNR raiškai, į tyrimą nuosekliai buvo įtraukti 10 ligonių (antra tiriamųjų grupė), kurie kriptorchizmo gydymo variantą (1 – tik chirurginis gydymas; 2 – chirurginis gydymas su gydymu GnRHa) gavo remiantis atsitiktiniu paskirstymu. Todėl sprendimas skirti ar ne adjuvantinį hormoninį gydymą buvo nešališkas ir jo nepaveikė jokie kiti parametrai, išskyrus nenusileidusias sėklides. Nepaisant mažo mėginių skaičiaus, jo pakako nustatyti statistiškai reikšmingus skirtumus. Taip pat mažos imties užteko pradiniam transkriptomo tyrimui. Padidinus tiriamųjų skaičių, rezultatai galimai keistųsi, kadangi kriptorchizmo etiologija yra daugiaveiksmė ir jo sukeliama nevaisingumo mechanizmai nėra nuodugnai iširti. Pastaruoju metu mokslinėje literatūroje kalbama apie HPG ašies ir ją valdančių genų bei genų, dalyvaujančių vystantis lytinėms ląstelėms, svarbą vaisingumui (28–36). Iki šiol atlikti genetiniai tyrimai nustatė daug šiai grupei priklausančių genų, kurių raiška reikšmingai skiriasi, palyginus didelio ir mažo nevaisingumo rizikos grupes. Taip pat buvo aptiktos ir nkRNR su skirtinga raiška nevaisingumo rizikos grupėse (60). Tačiau nėra nustatyta konkretaus vieno ar kelių svarbiausių genų, kurių raiškos sumažėjimas arba išnykimas neginčytinai sukeltų nevaisingumą. Atlikti tyrimai parodė, kad adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa turi teigiamą poveikį genų raiškai, taip pat ir nkRNR. Kalbant apie nkRNR, labai daug tyrimų vykdoma navikų srityje (108, 115, 151, 152, 143–150). Informacijos apie sėklidžių nkRNR yra nedaug ir ji irgi daugiau susijusi su vėžio patologija (153). Todėl, vykdant tolimesnius nkRNR tyrimus ir pasitelkus didesnę imtį, yra tikimybė aptikti kitų nkRNR su skirtinga raiška, lyginant nevaisingumo rizikos grupes. Padidinus tiriamųjų skaičių, galimai būtų nustatyti nauji genai su skirtinga raiška įvairiose nevaisingumo rizikos grupėse bei jų atsakas į skirtingus gydymo metodus (vien chirurginis, chirurginis su adjuvantiniu hormoniniu). Taip pat tikėtina, kad būtų gauta statistiškai reikšmingų genų raiškos skirtumų

arba atvirkščiai – šiuo metu nustatytas reikšmingas geno ekspresijos skirtumas taptų nereikšmingas ($p > 0,05$). Todėl ateityje rekomenduojama atlikti ilgalaikį randomizuotą prospektyvinį tyrimą, kuriame papildomai būtų palyginti spermos mėginiai, ir didesnės apimties tyrimą su skirtingomis adjuvantinio hormoninio gydymo schemomis.

Vertinant nenusileidusių sėklidžių histologijos ir genų raiškos koreliaciją, palyginta diferencinė genų raiška tarp didelio ir mažo nevaisingumo rizikos pogrupių, kurie nustatyti histologiškai (Ad spermatogonijų buvimas / nebuvimas) (34). Toks koreliacijos nustatymas / interpretavimas turi trūkumų, kadangi buvo vertinta tik transkriptų raiška, bet nebuvo nustatoma jų koduojamų baltymų ekspresija tiriamųjų sėklidžių biopsijose, t. y. nevertinta, kuriose ląstelėse ar intersticiniame audinyje ji vyksta. Remiantis kitais ankstesniais tyrimais, kai kartu atlikta sėklidžių biopsijų imunohistochemija, galima suformuluoti tvirtą hipotezę, kad transkriptų ir jų koduojamų baltymų raiška sėklidėse turi tiesioginę koreliaciją (30, 31). Nustatyta sumažėjusi *PIWILA*, *GTSF1*, *PRDM9*, *EGR4* raiška HIR grupėje, palyginus su LIR, atspindi ir atliktoje imunohistochemijoje: HIR tiriamųjų sėklidžių preparatuose nustatyta silpnesnė šių genų koduojamų baltymų ekspresija būtent germinacinėse ląstelėse (29, 33, 36). Norint patvirtinti hipotezes, būtini tolimesni tyrimai, tačiau sunku tikėtis rimtesnių išvadų vien iš sekoskaitos, neturint aiškios histologijos ir tiriamųjų ląstelių identifikavimo.

4.1. GnRHa atkuria vyrų vaisingumo potencialą

Atliktas tyrimas parodė, kad GnRHa padidino germinacinių ląstelių kiekį nenusileidusiose sėklidėse bei sužadino gonocitų virsmą į Ad spermatogonijas – spermatogenezės kamienines ląsteles. Tai reiškia, kad skirtas adjuvantinis hormoninis gydymas pakankamai stimuliuo HPG ašį, kad sužadintų Ad spermatogonijų vystymąsi. Gauti rezultatai sutampa su anksčiau literatūroje pateiktais stebėjimais ir pritaria hipotezei, kad GnRHa gali padidinti testosterono koncentraciją kraujyje ir išgelbėti fiziologinę mažojo lytinio brendimo funkciją (40, 44). Anksčiau atliktas tyrimas parodė, kad 86 % ligonių su didele nevaisingumo rizika (be Ad spermatogonijų sėklidžių biopsijose) po taikyto gydymo LHRHa buvo nustatytas normalus spermatozoidų skaičius (52). Toks rezultatas reiškia, kad hormoninio gydymo poveikis išliko iki lytinio subrendimo. Atlikus kitus tyrimus, buvo paskelbti rezultatai, kad germinacinių ląstelių proliferaciją taip pat skatina natyvinis LHRH (51, 53) ir nafarelinas (55). Viename tyrime nustatyta, kad gydymas nafarelinu padidino bendrą germinacinių ląstelių skaičių 75 % nenusileidusių sėklidžių ir 83 % kontralateralinėse nusileidusiose sėklidėse (55). Biers ir

Malone atliko publikuotų studijų, skirtų hormoninio kriptorchizmo gydymo įtakai vaisingumui, analizę ir priėjo prie išvados, kad adjuvantinis gydymas GnRH yra saugus ir veiksmingas, ypač berniukams su abipus nenusileidusiomis sėklidėmis (63). Atliktas prospektyvinis randomizuotas tyrimas patvirtino mokslininkų padarytas išvadas.

Europos urologų asociacijos ir Europos vaikų urologų asociacijos gairėse rekomenduojama taikyti adjuvantinį hormoninį gydymą tik berniukams su abipus nenusileidusiomis sėklidėmis (24, https://uroweb.org/guideline/paediatric-urology/#3_2). Gauti tyrimo rezultatai patvirtina šį pasiūlymą. Įrodymai yra pakankamai stiprūs, kad būtų galima rekomenduoti pakeisti iki šiol nusistovėjusią kriptorchizmo gydymo taktiką (vien chirurginį gydymą) (21), siekiant sumažinti vyrų nevaisingumo rodiklius, nulemtus nenusileidusių sėklidžių.

4.2. GnRHa padidina genų, dalyvaujančių centrinės nervų sistemos vystymesi ir LH sekrecijoje, raišką

Nustatyta, kad adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa padidino genų, dalyvaujančių centrinės nervų sistemos, taip pat ir hipofizės, vystymesi bei LH sekrecijoje. GnRHa padidino ne tik genų, kurių raiška HIR pogrupyje buvo mažesnė, palyginti su LIR pogrupiu, raišką, bet ir tų, kurių raiška pogrupiuose nesiskyrė (3 priedas, 1P lentelė) (61).

Literatūroje pateikiama prielaida, kad *FOXG1* (angl. *forkhead box G1*) dalyvauja neuronų, sekretuojančių GnRH, vystymesi (154, 155) panašiai kaip *DLX3* (angl. *distal-less homeobox 3*), kuris yra gonadotropinus atpalaiduojančio hormono receptoriaus (*GnRHR*) ir α glikoproteino subvieneto (*α GSU*) genų transkripcijos aktyvatorius (156). Be to, GnRHa padidino *ISL2* (angl. *ISL LIM homeobox 2*) ir *OTX2* (angl. *orthodenticle homeobox 2*) genų raišką (61). *ISL2* – tai genas, dalyvaujantis nervinių kamieninių ląstelių diferenciacijoje ir jų specifinių žymenų (angl. *lineage-specific markers*) susiformavimo procese (157, 158). *LHX4* (angl. *LIM homeobox 4*), kurio raiška po hormoninio gydymo irgi padidėjo (61), yra svarbus *ISL2* paralogas. Jis priklauso LIM-homeodėžutės genų šeimai ir atlieka svarbų vaidmenį motorinių neuronų vystymesi (159). *LHX4* koduojamas transkripcijos faktorius dalyvauja ankstyvame hipofizės vystymesi (160). *OTX2*, homeodomeno baltymo, raiška vyksta pelių neuronuose, sekretuojančiuose GnRH. Šių neuronų vystymosi laikotarpiu padidėja *OTX2* raiška ir, atitinkamai, *OTX2* gamyba. Šis baltymas yra atsakingas už GnRH promotoriaus aktyvumo padidėjimą GnRH neuronų ląstelių linijoje bei užtikrina reprodukcinę kompetenciją (161). Hormoninis

gydymas taip pat padidino neuregulino 1 (angl. *neuregulin 1*, *NRG1*) ir *NR4A2* (angl. *nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*) genų raišką (3 priedas, 1P lentelė) (61). Abu genai yra svarbūs neuronų diferenciacijoje ir reguliuojant transkripciją (162).

SRY-dėžutės transkripcijos faktorius 2 (angl. *SRY-box transcription factor 2*, *SOX2*) atlieka svarbų vaidmenį nervinių lastelių prekursorių proliferacijoje ir juos palaikant (163). Žiurkių hipofizėje *SOX2* ekspresuojančiose kamieninėse / pirmtakinėse ląstelėse kartu nuosekliai vyksta *PROPI* (angl. *PROP paired-like homeobox 1*) raiška (164). Buvo nustatyta, kad *SOX2* gali moduluoti *PROPI* raišką. *PROPI* yra hipofizei specifinis transkripcijos faktorius, atliekantis svarbų vaidmenį hipofizės organogenezėje ir hormonus gaminančių ląstelių diferenciacijoje (165). GnRHa padidino abiejų genų, *SOX2* ir *PROPI*, raišką (61). *SOX2* taip pat turi ryšį su PR/SET domeną (angl. *PR/SET domain*, *PRDM*) turinčiais baltymais PRDM14 ir PRDM16. Nustatyta, kad gydymas GnRHa padidino keturių *PRDM* genų raišką: *PRDM7/9/12/16* (3 priedas, 1P lentelė) (61). Prdm14 tarpininkauja įgyjant germinacinių ląstelių pliuripotenciją, iš dalies padidindamas Sox2 raišką (166). Todėl galima kalbėti apie potencialią Prdm14 ir Prdm16 sąsają. Vykstant neurogenezei, PRDM šeimos baltymai dalyvauja nervinės sistemos modeliavime bei neuronų pirmtakų proliferacijos ir diferenciacijos moduliacijoje (167).

EGR4 (angl. *early growth response 4*) – pagrindinis genas (angl. *master gene*), atsakingas už vaisingumo vystymąsi (29). Nustatyta, kad didelio nevaisingumo rizikos grupėje jis nebuvo ekspresuojamas (29), o hormoninis gydymas nepadidino jo raiškos (61). Galima iškelti prielaidą, kad LH sekrecija – tai alternatyvaus kelio per *EGR2* ir *EGR3* kartu su *PROPI*, kurių raiška po gydymo GnRHa padidėjo (61), stimuliacijos rezultatas, kadangi buvo stebėtas LH koncentracijos padidėjimas po 6 mėnesių trukusio hormoninio gydymo (168). Tachikinino prekursoriaus 1 genas (angl. *tachykinin precursor 1*, *TAC1*), dalyvaujantis GnRH impulso generatoriaus valdyme, taigi ir LH sekrecijoje, atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant reprodukciją per neuroendokrininę sistemą (169, 170). Stebėta padidėjusi *TAC1* ir *TAC3* raiška po gydymo GnRHa parodo, kad jų koduojami baltyminiai produktai kartu su *EGR* šeimos nariais ir *PROPI* dalyvauja LH sekrecijos reguliavime (3 priedas, 1P lentelė) (61).

4.3. GnRHa nenusileidusiose sėklidėse sužadina genų, dalyvaujančių testosterono sintezėje

GnRHa poveikis genų, dalyvaujančių testosterono sintezėje, raiškai buvo skirtingas (3 lentelė; 3 priedas, 1P lentelė) (61). Adjuvantinis hormoninis gydymas padidino dviejų genų su nustatyta sumažėjusia raiška HIR pogrupyje ekspresiją: *RGS7* (angl. *regulator of G protein signaling 7*) ir *AKR1B15* (angl. *aldo-keto reductase family 1 member B15*). *RGS7* yra su G baltymu susieto receptoriaus signalo perdavimo kaskadų reguliatorius ir dalyvauja hormonų atpalaidavimo bei endokrinių funkcijų valdyme (171). Jo raiška HIR pogrupyje buvo reikšmingai sumažėjusi ($\log_2FC = -1,6375$; $FDR = 0,00178$) (61), o gydymas GnRHa ją padidino ($\log_2FC = 0,75082$; $FDR = 0,04581$) (61). *AKR1B15* yra naujas aldo-keto reduktazių (AKR) superšeimos narys. Jo baltymas galimai dalyvauja steroidų metabolizmo, mitochondrijų funkcijų reguliavimo ir senėjimo procesuose (172). *AKR1B15*, vienintelio iš AKR superšeimos narių, kurie buvo tirti, raiška HIR pogrupyje buvo sumažėjusi ($\log_2FC = -1,04$; $FDR = 0,05$) (61).

Daugelio tirtų genų raiška reikšmingai nesiskyrė, palyginus HIR ir LIR tiriamųjų pogrupius, tačiau stebėtas teigiamas atsakas į gydymą GnRHa – hormoninis gydymas reikšmingai padidino jų raišką. Tarp jų buvo genai, koduojantys fermentus, dalyvaujantys neklasikiniame testosterono kelyje bei neklasikiniame androgenų signalų perdavimo kelyje. *AKR1D1* (angl. *aldo-keto reductase family 1 member D1*) koduojama 5 β -reduktazė efektyviai katalizuoja progesterono, androstenediono, 17 α -hidroksiprogesterono ir testosterono redukciją iki 5 β -redukuotų metabolitų (173). Stebėtas *HSD3B1* (angl. *hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1*) raiškos padidėjimas po gydymo GnRHa (3 lentelė) (61) rodo padidėjusią testosterono sintezę: GnRHa stimuliuoja LH sekreciją, kuri savo ruožtu stimuliuoja Leydig ląsteles ir jos išskiria testosteroną bei jose yra stebima padidėjusi steroidogeninio fermento 3 β -hidroksisteroidehidrogenazės 1 (*HSD3B*) raiška (174). 2 tipo 17 β -hidroksisteroidehidrogenazė (17 β -HSD) vienodai efektyviai katalizuoja androgenų ir estrogenų oksidaciją. Jos aktyvumą skatina padidėjusi *HSD17B2* (angl. *hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 2*) raiška. O *CYP19A1* (angl. *cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1*) koduoja CYP19A1 aromatazė, katalizuojančią androgenų aromatizaciją į estrogenus. *GPRC6A* (angl. *G protein-coupled receptor class C group 6 member A*) dalyvauja neklasikiniame testosterono kelyje. Jo koduojamas baltymas GPRC6A – tai su G baltymu susietas receptoriaus, kuris prijungia amino rūgštis, kalcį ir osteokalciną, bei perduoda negenominį androgenų poveikį (175, 176). Nors *GPRC6A* raiška reikšmingai

nesiskyrė tarp HIR ir LIR pogrupių, GnRH α ją reikšmingai padidino ($\log_2FC = 1,90743$, $FDR = 0,0034$) (61). Fibroblastų augimo faktoriaus 23 (angl. *fibroblast growth factor 23*, *FGF23*) genas dalyvauja neklasikiniame androgenų signalų perdavimo kelyje, o jo fiziologinis poveikis apsiriboja organais (pvz., hipofizė), kurie kartu ekspresuoja FGRR/ α -Klotho kompleksus (176, 177). Adjuvantinis hormoninis gydymas padidino *FGF23* raišką ($\log_2FC = 2,68731$, $FDR = 0,00009$) (61).

Apibendrinant galima teigti, kad GnRH α stimuliuoja genus, dalyvaujančius testosterono sintezės ir metabolizmo bei signalo perdavimo procesuose. Kai kurie iš jų dalyvauja neklasikiniuose keliuose (*FGF23*) ir regenominiame testosterono poveikyje (*GPRC6A*).

4.4. GnRH α nenusileidusiose sėklidėse sužadina alternatyvius kelius ir genų šeimas

Palyginus genų raiškos skirtumus tarp pirmos ir antros tiriamųjų grupių, buvo nustatyta, kad daugelyje atvejų GnRH α padidindavo genų, kurių raiška HIR pogrupyje, palyginti su LIR pogrupiu, buvo sumažėjusi, raišką. Duomenų analizė parodė, kad hormoninis gydymas taip pat sužadindavo alternatyvius kelius, visus genų šeimų rinkinius ar jų homologus (61).

Kaulų morfogenetiniai baltymai (angl. *bone morphogenetic protein*, BMP) priklauso transformuojančių augimo faktorių β (angl. *transforming growth factor β* , TGF- β) šeimai. BMP atlieka svarbų vaidmenį daugelyje procesų vystantis embrionui ir palaikant suaugusiųjų homeostazę, reguliuodami ląstelių linijų vystymąsi, morfogenezę, įvairių ląstelių diferenciaciją, proliferaciją ir apoptozę. Taip pat BMP perduodami signalai yra reikšmingi palaikant pliuripotentių kamieninių ląstelių kiekį bei dalyvauja jų diferenciacijoje (178, 179). Remiantis literatūroje pateiktais įrodymais, iškelta prielaida, kad BMP signalai išskirtinai reikšmingi vystantis ir progresuojant vėžiui –moduliuoja vėžines ląsteles ir naviko mikroaplinką. Priklausomai nuo konteksto, BMP gali veikti tiek kaip vėžio supresoriai, tiek kaip promotoriai (180). HIR pogrupyje rasta sumažėjusi *BMP6*, *BMP7* ir *BMP8A* raiška, kuri po gydymo GnRH α nepakito. Tačiau po hormoninio gydymo 2–4 kartus padidėjo kitų – *BMP3*, *BMP5* ir *BMP10* – raiška (3 priedas, 1P lentelė) (61).

Panašių pakitimų aptikta chemokinių ligandų ir receptorių šeimose (CXCL, CXCR). Chemokinai atlieka svarbų vaidmenį vystymosi, homeostazės, imuniniuose ir uždegiminiuose procesuose, taisant / atkuriant audinius, įgimtame ir įgytame imunitete (181). Taip pat nustatyta, kad chemokinai dalyvauja angiogenezeje ir yra ekspresuojami centrinėje nervų sistemoje,

kurioje galimai dalyvauja uždegimo procesuose bei vystantis neurodegeneracinėms ligoms (182, 183).

CXCL9 ir *CXCR4* raiška HIR pogrupyje buvo sumažėjusi, palyginti su LIR pogrupiu, o GnRHa nepadidino jų raiškos (3 priedas, 1P lentelė) (61). Tačiau hormoninis gydymas padidino kitų – *CXCL3/5/6/8/11/13* ir *CXCR1/2/5/6* – raišką, kuri nesiskyrė tarp HIR ir LIR pogrupių (3 priedas, 1P lentelė) (61). Remiantis gautais rezultatais, galima išskirti prielaidą, kad *CXCL* ir *CXCR* dalyvauja Ad spermatogonijų diferenciacijoje.

Kai kuriais atvejais hormoninis gydymas padidino ne tik HIR pogrupyje aptiktų genų su sumažėjusia raiška ekspresiją, bet ir jų šeimos narių, kurių raiška, palyginus HIR ir LIR pogrupius, nesiskyrė, ekspresiją. *DLX* (angl. *distal-less homeobox*) šeimoje *DLX1* raiška nesiskyrė, palyginus HIR ir LIR pogrupius, o *DLX3* ir *DLX6* – skyrėsi: HIR pogrupyje ji buvo mažesnė (atitinkamai: $\log_2FC = -2,07726$, $FDR = 0,00661$ ir $\log_2FC = -2,19564$, $FDR = 0,00030$) (61). GnRHa padidino visų trijų narių raišką (atitinkamai: $\log_2FC = 1,40060$, $FDR = 0,01565$; $\log_2FC = 1,43846$, $FDR = 0,01841$ ir $\log_2FC = 1,10459$, $FDR = 0,04308$) (61). Tokio pobūdžio genų raiškos pakitimai taip pat stebėti *EGR* šeimoje (*EGR2* ir *EGR3*), *OTX* šeimoje (*OTX1* ir *OTX2*), tarp POU klasės šeimos narių, PR domeną turinčių genų, *RUNX* šeimoje (*RUNX1* ir *RUNX2*), *SIX* šeimoje (*SIX2* ir *SIX3*), *PAX* ir *SOX* šeimose (3 priedas, 1P lentelė) (61).

4.5. nkRNR raiška nenusileidusiose sėklidėse

4.5.1. GnRHa veikia nkRNR, dalyvaujančias X chromosomos inaktyvacijos procese

Palyginus pirmos tiriamųjų grupės mėginius, *TSIX* (*XIST* antiprasminė RNR) raiška tarp HIR ir LIR pogrupių reikšmingai nesiskyrė (4 lentelė) (61). Adjuvantinis hormoninis gydymas padidino šios antiprasminės RNR raišką ($\log_2FC = 2,3162$, $FDR = 0,00018$) (61). Nagrinėjant *XIST* (angl. *X inactive specific transcript*) raišką, aptiktas atvirkštinis variantas – HIR pogrupyje, palyginus su LIR, jos raiška buvo reikšmingai mažesnė ($\log_2FC = -2,17231$, $FDR = 0,00188$) (61), o GnRHa gydymas reikšmingai nepadidino šios nkRNR raiškos. *XIST* ir *TSIX* – tai du su X chromosoma susieti (angl. *X-linked*) ilgi nekoduojantys genai, dalyvaujantys X chromosomos inaktyvacijos procese (angl. *X chromosome inactivation*, *XCI*) (100). Dėl šio proceso žinduolių moteriškos ir vyriškos lyties individų ląstelėse yra vienodas aktyvių genų skaičius.

4.5.2. GnRHa veikia signalų perdavimo kelius

Taikant GnRHa gydymą, padidėjusi LH ir testosterono sekrecija paskatino gonocitų ir nediferencijuotų spermatogonijų virsmą į Ad spermatogonijas. *LINC-ROR* (angl. *long intergenic non-protein coding RNA, regulator of reprogramming*) raiška po gydymo GnRHa padidėjo 6,5 karto (5 lentelė) (60). Ši inkRNR kontroliuoja kamieninių ląstelių atsinaujinimą ir veikia kaip miRNR kempinė (miR-138 ir miR-145) per genų nutildymą (angl. *silencing*) bei aktyvuodama kanoninį ir nekanoninį WNT/ β -katenino signalo perdavimo kelius (184–186). Tai parodo, jog pats transkriptas atlieka biologinį vaidmenį. Nustatyta, kad *mTOR* (angl. *mechanistic target of rapamycin kinase*), esminio spermatogenezės reguliatoriaus (187), raiška HIR pogrupyje yra sumažėjusi ($\log_2FC = -0,42$; FDR = 0,03) (60), palyginti su LIR pogrupiu, ir adjuvantinis hormoninis gydymas jos nepadidina ($\log_2FC = -0,53$; FDR = 0,02) (60). Svarbu, kad padidėjusi *mTOR-AS1* (angl. *mammalian target of rapamycin antisense RNA 1*) raiška po gydymo GnRHa ($\log_2FC = 4,96$; FDR = 0,0001) (60) galėjo slopinti *mTOR* aktyvumą, taip leisdamas spermatogenezės kamieninėms ląstelėms atsinaujinti. Literatūroje kol kas nėra duomenų, kokią funkciją atlieka *MTOR-AS1*.

WNT sąveikauja su *mTOR* perdavimo keliu, kad būtų paveiktas vėžinių ląstelių augimas ir navikų metabolizmas (188) bei spermatozoidų formavimasis (187). Remiantis anksčiau atliktu tyrimu, pateiktas siūlymas, kad *WNT3* (angl. *Wnt family member 3*) yra signalo perdavimo komponentas, reguliuojantis ankstyvą *Brachyury (T)* raišką (189) – mezodermos faktorių, kuris yra žinomas kaip nulemiantis Ad spermatogonijų likimą (60). T – tai klasikinis ir konservatyvus mezodermos faktorius, kuris yra esminis gemalinės ląstelių linijos determinančių *PRDM1* ir *PRDM14* aktyvatorius (190). T tiesiogiai sužadina šiuos genus. Tokiu būdu yra apibrėžiama žemiau nurodoma pirmtakinių germinacinių ląstelių programa. *Bmp4* neturinčiose pelėse-mutantuose (angl. *mutant mice*) *WNT3* sužadinta programa neleidžia T aktyvuoti genų *PRDM1* ir *PRDM14*. Tai parodo, kad pirmtakinių germinacinių ląstelių specifikacijoje *Bmp4* atlieka leidžiančiojo (angl. *permissive*) vaidmenį (190). Nustatyta, kad *DMRTC2*, *PAX7*, *T* ir *TERT* raiška yra sumažėjusi sėklidėse su pažeistu mažuoju lytiniu brendimu ir turi teigiamą atsaką į gydymą GnRHa (35). Taip pat *PRDM9* ir *PRDM14* raiška yra sumažėjusi HIR tiriamųjų pogrupyje, palyginus su LIR pogrupiu, o gydymas GnRHa reikšmingai padidina *PRDM7*, *PRDM9*, *PRDM12* ir *PRDM16* ekspresiją (3 priedas, 1P lentelė) (61). Taigi Ad spermatogonijų specifikacijai, be *BMP4*, gydymas GnRHa sužadina alternatyvų *PRDM9* stimuliacijos kelią, padidindamas *BMP5* raišką ($\log_2FC = 2,31$; FDR = 0,0001) (36, 59).

LINC01121 raiška vyksta virš *SIX2* (angl. *SIX homeobox 2*) ir todėl galimai gali paveikti jo proksimalinius promoterio regionus bei ekspresiją. *SIX2* ir *WNT* reguliuoja nefronų pirmtakų atsinaujinimą ir išsipareigojimą (angl. *commitment*), veikdami per bendrus genų reguliacijos tinklus (191–193). *SIX2* taip pat aktyvuoja *GDNF* (angl. *glial cell derived neurotrophic factor*) raišką bei dalyvauja ląstelių proliferacijoje ir migracijoje. Berniukų su HIR sėklidėse *SIX2* raiška buvo sumažėjusi, palyginti su LIR pogrupiu ($\log_2FC = -1,76$; FDR = 0,0008) (61). Gydytas GnRHa padidino *SIX2* ($\log_2FC = 1,61$; FDR = 0,014) ir *GDNF* ($\log_2FC = 1,46$; FDR = 0,003) raišką (61). Be to, *SIX2* sąveikauja su *TCF7L2* (angl. *transcription factor 7 like 2*) ir *OSR1* (angl. *odd-skipped related transcription factor 1*) kanoniniame WNT signalo perdavimo kelyje ir neleidžia metanefrogeninėje užuomazgoje, sudarytoje iš metanefrinės mezenchimos (angl. *cap mesenchyme*), vykti diferenciacijos genų, tokių kaip *WNT4* (angl. *Wnt family member 4*) transkripcijai (191–193).

Apibendrinant teigtina, kad gauti rezultatai patvirtina idėją, kad *LINC-ROR* ir *mTOR* dalyvauja Ad spermatogonijų vystymesi ir specifikacijoje per WNT signalo perdavimo kelią.

4.5.3. GnRHa veikia epigenetinius faktorius

GnRHa padidino *FENDRR* (angl. *FOXF1 adjacent non-coding developmental regulatory RNA*) raišką ($\log_2FC = 2,05852$, FDR = 0,00007) (61). Remiantis prielaida, kad skirtingai nurašomus genus gali sieti jų atliekamos funkcijos (137, 194), Grote ir kt. (194) iškėlė prielaidą, kad *Fendrr* reguliuoja *Foxa1* (angl. *forkhead box A1*) ir kitų genų raišką, veikdamas per epigenetinius mechanizmus, priklausomus nuo Polikombo (angl. *Polycomb*). *FENDRR* – tai pirma nustatyta inkRNR, kuri yra būtina vykstant žinduolių embriogenezei (137, 138).

LINC00261 raiška vyksta *PAX1* (angl. *paired box 1*) ir *FOXA2* (angl. *forkhead box A2*) genų 3' regionuose, kurie koduoja transkripcijos faktorius. Tai yra centrinė (angl. *hub*) RNR, kuri prijungia mRNR ir inkRNR, įskaitant *HOTAIR* (angl. *HOX transcript antisense RNA*). *LINC00261* stimuliuoja *HOTAIR* ir *HOTTIP* (angl. *HOXA distal transcript antisense RNA*) raišką, kad šios stabilizuotų androgenų receptorių (AR) kartu su *FOXA1* (angl. *forkhead box A1*) (195). *FOXA2* taip pat dalyvauja AR reguliavime (196–198). GnRHa padidino jos raišką ($\log_2FC = 1,69$, FDR = 0,0004) (60). Be to, *LINC00261* yra epigenetiškai reguliuojamas tumoro supresorius, kuris yra esminis aktyvuojant DNR pažaidų reparacijos atsaką (blokuoja ląstelių proliferaciją) (151).

Adjuvantinis hormoninis gydymas taip pat padidino *AIRN* (angl. *antisense of IGF2R non-protein coding RNA*) ($\log_2FC = 2,77998$, $FDR = 0,00158$) ir *HOTAIR* ($\log_2FC = 1,11601$, $FDR = 0,03492$) raišką (61). Šios abi nekoduojančios RNR dalyvauja histonų modifikacijose (139, 140). *Airn* – tai makro nkrNR, kuri yra pagrindinis imprintingo raiškos reguliacijos genas (angl. *master regulator gene*) į insuliną panašaus augimo faktoriaus receptoriaus (angl. *insulin like growth factor 2 receptor*, *Igf2r*) imprintingo geno klasteryje, kuriame ji slopina tris šalia esančius (angl. *flanking*) genus *cis* (199, 200). Be to, *Airn* apsaugo tėvišką imprintingo kontrolės elemento (angl. *imprint control element*, *ICE*) kopiją nuo *de novo* metilinimo (200). *HOTAIR* yra inkRNR, kurios veikla dera su chromatiną modifikuojančiais fermentais. Taip pat ji reguliuoja genų slopinimą. Nustatyta, kad *HOTAIR*, kuri yra nurašoma iš *HOXC* genų klasterio, turi represinį poveikį *HOXD* lokuse, sąveikaudama su Polikombo slopinančiu kompleksu 2 (angl. *Polycomb repressive complex*, *PRC2*) (201, 202).

HOTAIR promotorius turi dauginius funkcinis estrogenų atsako elementus (angl. *estrogen response elements*, *EREs*). *HOTAIR* tarpininkauja sutelkiant H3K27 metiltransferazę ir H3K4 demetilazę. Tai sukelia veiksmingą tam tikrų lokusų represiją. Veikiant estradioliui, *HOTAIR* promotoriaus vietoje padidėja histonų H3 lizino-4 trimetilavimo, acetilavimo ir RNR polimerazės II kiekiai. Estrogenų receptorių išjungimas (angl. *knock-down*) sumažina nuo estradiolio priklausomą *HOTAIR* ekspresiją. Taigi, estradiolio sužadinama antiprasminių RNR transkripcija vyksta tokiu pat būdu, kaip ir baltymus koduojančių genų (203–207). HIR lignonų sėklidėse nustatyta sumažėjusi *HOTAIR* raiška, kurią padidino GnRH α (60). Taigi LH, testosteronas ir / ar konvertuotas estradiolis turi teigiamą poveikį *HOTAIR*, vadinasi, ir Ad spermatogonjų diferenciacijai. Be to, anksčiau buvo nustatyta, kad *HOTAIR* tarpininkauja vystantis vėžiui, pritraukdama *EZH2* (angl. *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*) (149). Tai yra įdomu, kadangi GnRH α indukuoja *HOTAIR* raišką ir sumažina *EZH2* raišką ($\log_2FC = -0,6$; $FDR = 0,01$) (60) bei paveikia *HOTTIP* transkripcijos reguliavimą, kuri savo ruožtu transkripcijos būdu reguliuoja *HOXA* klasterį. Dėl to padidėja *HOXA2* ($\log_2FC = 2,38$; $FDR = 0,007$), *HOXA3* ($\log_2FC = 1,68$; $FDR = 0,007$), *HOXA11* ($\log_2FC = 1,77$; $FDR = 0,02$) ir *HOXA-AS3* ($\log_2FC = 2,68$; $FDR = 0,0001$) raiška (60).

Vaisiaus vystymosi laikotarpiu gama aminobutyrimė rūgštis (GABA) atlieka svarbų vaidmenį, dalyvaudama GnRH neuronų migracijoje iš uoslės plokštelės (angl. *olfactory placode*) į priekines smegenis (208), o genų *DLX3* (angl. *distal-less homeobox 3*) ir *PAX6* (angl. *paired box 6*) koekspresija koreliuoja su uoslės plokštelės likimo apsprendimu (209). Be to, nustatyta,

kad GABA-A receptoriai ir GABA pernešėjas 1 (*GAT1*) dalyvauja Leydig ląstelių proliferacijoje, testosterono gamyboje ir spermatogenezėje (210). *GABRA3* (angl. *gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha3*) ($\log_2FC = -2,49$; FDR = 0,0001) ir *GABR5* ($\log_2FC = -2,59$; FDR = 0,0006) raiška buvo sumažėjusi HIR sėklidėse (60). Po gydymo GnRHa stebėtas *DLX3*, *PAX6* ir *TP63* ($\log_2FC = 0,91$; FDR = 0,002) raiškos padidėjimas (61). *TP63* raiška HIR buvo sumažėjusi ($\log_2FC = -1,58$; FDR = 0,001). Berghoff ir kt. pasiūlė modelį, kuriame *DLX6-AS1* slopina ultrakonservatyvų DNR metilinimo žymenį, esantį *DLX5/6*, taip palengvindama antagonistinę sąveiką tarp slopinančio ir aktyvuojančio transkripcijos faktorių *MECP2* ir *DLX1/2* (209). Nustatyta sumažėjusi *DLX6-AS1* raiška HIR pogrupyje ($\log_2FC = -0,92$; FDR = 0,03) su teigiamu atsaku į gydymą GnRHa ($\log_2FC = 2,02$; FDR = 0,0002) (60). *DLX2*, *DLX3*, *DLX5* ir *DLX6* raiška HIR mėginiuose buvo labai sumažėjusi arba neaptinkama (61). *DLX1/2* praradimas padidina ultrakonservatyvaus *DLX5/6* stiprintuvo vietai-specifinį (angl. *site-specific*) metilinimą (209). *TP63* reguliuoja *DLX5* ir *DLX6* transkripciją. Procesas bent jau dalinai vyksta per cis-veikiantį reguliavimą promotoriaus lygmenyje (211). Šios sąveikos per bendrus DNR reguliavimo elementus leidžia valdyti šalia esančių genų diferenciaciją (212). Taip pat atliekant tyrimus su pelėmis, buvo parodyta, kad *Dlx5* ir *Dlx6* delecijos rezultatas – sumažėjęs testosterono kiekis ir nenormalios maskulinizacijos fenotipo vystymasis, t. y. šie genai dalyvauja steroidogenezės kontrolėje (213).

Apibendrintina, kad berniukams su HIR mažojo lytinio brendimo metu sutrikusi steroidogenezė gali būti dėl paveikto GABRA-A receptoriaus signalo, užslopintos *DLX6* raiškos bei androgenų ir estrogenų receptorių destabilizavimo.

4.5.4. GnRHa veikia genus, susijusius su normaliu ir patologiniu ląstelių dalijimusi

GnRHa padidino LH ir testosterono sekreciją bei *HOTAIR* raišką ($\log_2FC = 1,11601$; FDR = 0,03492) (61) ir, tikriausiai, jos susitelkimą chromatine. O *MALAT1* (angl. *metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*) raiška po hormoninio gydymo sumažėjo ($\log_2FC = -0,6$; FDR = 0,03) (60). Gautas rezultatas leidžia iškelti prielaidą, kad normalaus sėklidės vystymosi metu šios inkRNAR veikia priešingai. *LINC-ROR* skatina kepenų vėžio kamieninių ląstelių augimą, sužadindama atvirkštinės telomerazės transkriptazės (angl. *telomerase reverse transcriptase*, *TERT*) ir protoonkogeno *C-MYC* genus (152). Gydymas GnRHa padidino *TERT* raišką ($\log_2FC = 1,5623$; FDR = 0,0155), kuri HIR pogrupyje buvo sumažėjusi

($\log_2FC = -2,2152$; $FDR = 0,0006$) (35) ir sumažino *C-MYC* signalo perdavimą ($\log_2FC = -0,58$; $FDR = 0,01$) (60).

linkRNR raiškos svyravimai gali būti siejami su vėžio progresavimu. Pavyzdžiui, *LINC00261*, kuri yra reikšminga vystantis skrandžio vėžiui, yra stimuliuojama GnRHa ir veikia kaip tumoro supresorius, slopindama epitelio virsmą į mezenchimą ir taip sumažindama vėžinių ląstelių invaziją (150). Plaučių adenokarcinomoje *LINC00261* blokuoja vėžinių ląstelių proliferaciją, aktyvuodama DNR pažeidimų reparacijos signalo perdavimo kelią (151).

Epidermio augimo faktoriaus receptoriaus antiprasminė RNR 1 (angl. *epidermal growth factor receptor antisense RNA 1, EGFR-AS1*) sąveikauja su neuraminidazės 3, *NEU3*, mRNR. *NEU3* veikla padidina *EGFR* aktyvumą, bet nepaveikia pačios *EGFR* raiškos (214). Toks veikimo būdas galėtų reikšti, jog reguliavimo mechanizmas turi grįžtamąjį ryšį. Suaugusiųjų sėklidėse *EGFR-AS1* raiška yra silpna, o kepenyse ir kepenų navikuose – stipri. Taikant imuninę dažymą nustatyta, kad *EGFR* nusidažymo intensyvumas yra didžiausias tuose sėklidžių mėginiuose, kurie paimti iš vyrų, kurių aukšta FSH koncentracija kraujyje ir mėginiuose, paimtuose iš ligonių, gydytų FSH. Gauti rezultatai palaiko prielaidą apie galimą gonadotropinų vaidmenį moduluojant *EGFR* raišką (215). GnRHa gydymas padidino *EGFR-AS1* raišką ($\log_2FC = 2,99$; $FDR = 2,28E-05$), bet sumažino *EGFR* raišką ($\log_2FC = -0,58$; $FDR = 0,01$) (60). Taip pat *EGFR* signalo perdavimas siejamas su odos plokščialąstelinės karcinomos patogenezė. *LINC00520* veikla, tiksliai nukreipta į jo inhibiciją, gali sukelti PI3K/Akt kelio inaktyvaciją ir tokiu būdu slopinti vėžio vystymąsi (216).

HOTTIP (angl. *HOXA distal transcript antisense RNA*) yra pagrindinis *HOXA* šeimos genų lokuso kontrolės ir distalinės tapatybės (angl. *distal identity*) elementas. *HOTTIP* iinkRNR, sąveikaudama su WDR5-MLL kompleksais, pritraukia H3K4me3 ir taip yra aktyvinama transkripcija 5' *HOXA* lokuse. Tarp *HOTTIP* ir WDR5 yra abipusė tarpusavio priklausomybė, todėl susiformuoja teigiamas grįžtamasis ryšis (angl. *positive feedback loop*), dėl kurio palaikoma aktyvi (angl. „on“) 5' *HOXA* lokuso būseną (217). *HOTTIP* yra antiprasminė *HOXA13* (angl. *homeobox A13*) atžvilgiu ir moduluoja kamieninių vėžinių ląstelių savybes žmogaus kasos navikuose, reguliuodama *HOXA9* (angl. *homeobox A9*) (149, 203).

LINC00221 prijungia mRNR, koduojančią DCBLD2 (angl. *discoidin, CUB and LCCL domain containing 2*). Aiškėjant DCBLD2 vaidmenims, nustatyta, kad jis dalyvauja vystymosi, homeostazės ir vėžiniuose procesuose (218). *DCBLD2* ekspresuojamas vaisiaus ir suaugusiųjų audiniuose, tačiau didžiausia raiška yra aptinkama suaugusiųjų sėklidėse (148). Priklausomai nuo naviko rūšies, jo raiška vėžinėse ląstelėse gali būti tiek padidėjusi, tiek

sumažėjusi, palyginti su sveikaisiais audiniais. Pavyzdžiui, *DCBLD2* raiška sėklidžių germinacinių ląstelių navikuose yra mažesnė ($\log_2(\text{TPM}+1) = 3,17$) negu sveikajame sėklidės audinyje ($\log_2(\text{TPM}+1) = 4,46$) (153). Nustatytas reikšmingas *DCBLD2* raiškos sumažėjimas po GnRHa gydymo ($\log_2\text{FC} = -1,0$; $\text{FDR} = 0,0002$) (60).

LINC01016 priklauso centrinėms (angl. *hub*) RNR. Ši inkRNR yra estrogeno receptoriaus transkripcijos taikiniu (147). Nustatyta, kad ligonių, sergančių krūties vėžiu, ligos išėitis yra geresnė, jeigu navikinėse ląstelėse *LINC01016* ir *LINC00160* raiška yra didesnė. Taigi, remiantis jų raiškos intensyvumu, galima prognozuoti išgyvenamumą ir atrinkti kandidatus hormoninei vėžio terapijai (147). *LINC01016* prijungia daug mRNR, kurios koduoja epigenetinius reguliatorius ir transkripcijos faktorius, bei iinkRNR, įskaitant *XIST*. Savo ruožtu *XIST* dalyvauja daugelyje karcinogenezės procesų: naviko prasidėjimas, invazija, metastazavimas, atsparumo vaistams vystymasis (145). Šios inkRNR poveikis yra dvejopas: ji gali veikti kaip tumoro supresorius (pvz., prostatos, krūties vėžys) arba onkogenas (pvz., plaučių, skrandžio vėžys). Taip pat, pvz., kalbant apie hepatoceliulinę karcinomą, mokslinėje literatūroje yra paskelbta prieštaraujančių tyrimų: vieni skelbia, kad *XIST* dalyvauja kaip tumoro supresorius, kiti – kaip onkogenas (145).

4.5.5. *TINCR* raiška ir jos ryšys su epigenetinių modifikatorių raiška nenusileidusiose sėklidėse

Nustatyta, kad HIR sėklidėse, palyginti su LIR, *TINCR* raiška yra sumažėjusi (4 lentelė: $\log_2\text{FC} = -1,07$; $\text{FDR} = 0,002$), o adjuvantinis gydymas GnRHa reikšmingai jos nepadidina (60). Priešingas epigenetinių modifikatorių, kurie prijungia *TINCR* (131), atvejis: nustatyti septyni, kurių raiška HIR pogrupyje buvo padidėjusi, o po hormoninio gydymo sumažėjo (8 lentelė) (60).

ARID4B (angl. *AT-rich interaction domain 4B*) ir *ARID5B* (angl. *AT-rich interaction domain 5B*) priklauso ARID (angl. *AT-rich interaction domain*) baltymų šeimai. ARID šeimos nariai dalyvauja reguliuojant transkripciją, ląstelių diferenciacijoje ir proliferacijoje bei navikiniuose procesuose (219, 220). Ryški *ARID4B* raiška aptinkama krūtų, plaučių, gaubtinės žarnos, kasos ir kiaušidžių vėžinėse ląstelėse ir sveikų sėklidžių audinyje. Kituose audiniuose šio geno raiška yra ribota (221). *ARID4B* kartu su *ARID4A* dalyvauja spermatogenezėje, kurioje veikia kaip AR transkripcijos koaktyvatorius ir padidina genų, reikalingų spermos brendimui, raišką (222).

BPTF (angl. *bromodomain PHD finger transcription factor*) raiška vyksta daugelyje audinių ir organų. Nustatyta, kad sėklidėse šio geno ekspresija yra viena ryškiausių (223). *BPTF* koduojamas baltymas yra svarbus c-MYC protoonkogeno kofaktorius, būtinas užtikrinti jo biologinį aktyvumą, taip pat ir navikų vystymosi procesuose (224).

CHD6 koduojamas baltymas CHD6 (angl. *chromodomain helicase DNA binding protein 6*) dalyvauja atsake į oksidacinio streso sukeltas DNR pažaidas: skatina antioksidantų ekspresiją ir chromatino tankinimą, kurie kartu moduliuoja DNR pažaidų indukciją ir tvarumą, DNR pažeidimo signalo perdavimą ir ląstelių ciklo kontrolinio taško (angl. *cell cycle checkpoint*) jautrumą, kad būtų galima padėti ląstelėms augti ir jos išliktų veikiamos ūmaus ar lėtinio oksidacinio streso (225). Taip pat CHD6 yra žinomas vėžio vystymosi komponentas, kurio padidėjusi raiška aptinkama navikuose, kylančiuose iš audinių, paveiktų oksidacinio streso (226, 227). CHD6 skatina ląstelių augimą nepalankiomis sąlygomis ir tai paaiškina *CHD6* raiškos padidėjimą navikuose, kurie dažnai būna kilę iš oksidacinio streso paveiktų audinių (225).

KDM6A koduoja fermentą lizino demetilazę 6A (angl. *lysine demethylase 6A*). Šis fermentas yra itin svarbus embrioninių kamieninių ląstelių diferenciacijai, ankstyvam vaisiaus ir specifinių audinių vystymuisi. Taip pat buvo nustatytos *KDM6A* mutacijos daugybės rūšių navikuose. Lizino demetilazės 6A vaidmuo navikiniuose procesuose yra prieštaringas: nepaisant daugelio atliktų tyrimų išvadų, jog šis fermentas yra tumoro supresorius, esama tyrimų, kuriuose keliama prielaida, kad *KDM6A* yra proonkogenas (143).

MBD2 koduoja baltymą MBD2 (angl. *methyl-CpG binding domain protein 2*), kuris prisijungia prie metilintos DNR. MBD2 veikia kaip transkripcijos represorius ir dalyvauja slopinant genus. Jo raiška aptinkama daugelyje organų, tačiau yra ženkliai sumažėjusi embrioninėse kamieninėse ląstelėse (228). MBD2 atliekamos funkcijos nėra iki galo iširtos. Aprašyta, kad jis dalyvauja įvairių ląstelių linijų (pluripotentiųjų, kamieninių ir imuninės sistemos) vystymosi ir diferenciacijos procesuose (229). Padidėjusi *MBD2* raiška skatina navikų vystymąsi (229–231).

SETD7 (angl. *SET domain containing 7, histone lysine methyltransferase*) reguliuoja AR. *SETD7* prijungia TINCR ir gali tarpininkauti formuojant su AR susijusių koaktyvatorių kompleksus (232).

Apibendrinus 4.5.4. ir 4.5.5. skyrius, rezultatai rodo, kad berniukų su HIR ir pažeistu mažuoju lytiniu brendimu nenusileidusios sėklidės ekspresuoja kelis vėžio genus. Gydytas GnRHa gali apsaugoti nuo sėklidžių navikų

vystymosi, slopindamas onkogenų (pvz. *MALAT1*, *C-MYC*) raišką bei leisdamas vykti normaliam germinacinių ląstelių vystymuisi.

4.6. GnRHa sužadina genus, dalyvaujančius ląstelių diferenciacijoje, morfogenezeje ir palaikančius genomo stabilumą

Žemyn nuo *LINC-ROR* yra išsidėstęs *BODIL2* (angl. *biorientation of chromosomes in cell division 1 like 2*) – specifinis sėklidžių genas, kurį transkripcijos būdu gali reguliuoti inkRNR. *BODIL2* dalyvauja chromosomų biorientacijoje mitozinėse verpstėse, aptikdamas arba koreguodamas sintelines jungtis (233, 234). Taikytas hormoninis gydymas padidino *BODIL2* raišką ($\log_2FC = 1,72$; $FDR = 0,003$) (60). Remiantis gautu rezultatu, buvo iškelta prielaida, kad *BODIL2* dalyvauja Ad spermatogonijų diferenciacijoje (60).

LINC00303 raiška vyksta virš *SOX13* (angl. *SRY-box transcription factor 13*), koduojančio *SOX13* vystymosi faktorių, ekspresuojamą pelių Leydig ir germinacinėse ląstelėse (235). Taigi *LINC00303* galimai dalyvauja reguliuojant *SOX13*. Hormoninis gydymas reikšmingai padidino šio geno raišką ($\log_2FC = 2,57$; $FDR = 0,0008$) (60).

LINC00221 ir *LINC00701*, kurių raiška HIR tiriamųjų pogrupyje buvo sumažėjusi, o gydymas GnRHa ją paskatino, dalyvauja ląstelių apykaitos procesuose. *LINC00221* sąveikauja su *VPS53* (angl. *VPS53 subunit of GARP complex*) mRNR, kurios koduojamas baltymas yra GARP komplekso (angl. *Golgi-associated retrograde protein complex*) komponentas. GARP kompleksas dalyvauja retrogradiniame transportavime nuo ankstyvų ir vėlyvų endosomų iki trans-Goldžio tinklo (236). Sėklidėse *LINC00701* raiška yra specifiška ir priklauso nuo vystymosi stadijos bei yra susijusi su *SLC25A37* (angl. *solute carrier family 25 member 37*). *SLC25A37* koduoja tirpujį pernešėją, kuris yra vidinėje mitochondrijos membranoje. Koduojamas baltymas veikia kaip esminis geležies, būtinos mitochondrinio hemo sintezei ir geležies-sieros junginiams susidaryti, pernešėjas (237).

LINC00922 raiška vyksta virš 5 (*CDH5*) ir 11 (*CDH11*) kadherinų genų. *CDH11* koduoja nuo kalcio priklausomą ląstelių sukibimo baltymą, kuris galimai dalyvauja formuojant sėklidžių architektūrą (238, 239). Kadherinai taip pat yra itin svarbūs embriono vystymosi laikotarpiu vykstant centrinės nervų sistemos morfogenezei. Jie dalyvauja neuronų diferenciacijoje ir sinaptogenezeje – procesuose, kurie, tikėtina, yra psichinių ligų vystymosi pagrindas (239). Taip pat nustatyta, kad *LINC00922* raiška yra padidėjusi plaučių vėžinėse ląstelėse. Ji paspartina plaučių vėžinių ląstelių dauginimąsi, migraciją ir invaziją, veikdama per miRNA-204/CXCR4 ašį kaip

konkuruojanti endogeninė RNR (angl. *competing endogenous RNA*, *ceRNA*) ir padidindama *CXCR4* (angl. *C-X-C motif chemokine receptor 4*) raišką (144). Padidėjusi *CXCR4* raiška taip pat aptinkama sėklidžių germinacinių ląstelių navikuose (240).

LINC01249 ekspresuojama virš *SOX11* (angl. *SRY-box transcription factor 11*), kuris yra svarbus embriono neurogenezei ir audinių formavimuisi. Vaisiaus ir naujagimio audiniuose *SOX11* raiška yra intensyvi ir ilgainiui mažėja arba visai išnyksta. Pavyzdžiui, vaisiaus ir naujagimio smegenų, inkstų audiniuose jo raiška yra ryški, suaugusiųjų – labai sumažėjusi, o sėklidėse visai išnyksta (241, 242). Nustatyta, kad *SOX11* raiška, palyginti HIR ir LIR pogrupius, nesiskiria, tačiau adjuvantinis gydymas GnRHa jo raišką padidina ($\log_2FC = 0,75$; $FDR = 0,006$) (61). Galvojama, kad vaisiaus sėklidėse *SOX11* kartu su *SOX4* galimai veikia kaip transkripcijos represorius ir taip prisideda prie tikslaus *SRY* ir *SOX9* reguliavimo (235).

OTX2-AS1 yra natūrali antiprasminė transkripcijos (angl. *natural antisense transcript*, NAT) RNR, kuri reikšminga akies vystymuisi. Pelių ir žmonių *OTX2-AS1* yra komplementari prasmnio geno *OTX2* (angl. *orthodenticle homeobox 2*) egzono sekai (243). Daugiausia *OTX2-AS1* ekspresuojama tinklainėje. Mažesnė jos raiška nustatyta smegenyse (243). HIR tiriamųjų pogrupyje *OTX2* raiška yra sumažėjusi ($\log_2FC = -1,74$; $FDR = 0,03$) (61), palyginti su LIR tiriamųjų pogrupio mėginiais, o adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa ją padidina ($\log_2FC = 1,24$; $FDR = 0,04$) (61). Nors nėra nustatyta, kokią funkciją *OTX2-AS1* atlieka, jos prasmnio geno *OTX1* delecija buvo aptikta šešiams ligoniams, kuriems nustatyti urogenitalinės sistemos defektai, trims iš jų buvo diagnozuotas kriptorchizmas (244). NAT yra biologiškai svarbūs endogeninės mažos interferencinės RNR (angl. *endogenous small interfering RNA*, *endo-siRNA*) ištekčiai. Taip pat tai yra esminiai komponentai, įeinantys į reguliavimo tinklą, būtini kontroliuoti mutageninę naštą, kylančią nukleino rūgščių lygmenyje, nesukeliant tiesioginių padarinių baltymų raiškai (245).

LINC00293 raiška vyksta virš *SPIDR* (angl. *scaffold protein involved in DNA repair*), kuris dalyvauja taisant dvigrandžius lūžius ir palaikant genomo vientisumą bei jungiasi prie dviejų TTTY tipo sėklidėms-specifinių inkRNR. Kelių inkRNR, dalyvaujančių taisant DNR, raiška po hormoninio gydymo padidėjo: *LINC00994* (ekspresuojama virš *PSMD6*), *LINC00898* (prijungia mRNR koduojantį *USP1*). Taip pat padidėjo *LINC01553*, kuri yra sėklidėms specifiška, raiška. Ji sąveikauja su mRNR, kuri koduoja *TIMELESS* (angl. *timeless circadian regulator*). *TIMELESS* yra svarbus DNR replikacijos kontrolei, genomo stabilumo palaikymui ir cirkadinio laikrodžio (angl. *circadian clock*) reguliavimui (246, 247).

Atliktas tyrimas yra pirmasis prospektyvinis randomizuotas, kuriuo patvirtintas teigiamas GnRHa gydymo poveikis, ištaisant sutrikusią gonocitų virsmą į Ad spermatogonijas, taip atkuriant vaisingumo potencialą. Atlikta RNR raiškos analizė nenuseidusiose sėklidėse parodė, kad gydymas GnRHa sužadina transkripcijos atsaką, kuriame dalyvauja genai, valdantys HPG ašį, reprodukciją bei testosterono sintezę per klasikinius ir alternatyvius kelius. Be to, nustatyta nkRNR raiška, kurios dalyvauja epigenetiniame programavime ir turi atsaką į hormoninį gydymą. Priešingai, vien chirurginis kriptorchizmo gydymas neturėjo įtakos genų raiškai. Tai pabrėžia gydymo GnRHa svarbą, atkuriant vyrų vaisingumo potencialą. Genų raiškos tyrimai žmogaus sėklidėse yra sudėtingi, nes vyriška lytinė liauka susideda iš įvairiose meiotinio vystymosi stadijose esančių germinacinių ląstelių bei palaikomųjų ląstelių (angl. *nurse cells*), aprūpinančių hormonais ir maistingomis medžiagomis, būtinomis vykti normaliai spermatogenezei. Nepaisant kliūčių, atlikti genetiniai tyrimai parodė, kad sėklidžių genų raiškos tyrimai yra informatyvūs (29, 31, 34, 56, 58, 59). Pateikti rezultatai suteikia informacijos tolimesnei funkicinei nkRNR analizei nevaisingumo išsivystymo srityje (60).

IŠVADOS

1. Adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa skatina gonocitų virsmą į Ad spermatogonijas.
2. Diferencinė genų raiškos analizė nenusileidusiose sėklidėse skiriasi, palyginus didelio ir mažo nevaisingumo rizikos grupes: daugelio atvejų genų raiška HIR grupėje yra sumažėjusi.
3. Adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa stimuliuoja genų su sumažėjusia raiška HIR sėklidėse, palyginti su LIR, dalyvaujančių HPG ašies hormoniniame valdyme bei vaisingume, raišką, veikia lokusus, dalyvaujančius kanoniniuose ir alternatyviuose testosterono gamybos keliuose. Taip pat GnRHa turi teigiamą poveikį genų, kurių raiška HIR ir LIR pogrupiuose nesiskiria, ekspresijai – dalis jų yra sužadinama.
4. Nustatytos nekoduojančios RNR atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant spermatogenezę, veikdamos ankstyvose spermatogonijų kamieninių ląstelių vystymosi stadijose. Jų raiška reikšmingai skiriasi, palyginus didelio ir mažo nevaisingumo rizikos grupes: HIR ji yra sumažėjusi. NkRNR reaguoja į GnRHa stimuliaciją – jų ekspresija reikšmingai padidėja.

REKOMENDACIJOS

1. Sergant kriptorchizmu, tikslingas histologinis nevaisingumo rizikos įvertinimas: atliekant orchiopeksiją, paimti sėklidės biopsiją ir įvertinti Ad spermatogonijų kiekį, TFI.
2. Nustačius didelę nevaisingumo riziką (Ad spermatogonijų nebuvimą sėklidės biopsijoje), rekomenduojamas adjuvantinis hormoninis gydymas GnRHa.
3. Tolimesnių prospektyvinių tyrimų vykdymas, skiriant gydymą GnRH berniukams su kriptorchizmu mažojo lytinio brendimo laikotarpiu iki operacijos, ir sėklidžių biopsijų sekoskaitos bei imunohistocheminių tyrimų vykdymas, siekiant patvirtinti hipotezes.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Preikša RT, Žilaitiene B, Matulevičius V, Skakkebak NE, Petersen JH, Jørgensen N, et al. Higher than expected prevalence of congenital cryptorchidism in Lithuania: A study of 1204 boys at birth and 1 year follow-up. *Hum Reprod.* 2005;20(7):1928–32.
2. Sijstermans K, Hack WWM, Meijer RW, van der Voort-Doedens LM. The frequency of undescended testis from birth to adulthood: A review. *Int J Androl.* 2008;31(1):1–11.
3. Cortes D, Kjellberg EM, Breddam M, Thorup J. The True Incidence of Cryptorchidism in Denmark. *J Urol.* 2008;179(1):314–8.
4. Bergbrant S, Omling E, Björk J, Hagander L. Cryptorchidism in Sweden: A Nationwide Study of Prevalence, Operative Management, and Complications. *J Pediatr.* 2018;194:197–203.
5. Thorup J, McLachlan R, Cortes D, Nation TR, Balic A, Southwell BR, et al. What is new in cryptorchidism and hypospadias—a critical review on the testicular dysgenesis hypothesis. *J Pediatr Surg.* 2010;45(10):2074–86.
6. Rodprasert W, Virtanen HE, Mäkelä JA, Toppari J. Hypogonadism and Cryptorchidism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;10:1–27.
7. Urh K, Kolenc Ž, Hrovat M, Svet L, Dovč P, Kunej T. Molecular Mechanisms of Syndromic Cryptorchidism: Data Synthesis of 50 Studies and Visualization of Gene-Disease Network. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:1–11.
8. Thonneau PF, Gandia P, Mieusset R. Cryptorchidism: Incidence, Risk Factors, and Potential Role of Environment; An Update. *J Androl.* 2003;24(2):155–62.
9. Barthold JS, Reinhardt S, Thorup J. Genetic, Maternal, and Environmental Risk Factors for Cryptorchidism: An Update. *Eur J Pediatr Surg.* 2016;26(5):399–408.
10. Kjersgaard C, Arendt LH, Ernst A, Lindhard MS, Olsen J, Henriksen TB, et al. Lifestyle in pregnancy and cryptorchidism in sons: a study within two large Danish birth cohorts. *Clin Epidemiol.* 2018;10:311–22.
11. Hadziselimovic F, Hoecht B. Testicular histology related to fertility outcome and postpubertal hormone status in cryptorchidism. *Klin Padiatr.* 2008;220(5):302–7.
12. Job JC, Toublanc JE, Chaussain JL, Gendrel D, Roger M, Canlorbe P. The pituitary-gonadal axis in cryptorchid infants and children. *Eur J Pediatr.* 1987;146(2):S2–5.
13. Hamza AF, Elrahim M, Elnagar, Maaty SA, Bassiouny E, Jehannin B. Testicular descent: when to interfere? *Eur J Pediatr Surg.* 2001;11(3):173–6.
14. Huff DS, Fenig DM, Canning DA, Carr MC, Zderic SA, Snyder IIIHM. Abnormal Germ Cell Development in Cryptorchidism. *Horm*

- Res Paediatr. 2001;55:11–7.
15. Gracia J, Sánchez Zalabardo J, Sánchez García J, García C, Ferrández A. Clinical, physical, sperm and hormonal data in 251 adults operated on for cryptorchidism in childhood. *BJU Int.* 2000;85(9):1100–3.
 16. Walsh TJ, Dall’Era MA, Croughan MS, Carroll PR, Turek PJ. Prepubertal Orchiopexy for Cryptorchidism May be Associated With Lower Risk of Testicular Cancer. *J Urol.* 2007;178(4):1440–6.
 17. Trsinar B, Muravec UR. Fertility potential after unilateral and bilateral orchidopexy for cryptorchidism. *World J Urol.* 2009;27(4):513–9.
 18. van Brakel J, Kranse R, de Muinck Keizer-Schrama SMPF, Hendriks AEJ, de Jong FH, Bangma CH, et al. Fertility potential in men with a history of congenital undescended testes: a long-term follow-up study. *Andrology.* 2013;1(1):100–8.
 19. Petterson A, Richiardi L, Nordenskjold A, Kaijser M, Akre O. Age at Surgery for Undescended Testis and Risk of Testicular Cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(18):1835–41.
 20. Fedder J, Crüger D, Oestergaard B, Bruun Petersen G. Etiology of azoospermia in 100 consecutive nonvasectomized men. *Fertil Steril.* 2004;82(5):1463–5.
 21. Ritzén EM, Bergh A, Bjerknes R, Christiansen P, Cortes D, Haugen SE, et al. Nordic consensus on treatment of undescended testes. *Acta Paediatr.* 2007;96(5):638–43.
 22. Kolon TF, Herndon CDA, Baker LA, Baskin LS, Baxter CG, Cheng EY, et al. Evaluation and treatment of Cryptorchidism: AUA guideline. *J Urol.* 2014;192(2):337–45.
 23. Radmayr C, Dogan HS, Hoebcke P, Kocvara R, Nijman R, Stein R, et al. Management of undescended testes: European Association of Urology/European Society for Paediatric Urology Guidelines. *J Pediatr Urol.* 2016;12(6):335–43.
 24. Lee PA. Fertility after cryptorchidism: Epidemiology and other outcome studies. *Urology.* 2005;66(2):427–31.
 25. Hadziselimovic F, Herzog B. The importance of both an early orchidopexy and germ cell maturation for fertility. *Lancet.* 2001;358(9288):1156–7.
 26. Hadziselimovic F. Early successful orchidopexy does not prevent from developing azoospermia. *Int Braz J Urol.* 2006;32(5):570–3.
 27. Adomaitis R, Vincel B, Eidukaite A, Ostanaviciute E, Kirka R, Bilius V, et al. Consequences of bilateral cryptorchidism in adults. *Andrologia.* 2016;48(9):933–8.
 28. Ferlin A, Zuccarello D, Garolla A, Selice R, Foresta C. Hormonal and genetic control of testicular descent. *Reprod Biomed Online.* 2007;15(6):659–65.
 29. Hadziselimovic F, Hadziselimovic NO, Demougin P, Krey G, Hoecht B, Oakeley EJ. EGR4 is a master gene responsible for fertility in cryptorchidism. *Sex Dev.* 2009;3(5):253–63.

30. Hadziselimovic NO, De Geyter C, Demougin P, Oakeley EJ, Hadziselimovic F. Decreased expression of FGFR1, SOS1, RAF1 genes in cryptorchidism. *Urol Int.* 2010;84(3):353–61.
31. Hadziselimovic F, Hadziselimovic NO, Demougin P, Oakeley EJ. Testicular gene expression in cryptorchid boys at risk of azoospermia. *Sex Dev.* 2011;5(2):49–59.
32. Docampo MJ, Hadziselimovic F. Molecular pathology of cryptorchidism-induced infertility. *Sex Dev.* 2015;9(5):269–78.
33. Hadziselimovic F, Hadziselimovic NO, Demougin P, Krey G, Oakeley E. Piwi-pathway alteration induces LINE-1 transposon derepression and infertility development in cryptorchidism. *Sex Dev.* 2015;9(2):98–104.
34. Hadziselimovic F, Gegenschatz-Schmid K, Verkauskas G, Docampo-Garcia MJ, Demougin P, Bilius V, et al. Gene expression changes underlying idiopathic central hypogonadism in cryptorchidism with defective mini-puberty. *Sex Dev.* 2016;10(3):136–46.
35. Gegenschatz-Schmid K, Verkauskas G, Demougin P, Bilius V, Dasevicius D, Stadler MB, et al. DMRTC2, PAX7, BRACHYURY/t and tert are implicated in male germ cell development following curative hormone treatment for cryptorchidism-induced infertility. *Genes (Basel).* 2017;8(10):1–16.
36. Hadziselimovic F, Cathomas G, Verkauskas G, Dasevicius D, Stadler MB. PRDM histone methyltransferase mRNA levels increase in response to curative hormone treatment for cryptorchidism-dependent male infertility. *Genes (Basel).* 2018;9(8).
37. Forest MG, Sizonenko PC, Cathiard AM, Bertrand J. Hypophyso gonadal function in humans during the first year of life. I. Evidence for testicular activity in early infancy. *J Clin Invest.* 1974;53(3):819–28.
38. Winter JSD, Hughes IA, Reyes FI, Faiman C. Pituitary-Gonadal Relations in Infancy: 2. Patterns of Serum Gonadal Steroid Concentrations in Man from Birth to Two Years of Age. *J Clin Endocrinol Metab.* 1976;42(4):679–86.
39. Forest MG, Cathiard AM, Bertrand JA. Evidence of testicular activity in early infancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1973;37(1):148–51.
40. Hadziselimovic F, Zivkovic D, Bica DTG, Emmons LR, Diamond DA, Kogan SJ, et al. The importance of mini-puberty for fertility in cryptorchidism. *J Urol.* 2005;174(4 II):1536–9.
41. Gendrel D, Roger M, Chaussain JL, Canlorbe P, Job JC. Correlation of pituitary and testicular responses to stimulation tests in cryptorchid children. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1977;86(3):641–650.
42. Baker BA, Morley R, Lucas A. Plasma testosterone in preterm infants with cryptorchidism. *Arch Dis Child.* 1988;63(10):1198–200.
43. Raivio T, Toppari J, Kaleva M, Virtanen H, Haavisto AM, Dunkel L, et al. Serum androgen bioactivity in cryptorchid and noncryptorchid boys during the postnatal reproductive hormone surge. *J Clin*

- Endocrinol Metab. 2003;88(6):2597–9.
44. Zivkovic D, Bica DTG, Hadziselimovic F. Relationship between adult dark spermatogonia and secretory capacity of Leydig cells in cryptorchidism. *BJU Int.* 2007;100(5):1147–9.
 45. Cortes D, Thorup JM, Visfeldt J. Cryptorchidism: aspects of fertility and neoplasms. A study including data of 1,335 consecutive boys who underwent testicular biopsy simultaneously with surgery for cryptorchidism. *Horm Res.* 2001;55(1):21–7.
 46. Hadziselimovic F, Höcht B, Herzog B, Buser MW. Infertility in Cryptorchidism Is Linked to the Stage of Germ Cell Development at Orchidopexy. *Horm Res Paediatr.* 2007;68(1):46–52.
 47. Thorup J, Kvist K, Clasen-Linde E, Petersen BL, Cortes D. The relation between adult dark spermatogonia and other parameters of fertility potential in cryptorchid testes. *J Urol.* 2013;190(4):1566–71.
 48. Verkauskas G, Malcius D, Dasevicius D, Hadziselimovic F. Histopathology of Unilateral Cryptorchidism. *Pediatr Dev Pathol.* 2019;22(1):53–8.
 49. Bica DTG, Hadziselimovic F. Buserelin treatment of cryptorchidism: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Urol.* 1992;148(2 II):617–21.
 50. Hadziselimovic F, Herzog B, Barthold JS. Treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone analogue after successful orchiopexy markedly improves the chance of fertility later in life. *J Urol.* 1997;158(3):1193–5.
 51. Schwentner C, Oswald J, Kreczy A, Lunacek A, Bartsch G, Deibl M, et al. Neoadjuvant gonadotropin-releasing hormone therapy before surgery may improve the fertility index in undescended testes: a prospective randomized trial. *J Urol.* 2005;173(3):974–7.
 52. Hadziselimovic F. Successful treatment of unilateral cryptorchid boys risking infertility with LH-RH analogue. *Int Braz J Urol.* 2008;34(3):319–26.
 53. Jallouli M, Rebai T, Abid N, Bendhaou M, Kassis M, Mhiri R. Neoadjuvant Gonadotropin-releasing Hormone Therapy Before Surgery and Effect on Fertility Index in Unilateral Undescended Testes: A Prospective Randomized Trial. *Urology.* 2009;73(6):1251–4.
 54. Thorup J, Clasen-Linde E, Dong L, Hildorf S, Kristensen SG, Andersen CY, et al. Selecting Infants With Cryptorchidism and High Risk of Infertility for Optional Adjuvant Hormonal Therapy and Cryopreservation of Germ Cells: Experience From a Pilot Study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:1–7.
 55. Huff DS, Snyder HM 3rd, Rusnack SL, Zderic SA, Carr MC, Canning DA. Hormonal therapy for the subfertility of cryptorchidism. *Horm Res.* 2001;55(1):38–40.
 56. Chalmel F, Lardenois A, Evrard B, Mathieu R, Feig C, Demougin P,

- et al. Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility. *2012*;27(11):3233–48.
57. Jan SZ, Vormer TL, Jongejan A, Röling MD, Silber SJ, de Rooij DG, et al. Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. *Dev.* 2017;144(20):3659–73.
 58. Hadziselimovic F, Hadziselimovic NO, Demougin P, Krey G, Oakeley EJ. Deficient Expression of Genes Involved in the Endogenous Defense System against Transposons in Cryptorchid Boys with Impaired Mini-Puberty. *Sex Dev.* 2011;5(6):287–93.
 59. Gegenschatz-Schmid K, Verkauskas G, Stadler MB, Hadziselimovic F. Genes located in Y-chromosomal regions important for male fertility show altered transcript levels in cryptorchidism and respond to curative hormone treatment. *Basic Clin Androl.* 2019;29(1):1–8.
 60. Hadziselimovic F, Verkauskas G, Vincel B, Stadler MB. Testicular expression of long non-coding RNAs is affected by curative GnRHa treatment of cryptorchidism. *Basic Clin Androl.* 2019;29(1):1–13.
 61. Hadziselimovic F, Gegenschatz-Schmid K, Verkauskas G, Demougin P, Bilius V, Dasevicius D, et al. GnRHa Treatment of Cryptorchid Boys Affects Genes Involved in Hormonal Control of the HPG Axis and Fertility. *Sex Dev.* 2017;11(3):126–36.
 62. Vincel B, Verkauskas G, Bilius V, Dasevicius D, Malcius D, Jones B, et al. Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Corrects Defective Mini-Puberty in Boys with Cryptorchidism: A Prospective Randomized Study. *Biomed Res Int.* 2018;2018.
 63. Biers SM, Malone PS. A critical appraisal of the evidence for improved fertility indices in undescended testes after gonadotrophin-releasing hormone therapy and orchidopexy. *J Pediatr Urol.* 2010;6(3):239–46.
 64. Hutson JM, Balic A, Nation T, Southwell B. Cryptorchidism. *Semin Pediatr Surg.* 2010;19(3):215–24.
 65. Hutson JM, Southwell BR, Li R, Lie G, Ismail K, Harisis G, et al. The Regulation of Testicular Descent and the Effects of Cryptorchidism. *Endocr Rev.* 2013;34(5):725–52.
 66. Ratcliffe S. Long term outcome in children of sex chromosome abnormalities. *Arch Dis Child.* 1999;80(2):192–5.
 67. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter ' s syndrome. *Lancet.* 2004;364:273–83.
 68. Swee DS, Quinton R. Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism : Minipuberty and the Case for Neonatal Diagnosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:1–9.
 69. Vizeneuve A, Hilfiger A, Bouligand J, Pouillot M, Brailly-Tabard S, Bashamboo A, et al. Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism during Childhood: Presentation and Genetic Analyses in 46 Boys. *PLoS One.* 2013;8(10):e77872.
 70. Siemensma EPC, van Wijngaarden RFA de L, Otten BJ, de Jong FH,

- Hokken-Koelega ACS. Testicular Failure in Boys with Prader-Willi Syndrome: Longitudinal Studies of Reproductive Hormones. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(3):452–9.
71. Sharland M, Burch M, Mckenna WM, Paton MA. A clinical study of Noonan syndrome. *Arch Dis Child.* 1992;67(2):178–83.
 72. Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of Hormones , Genes , and Environment in Human. *Endocr Rev.* 2008;29(5):560–80.
 73. Ferlin A, Zuccarello D, Zuccarello B, Chirico MR, Zanon GF, Foresta C. Genetic alterations associated with cryptorchidism. *JAMA.* 2008;300(19):2271–6.
 74. Zhou B, Tang T, Chen P, Pu Y, Ma M, Zhang D, et al. The variations in the AXIN1 gene and susceptibility to cryptorchidism. *J Pediatr Urol.* 2015;11(3):132.e1-132.e5.
 75. Seguchi H, Hadziselimović F. [Ultramicroscopic studies on the seminiferous tubule in children from birth to puberty. I. Spermatogonia development]. *Verh Anat Ges.* 1974;68:133–48.
 76. Li R, Azzollini D, Shen R, Thorup J, Clasen-Linde E, Cortes D, et al. Postnatal germ cell development during first 18 months of life in testes from boys with non-syndromic cryptorchidism and complete or partial androgen insensitivity syndrome. *J Pediatr Surg.* 2019;54(8):1654–9.
 77. Hadziselimović F, Thommen L, Girard J, Herzog B. The significance of postnatal gonadotropin surge for testicular development in normal and cryptorchid testes. *J Urol.* 1986;136(1 Pt 2):274–6.
 78. Huff DS, Hadziselimovic F, Snyder HM, Duckett JW, Keating MA. Postnatal Testicular Maldevelopment in Unilateral Cryptorchidism. *J Urol.* 1989 Aug 1;142(2 Pt 2):546–8.
 79. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol.* 2014;1180:31–43.
 80. McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Høie-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis — approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. *Hum Reprod.* 2007;22(1):2–16.
 81. Nagato Y, Kushida T, Kushida H. Fixation of Semi-thin Sections for Combined Light and Electron Microscopy. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 1981;58(2):69–80.
 82. Wang P, Li J, Allan RW, Guo CC, Peng Y, Cao D. Expression of UTF1 in Primary and Metastatic Testicular Germ Cell Tumors. *Anatomic Pathol.* 2010;134(4):604–12.
 83. Von Kopylow K, Kirchhoff C, Jezek D, Schulze W, Feig C, Primig M, et al. Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: A whole genome approach. *Hum Reprod.* 2010;25(5):1104–12.
 84. Hohenauer T, Moore AW. The Prdm family: Expanding roles in stem cells and development. *Dev.* 2012;139(13):2267–82.
 85. Mzoughi S, Tan YX, Low D, Guccione E. The role of PRDMs in cancer: one family, two sides. *Curr Opin Genet Dev.* 2016;36:83–91.

86. Hadziselimovic F, Verkauskas G, Stadler MB. Molecular clues in the regulation of mini-puberty involve neuronal DNA binding transcription factor NHLH2. *Basic Clin Androl.* 2021;(Ahead of print):1–13.
87. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012;489:101–8.
88. Guh CY, Hsieh YH, Chu HP. Functions and properties of nuclear lncRNAs—from systematically mapping the interactomes of lncRNAs. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):1–14.
89. Kung JTY, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: Past, present, and future. *Genetics.* 2013;193(3):651–69.
90. Thapar R. Regulation of DNA double-strand break repair by non-coding RNAs. *Molecules.* 2018;23(11).
91. Sparber P, Filatova A, Khantemirova M, Skoblov M. The role of long non-coding RNAs in the pathogenesis of hereditary diseases. *BMC Med Genomics.* 2019;12(Suppl 2):42.
92. Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(13):2491–509.
93. Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs: At the intersection of cancer and chromatin biology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(7):1–16.
94. Wang KC, Chang HY. Review Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Mol Cell.* 2011;43(6):904–14.
95. Pelechano V, Steinmetz LM. Gene regulation by antisense transcription. *Nat Rev Genet.* 2013;14:880–93.
96. Tufarelli C, Stanley JAS, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG, et al. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet.* 2003;34(2):157–65.
97. Fernandes JCR, Acuña SM, Aoki JI, Floeter-winter LM, Muxel SM. Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Non-coding RNA.* 2019;5(17).
98. Hadjicharalambous MR, Lindsay MA. Long Non-Coding RNAs and the Innate Immune Response. *Non-coding RNA.* 2019;5(34).
99. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science.* 2005;309:1559–1163.
100. Lyon MF. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961;190(4773):372–3.
101. Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, et al. Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature.* 1991;349(6304):82–4.
102. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M,

- Tonlorenzi R, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*. 1991;349(6304):38–44.
103. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*. 1996;379(6561):131–7.
 104. Lee J, Davidow LS, Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet*. 1999;21(4):400–4.
 105. Gayen S, Maclary E, Buttigieg E, Hinten M, Kalantry S. A Primary Role for the Tsix lncRNA in Maintaining Random X-Chromosome Inactivation. *Cell Rep*. 2015;11(8):1251–65.
 106. Loos F, Maduro C, Loda A, Lehmann J, Kremers G, Grootegoed JA, et al. Xist and Tsix Transcription Dynamics Is Regulated by the X-to-Autosome Ratio and Semistable Transcriptional States. *Mol Cell Biol*. 2016;36(21):2656–67.
 107. Ji Q, Liu X, Fu X, Zhang L, Sui H, Zhou L, et al. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/ β -catenin signal pathway. *PLoS One*. 2013;8(11).
 108. Wang J, Zhang X, Chen W, Hu X, Li J, Liu C. Regulatory roles of long noncoding RNAs implicated in cancer hallmarks. *Int J Cancer*. 2020;146(4):906–16.
 109. Kretz M, Siprashvili Z, Chu C, Webster DE, Zehnder A, Qu K, et al. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature*. 2013;493(7431):231–5.
 110. Zhang X, Yao J, Shi H, Gao B, Zhang L. LncRNA TINCR/microRNA-107/CD36 regulates cell proliferation and apoptosis in colorectal cancer via PPAR signaling pathway based on bioinformatics analysis. *Biol Chem*. 2019;400(5):663–75.
 111. Liu X, Ma J, Xu F, Li L. TINCR suppresses proliferation and invasion through regulating miR-544a/FBXW7 axis in lung cancer. *Biomed Pharmacother*. 2018;99:9–17.
 112. Zhuang Z, Wang C, Xie N, Wu Y, Hou J, Liu X, et al. Abstract 985: Downregulation of long noncoding RNA TINCR promotes invasion and metastasis and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2016;76(14 Supplement):985 LP – 985.
 113. Zhou W, Zhang S, Li J, Li Z, Wang Y, Li X. lncRNA TINCR participates in ALA-PDT-induced apoptosis and autophagy in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem*. 2019;120(8):13893–902.
 114. Zheng J, Huang Y, Li Y, Lai J, Chen C, Yi C, et al. lncRNA-TINCR Functions as a Competitive Endogenous RNA to Regulate the Migration of Mesenchymal Stem Cells by Sponging miR-761. *Biomed Res Int*. 2020;2020.
 115. Ghafouri-Fard S, Dashti S, Taheri M, Omrani MD. TINCR: An lncRNA with dual functions in the carcinogenesis process. *Non-coding*

- RNA Res. 2020;5(3):109–15.
116. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. The strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: Guidelines for reporting observational studies. *Int J Surg.* 2014;12(12):1495–9.
 117. Sandow J, Jerabek-Sandow G, Krauss B, Schmidt-Gollwitzer M. Pharmacokinetics and metabolism of LHRH agonists, clinical aspects. *J Steroid Biochem.* 1984;20(6, Part 2):1369.
 118. Bilius V. Kriptorchizmo chirurginio gydymo laikas ir vaisingumo prognozė vertinant spermatogenezę sėklidžių biopsijose. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla; 2015.
 119. Gaidatzis D, Lerch A, Hahne F, Stadler MB. QuasR: Quantification and annotation of short reads in R. *Bioinformatics.* 2015;31(7):1130–2.
 120. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: A review and recent developments. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci.* 2016;374(2065).
 121. Nielsen F. Hierarchical Clustering. In: *Introduction to HPC with MPI for Data Science Undergraduate Topics in Computer Science.* Springer; 2016. p. 221–39.
 122. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2009;26(1):139–40.
 123. Lund SP, Nettleton D, McCarthy DJ, Smyth GK. Detecting differential expression in RNA-sequence data using quasi-likelihood with shrunken dispersion estimates. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2012;11(5).
 124. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc B.* 1995;57(1):289–300.
 125. Rouam S. False Discovery Rate. In: *Encyclopedia of Systems Biology.* Springer Science; 2013. p. 731–2.
 126. Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, et al. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D682–8.
 127. Lardenois A, Gattiker A, Collin O, Chalmel F, Primig M. GermOnline 4.0 is a genomics gateway for germline development, meiosis and the mitotic cell cycle. *Database (Oxford).* 2010;2010:1–9.
 128. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220).
 129. Thul PJ, Akesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science.* 2017;356(6340).
 130. Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, et al. Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Adv Bioinformatics.* 2008;2008:1–5.

131. Gong J, Shao D, Xu K, Lu Z, Lu ZJ, Yang YT, et al. RISE: A database of RNA interactome from sequencing experiments. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D194–201.
132. Jostes B, Walther C, Gruss P. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev.* 1990;33(1):27–37.
133. Walther C, Gruss P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development.* 1991;113(4):1435–50.
134. Goulding MD, Lumsden A, Gruss P. Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development.* 1993;117(3):1001–16.
135. Kioussi C, O'Connell S, St-Onge L, Treier M, Gleiberman AS, Gruss P, et al. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(25):14378–82.
136. Dahl E, Koseki H, Balling R. Pax genes and organogenesis. *Bioessays.* 1997 Sep;19(9):755–65.
137. Grote P, Herrmann BG. The long non-coding RNA Fendrr links epigenetic control mechanisms to gene regulatory networks in mammalian embryogenesis. *RNA Biol.* 2013;10(10):1579–85.
138. Dey BK, Mueller AC, Dutta A. Long non-coding RNAs as emerging regulators of differentiation, development, and disease. *Transcription.* 2014;5(4).
139. Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, Pauler FM, Fergusson-Smith AC, Feil R, et al. The Air Noncoding RNA Epigenetically Silences Transcription by Targeting G9a to Chromatin. *Science.* 2008;322(5908):1717–21.
140. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 2010;464(7291):1071–6.
141. Patel RP, Kolon TF, Huff DS, Carr MC, Zderic SA, Canning DA, et al. Testicular Microlithiasis and Antisperm Antibodies Following Testicular Biopsy in Boys with Cryptorchidism. *J Urol.* 2005;174(5):2008–10.
142. Cortes D, Visfeldt J, Møller H, Thorup J. Testicular neoplasia in cryptorchid boys at primary surgery: Case series. *Br Med J.* 1999;319(7214):888–9.
143. Tran N, Broun A, Ge K. Lysine Demethylase KDM6A in Differentiation, Development, and Cancer. *Mol Cell Biol.* 2020;40(20):1–15.
144. Liang T, Wang B, Li J, Liu Y. LINC00922 accelerates the proliferation, migration and invasion of lung cancer via the miRNA-204/CXCR4 axis. *Med Sci Monit.* 2019;25:5075–86.
145. Yang Z, Jiang X, Jiang X, Zhao H. X-inactive-specific transcript: A long noncoding RNA with complex roles in human cancers. *Gene.*

- 2018;679:28–35.
146. Zhang L, Wang Q, Wang F, Zhang X, Zhang L, Tang Y, et al. LncRNA LINC01446 promotes glioblastoma progression by modulating miR-489-3p/TPT1 axis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(3):1484–90.
 147. Jonsson P, Coarfa C, Mesmar F, Raz T, Rajapakshe K, Thompson JF, et al. Single-molecule sequencing reveals estrogen-regulated clinically relevant lncRNAs in breast cancer. *Mol Endocrinol.* 2015;29(11):1634–45.
 148. Koshikawa K, Osada H, Kozaki KI, Konishi H, Masuda A, Tatematsu Y, et al. Significant up-regulation of a novel gene, CLCP1, in a highly metastatic lung cancer subline as well as in lung cancers in vivo. *Oncogene.* 2002;21(18):2822–8.
 149. Cheng Y, Jutooru I, Chadalapaka G, Christopher Corton J, Safe S. The long non-coding RNA HOTTIP enhances pancreatic cancer cell proliferation, survival and migration. *Oncotarget.* 2015;6(13):10840–52.
 150. Yu Y, Li L, Zheng Z, Chen S, Chen E, Hu Y. Long non-coding RNA linc00261 suppresses gastric cancer progression via promoting Slug degradation. *J Cell Mol Med.* 2017;21(5):955–67.
 151. Shahabi S, Kumaran V, Castillo J, Cong Z, Nandagopal G, Mullen DJ, et al. LINC00261 is an epigenetically regulated tumor suppressor essential for activation of the DNA damage response. *Cancer Res.* 2019;79(12):3050–62.
 152. Pu H, Zheng Q, Li H, Wu M, An J, Gui X, et al. CUDR promotes liver cancer stem cell growth through upregulating TERT and C-Myc. *Oncotarget.* 2015;6(38):40775–98.
 153. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W98–102.
 154. Duggan CD, DeMaria S, Baudhuin A, Stafford D, Ngai J. Foxg1 is required for development of the vertebrate olfactory system. *J Neurosci.* 2008;28(20):5229–39.
 155. Garaffo G, Conte D, Provero P, Tomaiuolo D, Luo Z, Pinciroli P, et al. The Dlx5 and Foxg1 transcription factors, linked via miRNA-9 and -200, are required for the development of the olfactory and GnRH system. *Mol Cell Neurosci.* 2015;68:103–19.
 156. Xie H, Cherrington BD, Meadows JD, Witham EA, Mellon PL. Msx1 homeodomain protein represses the α GSU and GnRH receptor genes during gonadotrope development. *Mol Endocrinol.* 2013;27(3):422–36.
 157. Hobert O, Westphal H. Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* 2000;16(2):75–83.
 158. Li Y, Zhang Y, He B, Wang Y, Yuan Z, Yuan W, et al. Cloning and expression of a novel human gene, Isl-2, encoded a LIM-

- homeodomain protein. *Mol Biol Rep*. 2007;34(1):19–26.
159. Liu Y, Fan M, Yu S, Zhou Y, Wang J, Yuan J, et al. cDNA cloning, chromosomal localization and expression pattern analysis of human LIM-homeobox gene LHX4. *Brain Res*. 2002;928(1–2):147–55.
160. Cohen E, Maghnie M, Collot N, Leger J, Dastot F, Polak M, et al. Contribution of LHX4 mutations to pituitary deficits in a cohort of 417 unrelated patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(1):290–301.
161. Diaczok D, Divall S, Matsuo I, Wondisford FE, Wolfe AM, Radovick S. Deletion of Otx2 in GnRH neurons results in a mouse model of hypogonadotropic hypogonadism. *Mol Endocrinol*. 2011;25(5):833–46.
162. Park J II, Park HJ, Lee Y II, Seo YM, Chun SY. Regulation of NGFI-B expression during the ovulatory process. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;202(1–2):25–9.
163. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*. 2003;39(5):749–65.
164. Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai L yi, Nakayama M, Kato Y. PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385(1):11–5.
165. Nishimura N, Ueharu H, Nishihara H, Shibuya S, Yoshida S, Higuchi M, et al. Search for regulatory factors of the pituitary-specific transcription factor prop1 gene. *J Reprod Dev*. 2016;62(1):93–102.
166. Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, et al. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet*. 2008;40(8):1016–22.
167. Kinameri E, Inoue T, Aruga J, Imayoshi I, Kageyama R, Shimogori T, et al. Prdm proto-oncogene transcription factor family expression and interaction with the Notch-Hes pathway in mouse neurogenesis. *PLoS One*. 2008;3(12):1–10.
168. Hadziselimovic F, Hoecht B, Herzog B, Girard J. Does long-term treatment with buserelin improve the fertility chances of cryptorchid testes? In: Labrie F, Belanger A, Dupont A, editors. *LH-RH and its Analogues*. New York: Elsevier; 1984. p. 448–503.
169. Lasaga M, Debeljuk L. Tachykinins and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis: An update. *Peptides*. 2011;32(9):1972–8.
170. Kalil B, Ramaswamy S, Plant TM. The Distribution of Substance P and Kisspeptin in the Mediobasal Hypothalamus of the Male Rhesus Monkey and a Comparison of Intravenous Administration of These Peptides to Release GnRH as Reflected by LH Secretion. *Neuroendocrinology*. 2016;103(6):711–23.
171. Nini L, Zhang JH, Pandey M, Panicker LM, Simonds WF. Expression of the Gβ5/R7-RGS protein complex in pituitary and pancreatic islet cells. *Endocrine*. 2012;42(1):214–7.
172. Weber S, Salabei JK, Möller G, Kremmer E, Bhatnagar A, Adamski J, et al. Aldo-keto Reductase 1B15 (AKR1B15): A mitochondrial human

- aldo-keto reductase with activity toward steroids and 3-keto-acyl-CoA conjugates. *J Biol Chem*. 2015;290(10):6531–45.
173. Palermo M, Marazzi MG, Hughes BA, Stewart PM, Clayton PT, Shackleton CHL. Human Δ 4-3-oxosteroid 5 β -reductase (AKR1D1) deficiency and steroid metabolism. *Steroids*. 2008;73(4):417–23.
 174. Teerds KJ, Huhtaniemi IT. Morphological and functional maturation of Leydig cells: From rodent models to primates. *Hum Reprod Update*. 2015;21(3):310–28.
 175. Pi M, Parrill AL, Quarles LD. GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. *J Biol Chem*. 2010;285(51):39953–64.
 176. Pi M, Quarles LD. Novel bone endocrine networks integrating mineral and energy metabolism. *Curr Osteoporos Rep*. 2013;11(4):391–9.
 177. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006 Dec;444(7120):770–4.
 178. Itoh F, Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF- β family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;32:98–106.
 179. Katagiri T, Watabe T. Bone morphogenetic proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8:a021899.
 180. Ehata S, Yokoyama Y, Takahashi K, Miyazono K. Bi-directional roles of bone morphogenetic proteins in cancer: Another molecular Jekyll and Hyde? *Pathol Int*. 2013;63(6):287–96.
 181. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J*. 2018;285(16):2944–71.
 182. Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Chemokine receptors in the central nervous system: Role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2005;48(1):16–42.
 183. Kiefer F, Siekmann AF. The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(17):2811–30.
 184. Loewer S, Cabili MN, Guttman M, Loh YH, Thomas K, Park IH, et al. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nat Genet*. 2010;42(12):1113–7.
 185. Wang Y, Xu Z, Jiang J, Xu C, Kang J, Xiao L, et al. Endogenous miRNA Sponge lincRNA-RoR Regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Dev Cell*. 2013;25(1):69–80.
 186. Zou G, Liu T, Guo L, Huang Y, Feng Y, Huang Q, et al. miR-145 modulates lincRNA-ROR and Sox2 expression to maintain human amniotic epithelial stem cell pluripotency and β islet-like cell differentiation efficiency. *Gene*. 2016;592(1):48–57.
 187. Xu H, Shen L, Chen X, Ding Y, He J, Zhu J, et al. mTOR/P70S6K promotes spermatogonia proliferation and spermatogenesis in Sprague Dawley rats. *Reprod Biomed Online*. 2016;32(2):207–17.

188. Zeng H, Lu B, Zamponi R, Yang Z, Wetzel K, Loureiro J, et al. mTORC1 signaling suppresses Wnt/ β -catenin signaling through DVL-dependent regulation of Wnt receptor FZD level. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(44):E10362–9.
189. Di Ruscio A, Ebralidze AK, Benoukraf T, Amabile G, Goff LA, Terragni J, et al. DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature*. 2013;503(7476):371–6.
190. Aramaki S, Hayashi K, Kurimoto K, Ohta H, Yabuta Y, Iwanari H, et al. A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell*. 2013;27(5):516–29.
191. Park JS, Ma W, O'Brien LL, Chung E, Guo JJ, Cheng JG, et al. Six2 and Wnt Regulate Self-Renewal and Commitment of Nephron Progenitors through Shared Gene Regulatory Networks. *Dev Cell*. 2012;23(3):637–51.
192. Liu H, Chen S, Yao X, Li Y, Chen CH, Liu J, et al. Histone deacetylases 1 and 2 regulate the transcriptional programs of nephron progenitors and renal vesicles. *Dev*. 2018;145(10).
193. Xu J, Liu H, Park JS, Lan Y, Jiang R. *Osr1* acts downstream of and interacts synergistically with *Six2* to maintain nephron progenitor cells during kidney organogenesis. *Dev*. 2014;141(7):1442–52.
194. Grote P, Wittler L, Hendrix D, Koch F, Währisch S, Beisaw A, et al. The Tissue-Specific lncRNA *Fendrr* Is an Essential Regulator of Heart and Body Wall Development in the Mouse. *Dev Cell*. 2013;24(2):206–14.
195. Gao N, Zhang J, Rao MA, Case TC, Mirosevich J, Wang Y, et al. The role of hepatocyte nuclear factor-3 α (forkhead box A1) and androgen receptor in transcriptional regulation of prostatic genes. *Mol Endocrinol*. 2003;17(8):1484–507.
196. Fang Q, Sang L, Du S. Long noncoding RNA LINC00261 regulates endometrial carcinoma progression by modulating miRNA/FOXO1 expression. *Cell Biochem Funct*. 2018;36(6):323–30.
197. Liu Z, Dai J, Shen H. Systematic analysis reveals long noncoding RNAs regulating neighboring transcription factors in human cancers. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(9):2785–92.
198. Connelly ZM, Yang S, Chen F, Yeh Y, Khater N, Jin R, et al. *Foxa2* activates the transcription of androgen receptor target genes in castrate resistant prostatic tumors. *Am J Clin Exp Urol*. 2018;6(5):172–81.
199. Braidotti G, Baubec T, Pauler F, Seidl C, Smrzka O, Stricker S, et al. The *Air* noncoding RNA: An imprinted cis-silencing transcript. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2004;69:55–66.
200. Stricker SH, Steenpass L, Pauler FM, Santoro F, Latos PA, Huang R, et al. Silencing and transcriptional properties of the imprinted *Air* ncRNA are independent of the endogenous promoter. *EMBO J*. 2008;27(23):3116–28.
201. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, et

- al. Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129(7):1311–23.
202. Zhang J, Zhang P, Wang L, Piao H, Ma L. Long non-coding RNA HOTAIR in carcinogenesis and metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2014;46(1):1–5.
203. Lin C, Wang Y, Wang Y, Zhang S, Yu L, Guo C, et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HOXA13 by lncRNA HOTTIP facilitates tumorigenesis and metastasis in esophageal squamous carcinoma cells. *Oncogene*. 2017;36(38):5392–406.
204. Huang K, Zhang S, Zhu Y, Guo C, Yang M, Liu J, et al. HotaIR mediates tumorigenesis through recruiting EZH2 in colorectal cancer. *J Cell Biochem*. 2019;120(4):6071–7.
205. Aiello A, Bacci L, Re A, Ripoli C, Pierconti F, Pinto F, et al. MALAT1 and HOTAIR Long Non-Coding RNAs Play Opposite Role in Estrogen-Mediated Transcriptional Regulation in Prostate Cancer Cells. *Sci Rep*. 2016;6:1–11.
206. Bhan A, Mandal SS. Estradiol-Induced Transcriptional Regulation of Long Non-Coding RNA, HOTAIR. *Methods Mol Biol*. 2016;1366:395–412.
207. Bhan A, Mandal SS. LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2015;1856(1):151–64.
208. Watanabe M, Fukuda A, Nabekura J. The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Front Neurosci*. 2014;8:1–9.
209. Berghoff EG, Clark MF, Chen S, Cajigas I, Leib DE, Kohtz JD. Evf2 (Dlx6as) lncRNA regulates ultraconserved enhancer methylation and the differential transcriptional control of adjacent genes. *Dev*. 2013;140(21):4407–16.
210. Kaewman P, Nudmamud-Thanoi S, Thanoi S. Gabaergic alterations in the rat testis after methamphetamine exposure. *Int J Med Sci*. 2018;15(12):1349–54.
211. Iacono N Lo, Mantero S, Chiarelli A, Garcia E, Mills AA, Morasso MI, et al. Regulation of Dlx5 and Dlx6 gene expression by p63 is involved in EEC and SHFM congenital limb defects. *Development*. 2008;135(7):1377–88.
212. Bhattacharyya S, Bronner-Fraser M. Competence, specification and commitment to an olfactory placode fate. *Development*. 2008;135(24):4165–77.
213. Nishida H, Miyagawa S, Vieux-Rochas M, Morini M, Ogino Y, Suzuki K, et al. Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression through the interaction between Dlx and GATA-4 for testicular steroidogenesis. *Endocrinology*. 2008;149(5):2090–7.
214. Mozzi A, Forcella M, Riva A, Difrancesco C, Molinari F, Martin V, et al. NEU3 activity enhances EGFR activation without affecting EGFR

- expression and acts on its sialylation levels. *Glycobiology*. 2015;25(8):855–68.
215. Foresta C, Varotto A. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor receptors in human testis from infertile subjects*. *Fertil Steril*. 1994;61(5):941–8.
 216. Mei XL, Zhong S, Lyu P. Long noncoding RNA LINC00520 prevents the progression of cutaneous squamous cell carcinoma through the inactivation of the PI3K/Akt signaling pathway by downregulating EGFR. *Chin Med J (Engl)*. 2019;132(4):454–65.
 217. Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*. 2011;472(7341):120–6.
 218. Schmoker AM, Ebert AM, Ballif BA. The DCBLD receptor family: Emerging signaling roles in development, homeostasis and disease. *Biochem J*. 2019;476(6):931–50.
 219. Wilsker D, Patsialou A, Dallas PB, Moran E. ARID proteins: A diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. *Cell Growth Differ*. 2002;13(3):95–106.
 220. Lin C, Song W, Bi X, Zhao J, Huang Z, Li Z, et al. Recent advances in the ARID family: Focusing on roles in human cancer. *Onco Targets Ther*. 2014;7:315–24.
 221. Cao JN, Gao TW, Stanbridge EJ, Irie R. RBP1L1, a retinoblastoma-binding protein-related gene encoding an antigenic epitope abundantly expressed in human carcinomas and normal testis. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(15):1159–65.
 222. Wu RC, Jiang M, Beaudet AL, Wu MY. ARID4A and ARID4B regulate male fertility, a functional link to the AR and RB pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(12):4616–21.
 223. Jones MH, Hamana N, Shimane M. Identification and characterization of BPTF, a novel bromodomain transcription factor. *Genomics*. 2000;63(1):35–9.
 224. Richart L, Carrillo-De Santa Pau E, Río-Machín A, De Andrés MP, Cigudosa JC, Lobo VJSA, et al. BPTF is required for c-MYC transcriptional activity and in vivo tumorigenesis. *Nat Commun*. 2016;7:10153.
 225. Moore S, Berger ND, Luijsterburg MS, Pielt CG, Stanley FKT, Schröder CU, et al. The CHD6 chromatin remodeler is an oxidative DNA damage response factor. *Nat Commun*. 2019;10(1).
 226. March HN, Rust AG, Wright NA, Ten Hoeve J, De Ridder J, Eldridge M, et al. Insertional mutagenesis identifies multiple networks of cooperating genes driving intestinal tumorigenesis. *Nat Genet*. 2011;43(12):1202–9.
 227. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal

- mucosal diseases. *Physiol Rev.* 2014;94(2):329–54.
228. Hendrich B, Bird A. Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins. *Mol Cell Biol.* 1998;18(11):6538–47.
 229. Wood KH, Zhou Z. Emerging molecular and biological functions of MBD2, a reader of DNA methylation. *Front Genet.* 2016;7:1–14.
 230. May S, Owen H, Pesse TJ, Greenow KR, Jones GR, Blackwood A, et al. Mbd2 enables tumourigenesis within the intestine while preventing tumour-promoting inflammation. *J Pathol.* 2018;245(3):270–82.
 231. Li L, Li N, Liu N, Huo F, Zheng J. MBD2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in renal cell carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2020;13:10001–12.
 232. Ko S, Ahn J, Song CS, Kim S, Knapczyk-Stwora K, Chatterjee B. Lysine methylation and functional modulation of androgen receptor by set9 methyltransferase. *Mol Endocrinol.* 2011;25(3):433–44.
 233. Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF. Centromeres and kinetochores: From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell.* 2003;112(4):407–21.
 234. Porter IM, McClelland SE, Khoudoli GA, Hunter CJ, Andersen JS, McAinsh AD, et al. Bod1, a novel kinetochore protein required for chromosome biorientation. *J Cell Biol.* 2007;179(2):187–97.
 235. Daigle M, Roumaud P, Martin LJ. Expressions of Sox9, Sox5, and Sox13 transcription factors in mice testis during postnatal development. *Mol Cell Biochem.* 2015;407(1–2):209–21.
 236. Liewen H, Meinhold-Heerlein I, Oliveira V, Schwarzenbacher R, Luo G, Wadle A, et al. Characterization of the human GARP (Golgi associated retrograde protein) complex. *Exp Cell Res.* 2005;306(1):24–34.
 237. Chen W, Paradkar PN, Li L, Pierce EL, Langer NB, Takahashi-Makise N, et al. Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(38):16263–8.
 238. Piprek RP, Kolasa M, Podkowa D, Kloc M, Kubiak JZ. Cell adhesion molecules expression pattern indicates that somatic cells arbitrate gonadal sex of differentiating bipotential fetal mouse gonad. *Mech Dev.* 2017;147:17–27.
 239. Hawi Z, Tong J, Dark C, Yates H, Johnson B, Bellgrove MA. The role of cadherin genes in five major psychiatric disorders: A literature update. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2018;177(2):168–80.
 240. Gilbert D, Chandler I, McIntyre A, Goddard N, Gabe R, Huddart R, et al. Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents. *J Pathol.* 2009;217:94–102.

241. Hargrave M, Wright E, Kun J, Emery J, Cooper L, Koopman P. Expression of the Sox11 gene in mouse embryos suggests roles in neuronal maturation and epithelio-mesenchymal induction. *Dev Dyn*. 1997;210(2):79–86.
242. Pamnani M, Sinha P, Nara S, Sachan M. Study of promoter DNA methylation of Sox11 and its correlation with tissue-specific expression in the laboratory mouse. *Gene*. 2014;552(1):133–9.
243. Alfano G, Vitiello C, Caccioppoli C, Caramico T, Carola A, Szego MJ, et al. Natural antisense transcripts associated with genes involved in eye development. *Hum Mol Genet*. 2005;14(7):913–23.
244. Jorgez CJ, Rosenfeld JA, Wilken NR, Vangapandu H V., Sahin A, Pham D, et al. Genitourinary defects associated with genomic deletions in 2p15 encompassing OTX1. *PLoS One*. 2014;9(9).
245. Werner A, Carlile M, Swan D. What do natural antisense transcripts regulate? *RNA Biol*. 2009;6(1):43–8.
246. Shen X, Li M, Mao Z, Yu W. Loss of circadian protein TIMELESS accelerates the progression of cellular senescence. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(4):2784–91.
247. Engelen E, Janssens RC, Yagita K, Smits VAJ, van der Horst GTJ, Tamanini F. Mammalian TIMELESS Is Involved in Period Determination and DNA Damage-Dependent Phase Advancing of the Circadian Clock. *PLoS One*. 2013;8(2).

PRIEDAI

1 priedas. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimo atlikti biomedicininį tyrimą kopija



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. infor@cr.vu.lt
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.
Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705,
el. p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2016-12-13 Nr.158200-16-883-390

Tyrimo pavadinimas:
NENUSILEIDUSIŲ SĖKLIDŽIŲ HISTOLOGIJS IR GENUŲ RAIŠKOS KORELIACIJA

Protokolo Nr.: 1
Versija: 2
Data: 2016-12-06

Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:
Versija: 2
Data: 2016-12-06

Pagrindinis tyrėjas: **Gilydas Verkauskas**
Įstaigos pavadinimas: Vaikų ligoninė, VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filialas
Vaikų urologijos skyrius
Adresas: Santariškių g. 7, LT-08406 Vilnius

Leidimas galioja iki: **2020-05-31**

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2016/12), vykusio 2016 m. gruodžio 13 d. sprendimu.

Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. dr. Laimutė Jakavonytė	filosofija	taip
2	prof.dr. Jolanta Dadonienė	epidemiologija, medicina	taip
3	doc.dr. Jaunius Gumbis	teisė	ne
4	Genovaitė Bulzytė	slauga	taip
5	prof.dr. Augustina Jankauskienė	medicina	taip
6	dr. Laura Malinauskienė	medicina	taip
7	Eglė Zubienė	psichologija	taip
8	prof. Saulius Vosylius	medicina	taip
9	Ugnė Šakūnienė	pacientų teisės	taip

Pirmininkė



Laura Malinauskienė

2 priedas. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimo atlikti biomedicininį tyrimą papildymo kopija



VILNIAUS UNIVERSITETAS
VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Biomedicininio tyrimo

2018-12-04 Nr.158200-16-883-PP1-112

„Nenusileidusių sėklidžių histologijos ir genų raiškos koreliacija“

pagrindiniam tyrėjui Gilvydai Verkauskui

Dėl leidimo Nr. 158200-16-883-390 papildymo Nr. 1

PRITARIMAS

Vilniaus regioninis biomedicininų tyrimų etikos komitetas susipažino su Jūsų prašymu leisti keisti/papildyti biomedicininio tyrimo „Nenusileidusių sėklidžių histologijos ir genų raiškos koreliacija“, leidimą Nr. 158200-16-883-387, išduotą 2016-12-13 d.

Komiteto posėdžio, vykusio 2018 gruodžio 4 d. metu nutarta pritarti Jūsų prašymui:

1. Vadovautis atnaujintu protokolu (Nr. 1, versija Nr. 3, data 2018-11-09)
2. Vadovautis atnaujinta Informuoto asmens sutikimo forma (versija Nr. 3, data 2018-11-09).

Pirmininkas



prof. dr. (HP) Saulius Vosylius

Viešoji įstaiga
Universiteto g. 3
01513 Vilnius

Duomenys kaupiami ir saugomi
Juridinių asmenų registre
Kodas 211950810

Komiteto duomenys:
M. K. Čiurlionio g. 21, LT-03101 Vilnius
Tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mfvu.lt
www.mfvu.lt/tt/content/vrbtek/naujienos

3 priedas. 1P lentelė. Skirtinga genų, dalyvaujančių germinacinių ląstelių ir neurologiniame vystymesi, raiška nenusileidusiose sėklidėse (61).

Genas	log₂FC^{HIR/LIR}	FDR^{HIR/LIR}	log₂FC^{GnRHα+/-}	FDR^{GnRHα+/-}
<i>ALDH1A2</i>	-2,36946	0,00017	n.n.	n.n.
<i>AMPH</i>	-1,51873	0,00089	n.n.	n.n.
<i>ART3</i>	-1,87087	0,00152	n.n.	n.n.
<i>ARID3B</i>	-1,44965	0,00017	n.n.	n.n.
<i>ATF3</i>	-0,96099	0,00954	n.n.	n.n.
<i>AXIN2</i>	-1,28981	0,00028	-0,50907	0,03134
<i>BMP3</i>	n.r.	n.r.	0,92211	0,00394
<i>BMP5</i>	n.r.	n.r.	2,31201	0,00020
<i>BMP6</i>	-0,76124	0,02666	n.n.	n.n.
<i>BMP7</i>	-1,58963	0,00144	n.n.	n.n.
<i>BMP8A</i>	-0,86631	0,03160	n.n.	n.n.
<i>BMP10</i>	n.r.	n.r.	2,13774	0,00475
<i>BMPR1B</i>	-2,56530	0,00018	n.n.	n.n.
<i>CACNA2D2</i>	-1,87634	0,00024	n.n.	n.n.
<i>CBL</i>	-1,28185	0,00070	-0,51759	0,03785
<i>CDC20</i>	-2,58840	0,00015	n.n.	n.n.
<i>CHD7</i>	-0,72742	0,00152	n.n.	n.n.
<i>CLGN</i>	-1,04018	0,01404	n.n.	n.n.
<i>CLOCK</i>	-0,46419	0,01024	-0,86342	0,00069
<i>CSRP2</i>	-1,79674	0,00026	-1,28153	0,00041
<i>CXCL3</i>	n.r.	n.r.	1,61585	0,00974
<i>CXCL5</i>	n.r.	n.r.	1,90972	0,00007
<i>CXCL6</i>	n.r.	n.r.	2,04525	0,00206
<i>CXCL8</i>	n.r.	n.r.	1,78386	0,01270
<i>CXCL9</i>	-1,98042	0,00121	n.n.	n.n.
<i>CXCL11</i>	n.r.	n.r.	1,94361	0,00893
<i>CXCL13</i>	n.r.	n.r.	3,12194	0,00138
<i>CXCR1</i>	n.r.	n.r.	2,41284	0,00403
<i>CXCR2</i>	n.r.	n.r.	1,73513	0,00137
<i>CXCR4</i>	-0,80011	0,01059	-0,59637	0,02908
<i>CXCR5</i>	n.r.	n.r.	1,93683	0,02545
<i>CXCR6</i>	n.r.	n.r.	1,96231	0,00461
<i>DAZI</i>	-2,08964	0,00410	n.n.	n.n.
<i>DAZL</i>	-1,30306	0,00726	n.n.	n.n.

Lentelės tęsinys.

Genas	log₂FC^{HIR/LIR}	FDR^{HIR/LIR}	log₂FC^{GnRHα+/-}	FDR^{GnRHα+/-}
<i>DDX4</i>	-2,86159	0,00022	n.n.	n.n.
<i>DDX25</i>	-0,97862	0,00353	n.n.	n.n.
<i>DLX1</i>	n.r.	n.r.	1,40060	0,01565
<i>DLX2</i>	-2,60142	0,00389	n.n.	n.n.
<i>DLX3</i>	-2,07726	0,00661	1,43846	0,01841
<i>DLX5</i>	-1,92109	0,00407	n.n.	n.n.
<i>DLX6</i>	-2,19564	0,00030	1,10459	0,04308
<i>DMRTB1</i>	-3,26495	0,00015	n.n.	n.n.
<i>DPYSL4</i>	-1,09804	0,02908	n.n.	n.n.
<i>DTL</i>	-1,51525	0,00036	-0,57214	0,02598
<i>DUSP4</i>	-1,73444	0,00015	n.r.	n.r.
<i>DUSP5</i>	-2,14862	0,00027	-0,61025	0,02746
<i>EBF1</i>	n.r.	n.r.	-0,57109	0,01699
<i>EBF2</i>	n.r.	n.r.	1,76714	0,00002
<i>EBF3</i>	-1,94656	0,00022	n.n.	n.n.
<i>EGR2</i>	-1,17858	0,00133	1,23098	0,00217
<i>EGR3</i>	n.r.	n.r.	1,59588	0,00035
<i>EGR4</i>	-3,35225	0,00032	n.n.	n.n.
<i>ESX1</i>	-3,34104	0,00015	n.n.	n.n.
<i>FGF5</i>	n.r.	n.r.	2,42937	0,00002
<i>FGF9</i>	-1,06052	0,00163	n.n.	n.n.
<i>FGF14</i>	-1,23942	0,02081	n.n.	n.n.
<i>FGF23</i>	n.r.	n.r.	2,68731	0,00009
<i>FGFR1</i>	-0,49372	0,02425	n.n.	n.n.
<i>FGFR2</i>	-1,25292	0,00052	-0,57325	0,01389
<i>FGFR3</i>	-3,32791	0,00015	n.n.	n.n.
<i>FGFRL1</i>	-0,97919	0,01059	n.n.	n.n.
<i>FOXP1</i>	-1,60584	0,00440	1,25464	0,01479
<i>FST</i>	-1,99538	0,00062	n.n.	n.n.
<i>GAGE1</i>	-1,79238	0,00728	n.n.	n.n.
<i>GATA2</i>	-1,52714	0,00034	n.n.	n.n.
<i>GATA3</i>	n.r.	n.r.	1,24379	0,01532
<i>GPRC6A</i>	n.r.	n.r.	1,90743	0,00340
<i>GTSF1</i>	-2,96989	0,00015	n.n.	n.n.
<i>ID4</i>	-1,53417	0,00110	-0,55121	0,03220
<i>IGF2BP1</i>	-2,61007	0,00019	n.n.	n.n.
<i>IGF2BP2</i>	-1,56639	0,00173	n.n.	n.n.

Lentelės tęsinys.

Genas	log₂FC^{HIR/LIR}	FDR^{HIR/LIR}	log₂FC^{GnRHα+/-}	FDR^{GnRHα+/-}
<i>IGF2BP3</i>	-0,69717	0,02021	n.n.	n.n.
<i>ISL1</i>	-2,09731	0,00052	n.n.	n.n.
<i>ISL2</i>	-1,61830	0,00886	1,32948	0,01495
<i>KIF21B</i>	-1,97470	0,00022	n.n.	n.n.
<i>KLF4</i>	-1,16046	0,00828	n.n.	n.n.
<i>LEP</i>	n.r.	n.r.	1,59727	0,001
<i>LHX2</i>	-3,13022	0,00190	n.n.	n.n.
<i>LHX4</i>	n.r.	n.r.	1,93268	0,02841
<i>LHX6</i>	-1,72084	0,00024	n.n.	n.n.
<i>LHX8</i>	-2,02622	0,00074	n.n.	n.n.
<i>LIN7B</i>	-1,94848	0,00032	n.n.	n.n.
<i>LIN28B</i>	-2,29080	0,00026	n.n.	n.n.
<i>MAGEA4</i>	-2,65916	0,00022	n.n.	n.n.
<i>MAGEC1</i>	-2,50237	0,00015	n.n.	n.n.
<i>MBD2</i>	n.r.	n.r.	-0,68560	0,00402
<i>MND1</i>	-2,18184	0,00055	n.n.	n.n.
<i>MORC1</i>	-2,46752	0,00028	n.n.	n.n.
<i>MSX1</i>	-1,37378	0,00227	n.n.	n.n.
<i>NHLH2</i>	-1,65737	0,00077	1,25697	0,01817
<i>NLRP2</i>	-1,49550	0,00114	-0,81784	0,00267
<i>NMU</i>	-2,19830	0,00186	n.n.	n.n.
<i>NOS1</i>	-1,57741	0,00035	1,23710	0,00035
<i>NR4A1</i>	-1,05698	0,00366	n.n.	n.n.
<i>NR4A2</i>	-1,00545	0,02749	1,05409	0,00497
<i>NRG1</i>	-0,92134	0,01363	0,77972	0,00986
<i>OTX1</i>	n.r.	n.r.	3,65454	0,00035
<i>OTX2</i>	-1,73890	0,03221	1,24404	0,03936
<i>PAX1</i>	n.r.	n.r.	1,92862	0,00031
<i>PAX2</i>	n.r.	n.r.	2,09194	0,00424
<i>PAX3</i>	n.r.	n.r.	1,75708	0,00055
<i>PAX4</i>	n.r.	n.r.	2,89886	0,00146
<i>PAX6</i>	n.r.	n.r.	1,80547	0,00000
<i>PAX7</i>	-1,29488	0,03177	1,85923	0,00050
<i>PCSK1</i>	n.r.	n.r.	2,23895	2,08E-05
<i>PCSKIN</i>	-2,4217	0,001	n.n.	n.n.
<i>PITX1</i>	-4,21104	0,00087	n.n.	n.n.
<i>PITX2</i>	-2,36513	0,00097	n.n.	n.n.

Lentelės tęsinys.

Genas	log₂FC^{HIR/LIR}	FDR^{HIR/LIR}	log₂FC^{GnRHα+/-}	FDR^{GnRHα+/-}
<i>PIWIL2</i>	-1,75871	0,00088	n.n.	n.n.
<i>PIWIL4</i>	-2,08022	0,00015	n.n.	n.n.
<i>POU1F1</i>	n.r.	n.r.	1,89961	0,02935
<i>POU2AF1</i>	n.r.	n.r.	2,04066	0,00205
<i>POU2F1</i>	n.r.	n.r.	-0,53989	0,02069
<i>POU2F2</i>	n.r.	n.r.	0,99116	0,01655
<i>POU2F3</i>	n.r.	n.r.	3,00384	0,00018
<i>POU3F1</i>	-2,53507	0,00039	n.n.	n.n.
<i>POU3F2</i>	-1,92369	0,00456	1,02421	0,01311
<i>POU4F2</i>	n.r.	n.r.	2,25746	0,00162
<i>POU6F2</i>	-1,62602	0,00603	1,11727	0,01458
<i>PRDM7</i>	n.r.	n.r.	2,17865	0,00030
<i>PRDM9</i>	-1,17279	0,00828	1,68343	0,00138
<i>PRDM12</i>	n.r.	n.r.	2,11445	0,01114
<i>PRDM14</i>	-2,557413	0,001372	n.n.	n.n.
<i>PRDM16</i>	n.r.	n.r.	1,14955	0,00420
<i>PROK2</i>	-2,43563	0,00018	n.n.	n.n.
<i>PROPI</i>	n.r.	n.r.	2,64319	0,00132
<i>RBMY1B</i>	-1,93256	0,00040	1,16988	0,00234
<i>RBMY1E</i>	-1,90322	0,00203	1,31513	0,00099
<i>RBMY1F</i>	-2,02817	0,00082	n.n.	n.n.
<i>RBMY1J</i>	-1,95224	0,00065	0,83432	0,01583
<i>RGS7</i>	-1,63750	0,00178	0,75082	0,04581
<i>RNF17</i>	-2,36921	0,00193	n.n.	n.n.
<i>RUNX1</i>	-0,95564	0,00848	0,75495	0,00369
<i>RUNX2</i>	n.r.	n.r.	1,22941	0,00296
<i>SEMA3F</i>	-1,67332	0,00438	n.n.	n.n.
<i>SEMA4D</i>	-0,83474	0,00108	n.n.	n.n.
<i>SH3GL2</i>	-1,42897	0,00032	n.n.	n.n.
<i>SIX1</i>	-2,53474	0,00022	n.n.	n.n.
<i>SIX2</i>	-1,76080	0,00941	1,61456	0,01446
<i>SIX3</i>	n.r.	n.r.	2,28491	0,00392
<i>SNAP91</i>	-1,71458	0,00038	n.n.	n.n.
<i>SOX1</i>	-1,65838	0,00346	1,24834	0,01547
<i>SOX2</i>	n.r.	n.r.	1,24700	0,02304
<i>SOX8</i>	-1,46407	0,00033	n.n.	n.n.
<i>SOX9</i>	0,49827	0,03845	n.n.	n.n.

Lentelės tęsinys.

Genas	log₂FC^{HIR/LIR}	FDR^{HIR/LIR}	log₂FC^{GnRHa+/-}	FDR^{GnRHa+/-}
<i>SOX11</i>	n. r.	n.r.	0,74816	0,00565
<i>SOX14</i>	n.r.	n.r.	3,95870	0,00052
<i>SOX17</i>	-1,25130	0,00208	n.n.	n.n.
<i>SOX30</i>	-1,94278	0,00025	0,72938	0,04419
<i>SPAI7</i>	-1,85214	0,00126	-0,81552	0,03174
<i>SPRY4</i>	-1,05327	0,00152	n.n.	n.n.
<i>SSX2</i>	-2,02297	0,00114	n.n.	n.n.
<i>SYCP3</i>	-2,24491	0,00205	n.n.	n.n.
<i>TAC1</i>	n.r.	n.r.	1,62056	0,01531
<i>TAC3</i>	n.r.	n.r.	1,87973	0,01129
<i>TACR1</i>	n.r.	n.r.	1,49129	0,00827
<i>TACR3</i>	n.r.	n.r.	2,93464	0,00339
<i>TAF5</i>	-1,08538	0,00089	n.n.	n.n.
<i>TAF7L</i>	-1,98595	0,00167	n.n.	n.n.
<i>TDRD5</i>	-2,64116	0,00029	n.n.	n.n.
<i>TDRD6</i>	-1,80614	0,00015	n.n.	n.n.
<i>TDRD9</i>	-1,52239	0,00057	n.n.	n.n.
<i>TDRD10</i>	-1,80786	0,00098	n.n.	n.n.
<i>TEX14</i>	-1,53753	0,00045	n.n.	n.n.
<i>TLE1</i>	-0,90022	0,00106	-0,60512	0,00850
<i>TRPC3</i>	-1,34278	0,00474	n.n.	n.n.
<i>TSPY1</i>	-2,49393	0,00032	n.n.	n.n.
<i>WNT3</i>	-2,64239	0,00015	n.n.	n.n.

Santrumpos: paryškinta – genai, dalyvaujantys pagumburio-hipofizės-lytinių liaukų (HPG) ašies veikloje; HIR – didelės nevaisingumo rizikos pogrupio mėginiai; LIR – mažos nevaisingumo rizikos pogrupio mėginiai; GnRHa – gonadotropinus atpalaiduojančio hormono analogas; „-“ – 2HIR pogrupio mėginiai prieš hormoninį gydymą, „+“ – po hormoninio gydymo; log₂FC – absoliutaus raiškos pokyčio kartais binarinis logaritmas; FDR – kriterijaus reikšmingumo lygmuo; n.r. – nereikšminga; n.n. – nenustatyta.

PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

1. Straipsniai disertacijos tema

- Vincel B, Verkauskas G, Bilius V, Dasevicius D, Malcius D, Jones B, Hadziselimovic F. Gonadotropin-releasing hormone agonist corrects defective mini-puberty in boys with cryptorchidism: a prospective randomized study. *Biomed Res Int.* vol. 2018, Article ID 4651218, 5 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4651218>
- Hadziselimovic F, Verkauskas G, Vincel B, Stadler MB. Testicular expression of long non-coding RNAs is affected by curative GnRHa treatment of cryptorchidism. *Basic Clin Androl.* 2019 Dec 27;29:18. doi: 10.1186/s12610-019-0097-3

2. Straipsniai, dalinai susiję su disertacijos tema

- Adomaitis R, Vincel B, Eidukaite A, et al. Consequences of bilateral cryptorchidism in adults. *Andrologia.* 2016;48(9):933-938. doi:10.1111/and.12534
- Hadziselimovic F, Verkauskas G, Vincel B, Krey G, Zachariou Z. Abnormal histology in testis from prepubertal boys with monorchidism. *Basic Clin Androl.* 30, 11 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12610-020-00109-1>

3. Pranešimai disertacijos tema

- Vincel B, Verkauskas G, Bilius V, Dasevičius D, Malcius D, Hadziselimovič F. Prospective randomized study of hormonal treatment in boys with bilateral cryptorchidism. EUPSA 2017. 2017 m. gegužės 17–20 d. Limassol, Kipras.
- Hadziselimovič F, Verkauskas G, Vincel B, Stadler MB. Epigenetic code of long non-coding RNAs after curative GnRHa treatment for cryptorchidism-induced infertility. EUPSA 2019. 2019 m. birželio 12–15 d. Belgradas, Serbija.

4. Pranešimai, dalinai susiję su disertacijos tema

- Vincel B, Geimanaitė L, Dasevičius D, Verkauskas G. Histological evaluation of gonads in patients with disorders of sex development. 15th Conference of the Baltic Association of Paediatric Surgeons. 2018 m. gegužės 10–12 d. Ryga, Latvija.
- Vincel B, Dasevičius D, Bilius V, Puzinas A, Ivanauskienė D, Verkauskas G. Histological evaluation of gonads in patients with disorders of sex development. 8th Warsaw Conference of Paediatric Urology. 2018 m. rugsėjo 6–8 d. Radziejovice, Lenkija.
- Hadziselimovič F, Verkauskas G, Vincel B, Stadler MB. Cryptorchid boys with abrogated mini-puberty display differentially expressed genes involved in sudden infant death syndrome The 58th Annual ESPE Meeting. 2019 m. rugsėjo 19–21 d. Viena, Austrija.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju:

Prof. Kęstučiui Strupui už suteiktą galimybę pažinti mokslą ir tapti jo dalimi.

Savo moksliniam vadovui ir mokytojui doc. dr. Gilvydai Verkauskui už paskatinimą siekti žinių, tobulėti ir nepasiduoti. Dėkoju už pasitikėjimą, palaikymą, patarimus ir pagalbą visus doktorantūros metus.

Prof. Faruk Hadziselimovič už tyrimo sumodeliavimą, nuolatinį vadovavimą bei pagalbą rengiant publikacijas ir pranešimus. Labai džiaugiuosi ir didžiuojuosi galėdama pažinti Mokslininką iš didžiosios raidės, žmogų, kupiną naujų idėjų ir įdomų pašnekovą. Dėkoju už galimybę mokytis iš geriausių.

Gydytojui patologui Dariui Dasevičiui už sėklidžių biopsijų histologinę analizę ir aprašymą bei laiką, skirtą bendram preparatų nagrinėjimui ir paaiškinimui.

Philippe Demougin už atliktus molekulinis tyrimus.

Michael B. Stadler už atliktus bioinformatikos tyrimus ir molekulinį tyrimų statistinę analizę.

Dr. Kristinai Stuopelytei už pagalbą dirbant su genetikos terminais, pastabas ir pataisymus rašant disertaciją.

Recenzentams doc. dr. Arūnui Želviui, doc. dr. Edvardui Žurauskui ir dr. Birutei Burnytei už laiką, skirtą disertacijos peržiūrai, vertingas pastabas ir patarimus.

Dr. Vytautui Biliui ir dr. Arnui Bakavičiui už palaikymą, pagalbą sprendžiant iškilusius klausimus ir padrąšinimą.

Bendradarbiams už palaikymą ir supratingumą.

Savo šeimai ir draugams. Esu dėkinga už jūsų visų meilę, rūpestį, tikėjimą, begalinį palaikymą, suteiktą įkvėpimą ir kantrybę.

CURRICULUM VITAE

Asmeniniai duomenys



BEATA VINCEL, gimusi 1985-06-05

Adresas: Stanevičiaus g. 56-5, LT – 07117,
Vilnius, Lietuva

Telefono nr.: +370 674 39 320

El. paštas: *beata.vincel@gmail.com*

Išsilavinimas

2016–2020	Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, Doktorantūros studijos
2010–2015	Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, Vaikų chirurgijos rezidentūra
2004–2010	Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, Medicina
2008–2009	Kuopio universitetas, Medicina pagal Erasmus programą
2000–2004	Vilniaus Adomo Mickevičiaus gimnazija

Darbo patirtis

2014-05 – 2016-01	Medicinos gydytoja; Grožio ir terapijos klinika „Sugihara“
2014-08 – 2015-09	Medicinos gydytoja; Vaikų ligoninė, Priėmimo-skubios pagalbos skyrius
2016-11 – 2017-01	Vaikų chirurgė; Centro poliklinika
2015-08 – dabar	Vaikų chirurgė; Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos, Vaikų chirurgijos skyrius

Kvalifikacijos kėlimas

2008 m. liepos 1–29 d.	Vaikelio Jėzaus klinikinė ligoninė (Szpital kliniczny dzieciątka Jezus), Bendros
------------------------	--

	chirurgijos ir transplantologijos skyrius, Varšuva, Lenkija
2009 m. liepos 3–31 d.	Miesto ligoninė Nr. 35 (Больница №35 городская МЛПУ), Anesteziologijos ir intensyvios terapijos skyrius, Nižnij Novgorod, Rusija
2010 m. kovo 6 d.	Krizių tyrimo centro „Privalomojo pirmosios pagalbos mokymo programa“, Kaunas, Lietuva
Nuo 2013 m.	Kasmetinė Lietuvos vaikų chirurgų draugijos konferencija
2013 m. gegužės 17–19 d.	Krizių tyrimo centro kvalifikacijos tobulinimo kursas: „Skubioji medicinos pagalba vaikams“, Kaunas, Lietuva
2013 m. lapkričio 14–15 d.	EPOS Regional Core Curriculum Courses, Kaunas, Lietuva
2014 m. birželio 18–21 d.	15 th European Pediatric Surgeons' Association Congress (EUPSA 2014), Dublinas, Airija
2014 m. rugsėjo 25–27 d.	XIII Conference of the Baltic Association of Paediatric Surgeons (BAOPS 2014), Vilnius, Lietuva
2014 m. birželio 18 d.	Basic Skills in Paediatric Laparoscopy Course, EUPSA 2014, Dublinas, Airija
2014 m. lapkričio 2–30 d.	V. Buzzi vaikų ligoninė (Ospedale dei Bambini V. Buzzi), vaikų chirurgijos skyrius, Milanas, Italija
2015 m. kovo 20–21 d.	8 th Central & Eastern European Course in Pediatric Surgery, Master Course in Advanced Pediatric Minimal Access Surgery, Šegedas, Vengrija
2016 m. gegužės 5–7 d.	XIV Conference of the Baltic Association of Paediatric Surgeons (BAOPS 2016), Tartu, Estija
2016 m. spalio 17–21 d.	„Bendrujų kompetencijų gebėjimų mokymai“, Vilnius, Lietuva

2017 m. gegužės 17–20 d.	18 th European Pediatric Surgeons' Association Congress (EUPSA 2017), Limasolis, Kipras
2018 m. balandžio 11–14 d.	29 th Congress of ESPU, Helsinkis, Suomija
2018 m. gegužės 10–12 d.	15 th Conference of the Baltic Association of Paediatric Surgeons (BAOPS 2018), Ryga, Latvija
2018 m. birželio 20–23 d.	19 th European Pediatric Surgeons' Association Congress (EUPSA 2018), Paryžius, Prancūzija
2018 m. rugsėjo 6–8 d.	8 th Warsaw Conference of Pediatric Urology, Radziejovice, Lenkija
2019 m. kovo 20–23 d.	12 th Central and Eastern European Course in Pediatric Surgery, Minimally Invasive and Neonatal Surgery, Lvovas, Ukraina
2019 m. balandžio 24–27 d.	30 th Congress of ESPU, Lionas, Prancūzija
2019 m. birželio 12–15 d.	20 th European Pediatric Surgeons' Association Congress (EUPSA 2019), Belgradas, Serbija
2019 m. gruodžio 5–6 d.	12 th Annual European Pediatric Colorectal and Pelvic Reconstruction Congress & 7 th Paediatric Surgery Postgraduate Seminars, Viena, Austrija
2019 m. gruodžio 7 d.	The PSARP- and Laparoscopic Training Workshop, Viena, Austrija

Gerosios klinikinės praktikos mokymai

1. Gerosios klinikinės praktikos kursai. Inlita. 2016 m. liepos 19 d. Nr. IL/C.03.16
2. Good Clinical Practice: A Refresher Course for all Site Personnel Working on Clinical Research Studies (including ICH E6, Revision 2 Changes) Version 2, MARCH 2017, 2017 m. spalio 4 d.

Pranešimai

- Liver rupture treatment in children using a stent graft. 15th EUPSA 2014 Congress, Dublinas, Airija.

- Liver rupture treatment in children: 13-year experience in single institution with case presentation and literature review on minimally invasive treatment. 13th Conference of the Baltic Association of Paediatric Surgeons (BAOPS 2014), Vilnius, Lietuva.
- Consequences of bilateral cryptorchidism in adults. 14th Conference of the Baltic Association of Paediatric Surgeons (BAOPS 2016), Tartu, Estija.
- Consequences of bilateral cryptorchidism in adults. 3rd EAU Baltic Meeting (BALTIC16), Talinas, Estija (pranešimo bendraautorė)
- Cryptorchid boys with abrogated mini-puberty display differentially expressed genes involved in sudden infant death syndrome. The 58th Annual ESPE Meeting, Viena, Austrija (panešimo bendraautorė)
- Ūminis apendicitas naujagimystėje: klinikiniai atvejai ir literatūros apžvalga. Lietuvos vaikų chirurgija 2019, Kaunas, Lietuva (pranešimo bendraautorė)

Narystės

2015 – dabar	Lietuvos vaikų chirurgijos draugijos narė
2018 – dabar	Europos vaikų urologijos draugijos (ESPU) narė

Domėjimosi sritys

Kriptorchizmas, vaisingumo prognozė, lytinio vystymosi sutrikimai, minimaliai invazyvi vaikų chirurgija.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Kalbos redaktorė *Gabija Bankauskaitė*

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