Ērika Bitiņa-Barlote

ORCID 0000-0001-7859-3940

Urīnpūšļa vēža epidemioloģija Latvijā un urīna eksosomālo mikroRNS kā diagnostisko biomarķiera izvērtējums, izmantojot mašīnmācīšanās modeļus

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda "zinātnes doktors (*Ph. D.*)" iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – uroloģija

Rīga, 2026

Promocijas darbs izstrādāts Onkoloģijas un molekulārās ģenētikas institūtā, Rīgas Stradiņa universitātē, Latvijā

Promocijas darba vadītāji:

Dr. sci. asociētā profesore **Miki Nakazawa-Miklaševiča**,
Onkoloģijas un molekulārās ģenētikas institūts, Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. **Juris Plonis**,
Uroloģijas centrs, Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. asociētais profesors **Arvīds Irmejs**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. docente **Aija Geriņa**,
Latvijas Universitāte

Dr. med. **Marius Kinčius**,
Nacionālais vēža institūts, Lietuva

Promocijas padomes priekšsēdētājs:

Dr. med. profesors **Haralds Plaudis**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Promocijas padome:

Dr. med. vadošā pētniece **Elīna Sīviņa**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. asociētais profesors **Artūrs Ozoliņš**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. asociētais profesors **Arvīds Irmejs**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Ph. D. profesors **Mindaugas Jievaltas**,
Lietuvas Veselības zinātņu universitāte

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Klīniskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē 2026. gada 9. novembrī plkst. 13.00 Hipokrāta auditorijā, Dzirciema ielā 16, Rīgas Stradiņa universitātē.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
https://www.rsu.lv/promocijas-darbi

Pētījums izstrādāts ar šādu finansētāju atbalstu:

LiqBio-BC: šķidrās biopsijas biomarķieri urīnpūšļa vēža diagnostikai,
projekts Nr. OSI_PIP_BioPhoT-2025/1-0038;
Valsts pētījumu programma biomedicīnas, medicīnas tehnoloģiju un farmācijas jomā,
projekts Nr. VPP-EM-BIOMEDICĪNA-2022/1-0001;
Latvijas Zinātnes padome, grants Nr. LZP-2020/2-0104;
Rīgas Stradiņa universitātes iekšējais grants Nr. RSU/PP/2020-07.

Satura rādītājs

Darbā izmantotie saīsinājumi 5

Ievads 8

1. Materiāli un metodes 13
   1.1. UV epidemioloģija Latvijā 13
      1.1.1. Pētījuma grupa 13
      1.1.2. Statistiskās metodes 14
   1.2. Urīna eksosomālo miRNAs biomarķieri un to mērķi 15
      1.2.1. Pētījuma grupa un iekļaušanas kritēriji 15
      1.2.2. Klīniskie dati 16
      1.2.3. Urīna paraugu ievākšana un apstrāde 17
      1.2.4. Eksosomu izolācija un RNS ekstrakcija 17
      1.2.5. Reversā transkripcija un reversās transkripcijas kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija (*RT-qPCR, Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*) 17
      1.2.6. RT-qPCR datu analīze 18
      1.2.7. MiRNS mērķu un signālceļu analīze 18
      1.2.8. Pilotdiagnostikas modelis 19
      1.2.9. Mašīnmācīšanās 19

2. Rezultāti 22
   2.1. Saslimstība 22
   2.2. Izplatība un potenciāli zaudēto dzīves gadu skaits 23
   2.3. Mirstība 24
   2.4. Izdzīvotība 25
      2.4.1. Relatīvā izdzīvotība (RS, *Relative Survival*) 25
      2.4.2. Kopējā izdzīvotība (OS, *Overall Survival*) un vēža specifiskā izdzīvotība (CSS, *Cancer-Specific Survival*) 26
   2.5. Pacientu grupas 26
   2.6. Atšķirīgi ekspresētas urīna eksosomu miRNS urīnpūšļa vēža pacientiem 27
   2.7. *TP53* un *PTEN* saistītās eksosomālās miRNS 32
   2.8. Eksosomālo miRNS signālceļu bagātināšanās analīze 33
   2.9. Paaugstinātas ekspresijas miRNS mērķgēnu un to mijiedarbības analīze 34
   2.10. Urīnpūšļa vēža diagnostikas uzlabošana, izmantojot mašīnmācīšanos miRNS ekspresijas un klīnisko datu analīzē 34

Secinājumi 39

Priekšlikumi 40

Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu 41

Literatūras un avotu saraksts 42

Pateicības 44

Darbā izmantotie saīsinājumi

AAPC	vidējā gada procentuālā izmaiņa *(Average Annual Percent Change)*
AKT1	AKT serīna/treonīna kināze 1 *(AKT serine/threonine kinase 1)*
APC	gada procentuālā izmaiņa *(Annual Percent Change)*
ASR	vecumstandartizēts rādītājs *(Age-Standardised Rate)*
AUC	laukums zem līknes *(Area Under the Curve)*
cDNS	komplementārā DNS
CSP	Centrālās statistikas pārvalde
CSS	vēža specifiskā izdzīvotība *(Cancer-Specific Survival)*
CT	cikla slieksnis *(Cycle threshold)*
CTNNB1	Beta-katenīns 1 *(Catenin Beta 1)*
CytoHubba	*Cytoscape* spraudnis centrālo gēnu noteikšanai *(Cytoscape plugin for hub gene identification)*
CytoNCA	*Cytoscape* tīkla centralitātes analīzes spraudnis *(Cytoscape Network Centrality Analysis plugin)*
DCO	tikai miršanas apliecība *(Death Certificate Only)*
DE	atšķirīgi ekspresēts *(Differentially Expressed)*
EGFR	Epidermālā augšanas faktora receptors *(Epidermal Growth Factor Receptor)*
EORTC	Eiropas Vēža izpētes un ārstēšanas organizācija *(European Organisation for Research and Treatment of Cancer)*
EPC	malu perkolētā komponente *(Edge Percolated Component)*
EV	ekstracelulāras vezikulas
FDR	viltus atklājumu īpatsvars *(False Discovery Rate)*
FR	reizes regulācija *(Fold Regulation)*
HG	augsta diferenciācijas pakāpe *(High-Grade)*
KEGG	Kioto gēnu un genomu enciklopēdija *(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)*
LG	zema diferenciācijas pakāpe *(Low-Grade)*
LVM	Lielais valodu modelis

LOOCV	izlaišanas pa vienam savstarpējā validācija *(Leave-One-Out Cross-Validation)*
MCC	maksimālās klikes centralitāte *(Maximal Clique Centrality)*
MI	mākslīgais intelekts
miEAA	miRNS bagātināšanas analīze un anotācija *(miRNA Enrichment Analysis and Annotation)*
miRNS	mikroRNS
MNC	maksimālā kaimiņu komponente *(Maximum Neighbourhood Component)*
MNDR	Zīdītāju nekodējošo RNS un slimību krātuve *(Mammalian ncRNA-Disease Repository)*
mRNS	matrices RNS
MYC	*MYC* protoonkogēns *(MYC proto-oncogene)*
OS	kopējā izdzīvotība *(Overall Survival)*
PCR	polimerāzes ķēdes reakcija *(Polymerase Chain Reaction)*
PTEN	fosfatāzes un tensīna homologs *(Phosphatase and Tensin Homolog)*
PVO	Pasaules Veselības organizācija
RF	nejaušais mežs *(Random Forest)*
RNS	ribonukleīnskābe
ROC	uztvērēja darbības raksturlīkne *(Receiver Operating Characteristic)*
RS	relatīvā izdzīvotība *(Relative Survival)*
RT	reversā transkripcija *(Reverse Transcription)*
RT-qPCR	reversās transkripcijas kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija *(Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction)*
SD	standartnovirze *(Standard Deviation)*
SPKC	Slimību profilakses un kontroles centrs
SSK-10	Starptautiskā slimību klasifikācija, 10. redakcija
STRING	mijiedarbojošos gēnu/proteīnu meklēšanas rīks *(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)*
SVM	atbalsta vektoru mašīna *(Support Vector Machine)*
TI	ticamības intervāls

TNM	audzējs–limfmezgli–metastāzes *(Tumour–Node–Metastasis)*
TP53	audzēja proteīns p53 *(Tumour Protein p53)*
TURBT	transuretrāla urīnpūšļa audzēja rezekcija *(Transurethral Resection of Bladder Tumour)*
UMAP	vienmērīga daudzveidības aproksimācija un projekcija *(Uniform Manifold Approximation and Projection)*
UV	urīnpūšļa vēzis
XGBoost	*Extreme Gradient Boosting*
YPLL	potenciāli zaudētie dzīves gadi (*Years of Potential Life Lost)*

Ievads

Urīnpūšļa vēzis (UV) ir nozīmīga veselības aprūpes problēma un ir desmitais biežāk sastopamais vēzis pasaulē (Bray et al., 2018). Aptuveni 30 % gadījumu UV tiek diagnosticēts vēlīnā stadijā, kad audzējs jau ir ieaudzis muskuļu slānī. To raksturo augsts metastāžu risks un, neraugoties uz jaunām ārstēšanas stratēģijām, tas korelē ar augstiem mirstības rādītājiem (Kaufman et al., 2009; Xie et al., 2017). Turklāt Latvija ieņem 2. vietu aiz Polijas vīriešu mirstības ziņā citu Eiropas valstu vidū (International Agency for Research on Cancer, 2022).

Efektīva UV diagnostika ir būtiska pacienta ārstēšanas rezultātu uzlabošanai, tomēr pašlaik pieejamās neinvazīvās zelta standarta metodes UV diagnostikā un novērošanā acīmredzot nav pietiekamas un tām ir ierobežota jutība. Urīna citoloģijai ir augsta jutība augstas malignitātes pakāpes (HG – *high grade*) audzējos, ieskaitot karcinomu in situ (CIS – *carcinoma in situ*), taču tā var būt negatīva zemas malignitātes pakāpes (LG – *low grade*) audzēja gadījumā (European Association of Urology, 2026), kas var novest pie diagnostikas kļūdām. Savukārt cistoskopija ir salīdzinoši dārga un invazīva diagnostikas metode, neraugoties uz jaunu tehnoloģiju attīstību, piemēram, fluorescenci un šaurjoslas attēlveidošanu (*narrow-band imaging).* Turklāt tā parasti netiek izmantota ikdienas praksē pacientiem bez apakšējo urīnceļu simptomiem vai hematurijas (Hong, 2016).

Eiropas vadlīnijas (European Association of Urology, 2026) ierosina apsvērt atsevišķu specifisku biomarķieru izmantošanu, tomēr galvenā problēma ir tā, ka vairāki neinvazīvi urīna testi nav attaisnojuši klīniskās cerības, jo to diagnostiskais specifiskums ir zemāks nekā urīna citoloģijas testu specifiskums (Crocetto et al., 2022, EAU, 2026) un neviens no tiem nav iekļauts ikdienas praksē nevienās klīniskajās vadlīnijās. Tādēļ ir nepieciešams atrast jaunus UV diagnostikas marķierus, un par tādiem varētu kļūt eksosomālie mikroRNS (miRNS).

Eksosomas ir mazas ekstracelulāras vezikulas (EV) ar diametru no 30 līdz 150 nm, kuras producē dažāda veida šūnas, tostarp audzēja šūnas, un kuras var tikt atrastas dažādos bioloģiskos šķidrumos (Mathieu et al., 2019; Wu et al., 2021). Lai gan vēl nesen eksosomas tika uzskatītas par šūnu atkritumu produktiem, jaunākie pētījumi norāda, ka tās piedalās starpšūnu komunikācijā un tiek arvien biežāk atzītas par nozīmīgiem vēža bioloģijas procesu dalībniekiem (Challagundla et al., 2015).

MiRNS ir mazas, nekodējošas ribonukleīnskābes (RNS), kurām ir pierādīta nozīmīga loma audzēju veidošanās procesā – tumoriģenēzē (Weber et al., 2010). MiRNS darbības pamatā ir saistīšanās ar mērķa matrices RNS (mRNS) 3'-netranslēto apgabalu, tādējādi posttranskripcionāli regulējot gēnu ekspresiju, kas rada mērķa mRNS degradāciju vai to translācijas inhibēšanu (Shukla et al., 2011). Jāatzīmē, ka miRNS uzrāda lielāku stabilitāti

salīdzinājumā ar mRNS dažādos paraugos, tostarp urīnā, padarot tās mazāk uzņēmīgas pret nukleāžu izraisītu degradāciju to nelielā izmēra dēļ (Tilki et al., 2011; Weber et al., 2010).

Turklāt eksosomālās miRNS uzrāda ievērojami lielāku stabilitāti salīdzinājumā ar plazmā esošajām miRNS. Šī raksturīgā stabilitāte ļauj eksosomālajām miRNS izturēt vairākus sasaldēšanas-atkausēšanas ciklus, saglabājoties praktiski neatšķiramām no svaigi iegūtiem paraugiem (Jacob et al., 2018). Ņemot vērā miRNS dubulto lomu audzēja veicināšanā un nomākšanā, tās tiek uzskatītas par perspektīviem biomarķieriem vēža diagnostikā un prognozēšanā (Ling et al., 2016).

Vairākos pētījumos ir meklēti uz miRNS balstīti urīnpūšļa vēža biomarķieri, taču rezultāti reti pārklājas starp kohortām un lielākā daļa miRNS ir minētas tikai vienā vai divos pētījumos. Būtisks izņēmums šajā ziņā ir miR-96-5p (Grimaldi et al., 2022; Aveta et al., 2023). Neskatoties uz šo mainīgumu, nesenā plašā jauktu kohortu pētījumā, izmantojot mašīnmācīšanos, tika izstrādāts seruma miRNS skrīninga modelis, kas sasniedza augstu precizitāti agrīnā urīnpūšļa vēža atklāšanā (Lai et al., 2024); līdzīgi daudzu vēža veidu pētījumi apstiprina cirkulējošo miRNS diagnostisko potenciālu (Wu et al., 2024). Papildus ekspresijas izmaiņām ar recidivējošu urīnpūšļa vēzi saistīts arī miRNS rediģēšanas līmenis, kas var kalpot kā prognostisks vai terapeitisks biomarķieris (Qin et al., 2022).

Pašlaik veiktie pētījumi tiecas novērst iepriekšējo pētījumu trūkumus, integrējot mašīnmācīšanos un mākslīgo intelektu. Viena no efektīvām pieejām ir evolucionārā mašīnmācīšanās metode CancerSig (Yerukala Sathipati et al., 2023), kurā tiek apvienots IBCGA pazīmju atlases algoritms ar atbalsta vektoru mašīnu (*Support Vector Machine* – SVM) klasifikatoru un daudzu vēža veidu miRNS profilu analīze, lai ar augstu precizitāti 15 vēža veidos atšķirtu agrīnas stadijas slimību no progresējušas. Multimodalās stratēģijas ir uzrādījušas līdzīgu potenciālu tieši urīnpūšļa vēža diagnostikā: Moisoiu et al. apvienoja urīna miRNS profilēšanu ar virsmas pastiprināto Ramana izkliedi (*surface enhanced Raman scattering,* (*SERS*)) šķidrās biopsijas kontekstā, ziņojot par uzlabotu tūlītējās aprūpes diagnostiku un molekulāro stratifikāciju (Moisoiu et al., 2022). Šādā kontekstā šajā pētījumā urīna eksosomu miRNS ekspresija mašīnmācīšanās modelī tiek apvienota ar demogrāfiskajiem, laboratorijas un klīniskajiem datiem, izvirzot hipotēzi, ka šo datu avotu apvienošana uzlabo neinvazīvas urīnpūšļa vēža atklāšanas diagnostisko precizitāti.

Lai uzlabotu izpratni par urīnpūšļa šūnu starpšūnu komunikāciju pacientiem ar zemas (LG) un augstas (HG) diferenciācijas pakāpes urīnpūšļa vēzi, kā arī par urīna eksosomu miRNS iespējamo ietekmi uz normālu šūnu onkotransformāciju, tika analizēti atšķirīgi ekspresēto urīna eksosomu miRNS profili. Tika identificētas izteiktas miRNS satura atšķirības eksosomās starp urīnpūšļa vēža grupu un kontrolgrupu. Turklāt miRNS ekspresijas līmeņi tika apvienoti ar

laboratorijas datiem, izmantojot mašīnmācīšanās modeļus, kas parādīja multimodālas pieejas potenciālu uzlabot urīnpūšļa vēža diagnostikas precizitāti. Šāda pieeja var uzlabot diagnostisko sniegumu un nodrošināt plašāku ieskatu audzēja bioloģijā salīdzinājumā ar biopsiju no vienas lokalizācijas, tādējādi veicinot pamatotāku un savlaicīgāku klīnisko lēmumu pieņemšanu.

Darba mērķis

Šī pētījuma mērķis bija analizēt urīnpūšļa vēža epidemioloģiskās tendences Latvijā, kā arī izvērtēt urīna eksosomu miRNS diagnostisko potenciālu kombinācijā ar klīniskajiem un laboratoriskajiem datiem, izmantojot mašīnmācīšanās pieejas, vienlaikus uzlabojot izpratni par urīnpūšļa šūnu savstarpējās komunikācijas mehānismiem pacientiem ar LG un HG urīnpūšļa vēzi, kā arī par urīna eksosomu miRNS iespējamo lomu normālu šūnu onkotransformācijā.

Darba uzdevumi

1. Noteikt urīnpūšļa vēža saslimstības, izplatības un mirstības dinamiku Latvijā no 1990. līdz 2017. gadam kopumā, kā arī sadalījumā pa vecuma un dzimuma grupām.
2. Noteikt urīnpūšļa vēža pacientu kopējās, vēža specifiskās un relatīvās izdzīvotības dinamiku Latvijā no 1990. līdz 2017. gadam.
3. Identificēt atšķirīgi ekspresētus klīniski nozīmīgus urīna eksosomu miRNS biomarķierus un izvērtēt to potenciālos molekulāros mērķus.
4. Izmantot mašīnmācīšanās algoritmus urīna eksosomu miRNS izvērtēšanai kombinācijā ar klīniskajiem un laboratoriskajiem datiem kā multimodālu neinvazīvu sistēmu urīnpūšļa vēža diagnostikā.

Darba hipotēzes

1. Laika posmā no 1990. līdz 2017. gadam Latvijā pieauga urīnpūšļa vēža saslimstība, izplatība un mirstība, savukārt izdzīvotība uzlabojās un samazinājās vēlīnas stadijas gadījumu īpatsvars.
2. Urīna eksosomu miRNS ekspresijā pastāv būtiskas atšķirības starp urīnpūšļa vēža pacientiem un kontrolgrupu.
3. Pastāv nozīmīga atšķirība specifisku urīna eksosomu mikroRNS ekspresijā starp pacientiem ar atšķirīgu audzēja diferenciācijas pakāpi un izplatības stadiju.

Darba novitāte

Šajā darbā tika veikta plaša populācijas līmeņa UV analīze Latvijā no 1990. līdz 2017. gadam. Tika izvērtēti šādi UV epidemioloģiskie rādītāji:

- saslimstības, izplatības un mirstības rādītāji kopumā un sadalījumā pa vecuma grupām;
- relatīvā, kopējā un vēža specifiskā izdzīvotība visā pētījuma periodā un atbilstoši T-stadijai, iekļaujot atsevišķus rādītājus agrīnas un vēlīnās T-stadijas audzējiem, kā arī sadalījumā pa diagnostikas gadiem.

Šie dati papildina un aktualizē esošo informāciju par urīnpūšļa vēža epidemioloģiskajām tendencēm Latvijā.

Latvijas populācijas kohortā tika identificētas atšķirīgi ekspresētas urīna eksosomu mikroRNS starp pētījuma grupu un kontrolgrupu, atklājot potenciālas saistības ar audzējam raksturīgajiem molekulārajiem signālceļiem, kā arī iespējamo iesaisti starpšūnu komunikācijā un onkotransformācijas procesos.

Turklāt šajā pētījumā urīna eksosomu miRNS ekspresijas profili tika integrēti ar klīniskajiem un laboratoriskajiem datiem, izmantojot mašīnmācīšanās pieejas, tādējādi demonstrējot multimodālas neinvazīvas diagnostikas sistēmas potenciālu urīnpūšļa vēža noteikšanā.

Autores ieguldījums

Autore bija atbildīga par pētījuma koncepcijas izstrādi un plānošanu, eksosomu izolāciju no urīna, miRNS profilēšanu, statistisko datu analīzi, rezultātu interpretāciju un promocijas darba rakstīšanu. Autore vadīja urīna paraugu un klīnisko datu ievākšanu Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā sadarbībā ar kolēģiem no Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas, kuri palīdzēja paraugu ievākšanā un klīnisko datu iegūšanā. Mašīnmācīšanās analīze tika veikta sadarbībā ar Rīgas Tehniskās universitātes pētniekiem. Šo pētījumu atbalstīja BioPhoT projekts "Šķidrās biopsijas biomarķieri urīnpūšļa vēža diagnostikai: LiqBio-BC" (projekts Nr. OSI_PIP_BioPhoT-2025/1-0038), Valsts pētījumu programma biomedicīnas, medicīnas tehnoloģiju un farmācijas jomā (Nr. VPP-EM-BIOMEDICĪNA-2022/1-0001), Latvijas Zinātnes padome (grants Nr. LZP-2020/2-0104), kā arī Rīgas Stradiņa universitātes iekšējais grants (Nr. RSU/PP/2020-07). Autore uzņemas atbildību par darba integritāti kopumā.

Mākslīgā intelekta (MI) izmantošanas un lielo valodas modeļu (LVM) paziņojums

Ņemot vērā, ka autorei angļu valoda nav dzimtā valoda, šī promocijas darba gramatisko un stilistisko aspektu pilnveidošanai tika izmantoti uz MI balstīti valodas modeļi un rediģēšanas rīki. Šīs tehnoloģijas veicināja valodas lietojuma un lasāmības uzlabošanu, taču neaizstāja

būtiskās autora funkcijas, piemēram, zinātnisko un medicīnisko atziņu ģenerēšanu un secinājumu izdarīšanu. Autore ir rūpīgi pārskatījusi un pēc nepieciešamības pārstrādājusi manuskriptu, nodrošinot izklāstīto pētījumu patiesumu un integritāti.

1. Materiāli un metodes

Pētījums sastāv no divām daļām: 1) urīnpūšļa vēža (UV) epidemioloģijas apraksts un analīze Latvijā; 2) korelācijas noteikšana starp vairāku specifisku urīna eksosomu mikroRNS relatīvo attiecību un urīnpūšļa vēzi Latvijā, izmantojot molekulāro profilēšanu un mašīnmācīšanās pieejas. Pētījums tika veikts Rīgas Stradiņa universitātes Onkoloģijas un molekulārās ģenētikas institūtā. Epidemioloģiskais pētījums tika apstiprināts Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Attīstības biedrības Klīniskās izpētes ētikas komitejā. Biomarķieru pētījums tika veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju un apstiprināts Latvijas Centrālajā medicīnas ētikas komitejā (protokols Nr. 1/19-02-12, 2019. gada 12. februāris, papildinājums Nr. 01-29.1.2/1352). Pacientu piekrišana urīnpūšļa vēža epidemioloģiskajam pētījumam Latvijā nebija nepieciešama, jo tika izmantoti regulāri apkopoti, anonimizēti elektroniskie dati. Pētījuma otrajā daļā visi dalībnieki sniedza rakstisku informētu piekrišanu.

1.1. UV epidemioloģija Latvijā

1.1.1. Pētījuma grupa

Pirmās daļas ietvaros tika veikts retrospektīvs kohortas pētījums, izmantojot datus par visiem pacientiem, kuriem diagnosticēts urīnpūšļa vēzis saskaņā ar Starptautisko slimību klasifikāciju (SSK-10, C67) no 1990. gada 1. janvāra līdz 2017. gada 31. decembrim. Informācija tika iegūta no Slimību profilakses un kontroles centra (SPKC). Kopumā tika saņemti 13 158 pacientu ieraksti. Pēc 3569 (27,1 %) dubulto reģistrāciju izslēgšanas analīzei tika atlasīti 9589 visu vecumu pacientu ieraksti ar apstiprinātu UV. UV pacienti tika grupēti un kategorizēti 20 gadu vecuma grupās, kurās tika analizēta vecumspecifiskā saslimstība, izplatība, mirstība un izdzīvotība. Tā kā tikai 145 pacienti bija jaunāki par 40 gadiem, šī grupa kā statistiski nenozīmīga tika izslēgta no vecumspecifiskās tendenču analīzes, kā rezultātā tika izveidotas šādas analīzes grupas: 40–59, 60–79 un 80+. Gadījumi, kas reģistrēti tikai pēc nāves apliecības (DCO – *death certificate only*) vai diagnosticēti *post mortem* (n = 392), tika izslēgti no izdzīvotības analīzes.

Stadijspecifiskajā saslimstības un izdzīvotības tendenču analīzē tika iekļautas šādas primārā audzēja stadijas: T1, T2, T3 un T4. Latvijas iedzīvotāju UV specifiskās saslimstības, izplatības un mirstības rādītāji tika aprēķināti kā gadījumi uz 100 000 iedzīvotāju. Šie aprēķini tika veikti, pamatojoties uz Latvijas Centrālās statistikas pārvaldes (CSP) datiem, kas atjaunināti 2018. gadā (pēc jaunākās Iedzīvotāju un mājokļu skaitīšanas 2011. gadā), kuri sniedza informāciju par Latvijas iedzīvotāju skaita un vecuma struktūras izmaiņām, kā arī gada kopējiem mirstības rādītājiem, kas pieejami tīmekļa vietnē http://www.csb.gov.lv/dati/statistikas-datubazes-28270.html (Central Statistical Bureau of Latvia, 2011).

Pēc tam vēža rādītāji tika standartizēti pēc vecuma atbilstoši Pasaules Veselības organizācijas (PVO) standarta populācijai 2000. gadā (Ahmad et al., 2001). Relatīvās izdzīvotības rādītāja aprēķināšanai dzīvildzes tabula Latvijas iedzīvotājiem tika lejupielādēta no Cilvēku mirstības datubāzes (izmantojot CSP datus).

1.1.2. Statistiskās metodes

Visi datu analīzes aprēķini tika veikti, izmantojot SPSS programmatūru (versija 22.0, IBM Corp., ASV). Aprakstošā statistika tika attēlota kā biežums un procentuālā daļa kategoriju mainīgajiem, un kā vidējā vērtība ± standartnovirze (SD, *standard deviation*) nepārtrauktajiem mainīgajiem. Lai izvairītos no svārstībām starp gadiem, vecuma un izdzīvotības salīdzinājumi tika grupēti trīs gadu periodos. Kvantitatīvajiem datiem tika izmantots Manna–Vitnija U tests (*Mann–Whitney U test*), bet kvalitatīvajiem mainīgajiem – hī kvadrāta tests (*chi-square test*).

Tendenču analīze tika veikta, izmantojot *Joinpoint* regresijas analīzes programmu (*Joinpoint Regression Analysis*, versija 4.6.0.0, 2018. gada aprīlis, *Surveillance Research Program*, ASV Nacionālais vēža institūts). *Joinpoint* programmatūra identificē statistiski nozīmīgu tendenču izmaiņu skaitu un atrašanās vietu (*joinpoints*). Vecumstandartizētajiem rādītājiem (ASR, *age-standardised rates*) – vīriešiem, sievietēm un kopā, kā arī visām vecuma grupām – tika veikta logaritmiskā transformācija. Optimālā pievienošanās punktu skaita izvēlei tika izmantota Montekarlo permutācijas metode (*Monte Carlo permutation method*) (diapazons: 0–4; nozīmīguma līmenis $p = 0,05$; 4499 nejauši permutētas datu kopas) (Kim et al., 2000). Katram lineārajam segmentam tika aprēķināta gada procentuālā izmaiņa (APC, *annual percent change*) un vidējā APC (AAPC, *average APC*); tendence tika uzskatīta par statistiski nozīmīgu, ja $p < 0,05$.

Izdzīvotības analīzei tika atlasīta UV pacientu kohorta ar vismaz piecu gadu novērošanas periodu, un pacienti tika stratificēti septiņos laika periodos. Relatīvā izdzīvotība (RS, *relative survival*) tika aprēķināta, izmantojot R statistikas programmu (versija 4.0.3, R *Foundation for Statistical Computing*, Austrija) un pakotni *relsurv*. Paredzamā izdzīvotība tika iegūta no Latvijas iedzīvotāju dzīvildzes tabulām (Cilvēku mirstības datubāze, Latvijas CSP). Piecu gadu RS 1990.–2012. gada datiem tika aprēķināta, izmantojot kohortas analīzi pēc Ederera I metodes; 2013.–2017. gada datiem tika izmantota Ederera II metode. Kopējā izdzīvotība (OS, *overall survival*) un vēža specifiskā izdzīvotība (CSS, *cancer-specific survival*) tika analizētas, izmantojot Kaplana–Meiera līknes (*Kaplan-Meier curves*) ar Log-rank testu, ar novērošanas periodu no diagnozes noteikšanas datuma līdz nāvei, cenzēšanai vai 2017. gada 31. decembrim.

1.2. Urīna eksosomālo miRNAs biomarķieri un to mērķi

1.2.1. Pētījuma grupa un iekļaušanas kritēriji

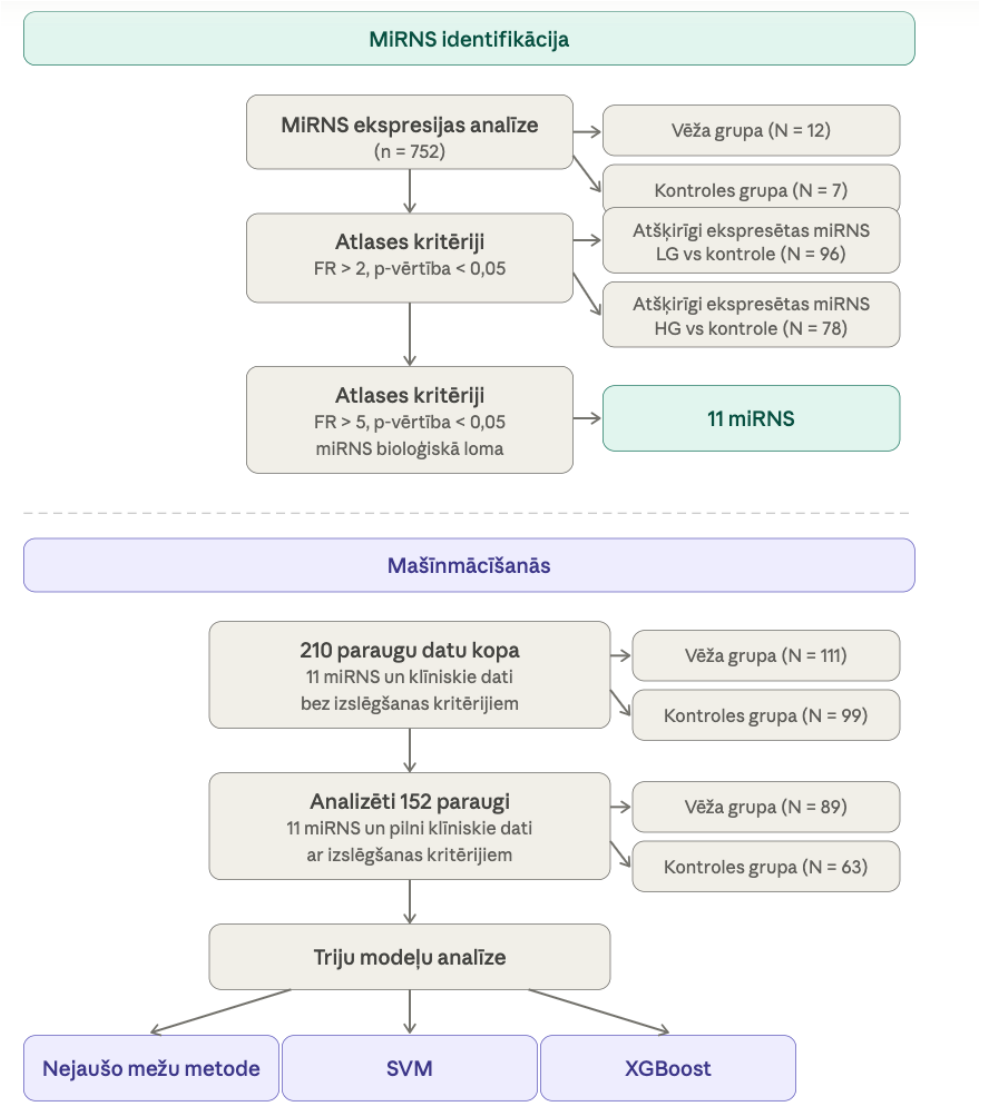
No 2019. līdz 2024. gadam urīna paraugi tika prospektīvi ievākti no urīnpūšļa vēža pacientiem un kontrolgrupas dalībniekiem Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā un Rīgas Austrumu klīniskajā universitātes slimnīcā. Dalībnieki tika iedalīti trīs grupās*:* LG UV (histoloģiski apstiprināts Ta vai T1 audzējs), HG UV (T2 audzējs) un veselas kontroles personas. Stadijas noteikšana un pakāpes gradēšana tika veikta saskaņā ar TNM klasifikācijas sistēmu un 2022. gada PVO kritērijiem.

1.1. tabula

Pētījuma iekļaušanas un izslēgšanas kritēriji

Kritērijs	Urīnpūšļa vēža grupa	Kontrolgrupa
Iekļaušana	vecums ≥ 50 gadi; histopatoloģiski apstiprināts primārs vai recidivējošs UV pēc TURBT vai cistektomijas; nav iepriekšējas sistēmiskas ķīmijterapijas; parakstīta informēta piekrišana; pieejama medicīniskā dokumentācija	pēc vecuma saskaņoti (ar UV grupu); nav onkoloģisko slimību anamnēzē; urīna analīze bez iekaisuma vai infekcijas pazīmēm; nav būtisku asins analīžu noviržu; parakstīta informēta piekrišana; pieejama medicīniskā dokumentācija
Izslēgšana	jebkura cita onkoloģiska slimība vai iepriekšējs augšējo urīnceļu vēzis; cukura diabēts; iekaisuma vai autoimūna slimība; infekcija ārpus urīnceļiem	jebkura cita onkoloģiska slimība vai iepriekšējs augšējo urīnceļu vēzis; cukura diabēts; iekaisuma vai autoimūna slimība; infekcija ārpus urīnceļiem

Atklāšanas mikroRNS profilēšanas kohortu veidoja 7 veseli kontroles indivīdi, 6 LG pacienti un 6 HG pacienti. Sākotnējā 210 dalībnieku kohortā (111 UV pacienti un 99 kontroles) tika noteiktas atšķirīgi ekspresētās urīna eksosomu mikroRNS. Mašīnmācīšanās analīzē tika iekļauti tikai dalībnieki ar pilnīgiem klīniskajiem datiem, kā rezultātā galīgo analīzes kohortu veidoja 152 dalībnieki (89 UV pacienti un 63 kontroles); visas trīs mašīnmācīšanās konfigurācijas tika apmācītas un izvērtētas šajā 152 dalībnieku kohortā. (1.1. attēls)



1.1. attēls. **Datu analīzes plūsmas shēma.**

FR – *fold regulation* (ekspresijas izmaiņu koeficients); SVM – *support vector machine* (atbalsta vektoru mašīna); XGBoost – *extreme gradient boosting* (ekstrēmā gradienta pastiprinājuma metode).

1.2.2. Klīniskie dati

Klīniskie un demogrāfiskie dati tika prospektīvi iegūti no pacientu medicīniskās dokumentācijas un ievadīti speciāli izveidotā datubāzē. Datubāze ietvēra: klīniski patoloģiskās īpašības; saņemto ķirurģisko ārstēšanu; ķīmijterapiju; laboratorisko izmeklējumu rezultātus; ģimenes anamnēzi; kā arī smēķēšanas un profesionālās iedarbības vēsturi. Ta un T1 stadijas pacientiem tika izmantots Eiropas Vēža izpētes un ārstēšanas organizācijas (EORTC, *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) riska kalkulators recidīva un progresijas prognozēšanai. Kontrolgrupas dalībniekiem pirms iekļaušanas pētījumā tika piedāvāta neinvazīva urīnceļu ultraskaņas izmeklēšana. Urīna paraugi urīna analīzei, citoloģijai un miRNS profilēšanai tika iegūti no visiem UV pacientiem pirms operācijas; kontrolgrupas urīna paraugi tika ievākti tikai urīna analīzei un miRNS profilēšanai.

1.2.3. Urīna paraugu ievākšana un apstrāde

Spontāni izdalīti urīna paraugi tika ievākti no visiem pētījuma dalībniekiem. Ja tūlītēja apstrāde nebija iespējama, paraugi tika uzglabāti 4 °C temperatūrā līdz 24 stundām. Paraugi tika centrifugēti pie 3,0 rcf (4,4 rpm) 5 minūtes un 30 sekundes istabas temperatūrā, lai noņemtu šūnu fragmentus. Iegūtais supernatants tika sadalīts alikvotās un uzglabāts −80°C temperatūrā līdz analīzei.

1.2.4. Eksosomu izolācija un RNS ekstrakcija

Eksosomu izolēšana tika veikta saskaņā ar *miRCURY Exosome Cell/Urine/CSF Kit* protokolu (*Qiagen*, Hildena, Vācija; kat. Nr. 76743). Uzglabātie paraugi tika atkausēti uz ledus un pakļauti otrai centrifugēšanai pie 10 000 × g 10 minūtes istabas temperatūrā, lai noņemtu atlikušos šūnu fragmentus. Pēc tam eksosomas tika izolētas no 1960 µL urīna supernatanta, kas sadalīts divos stobriņos.

Kopējā RNS, tostarp miRNS, tika izdalīta no urīna eksosomām, izmantojot *miRNeasy Mini Kit* (*Qiagen*, Hildena, Vācija; kat. Nr. 17004) saskaņā ar ražotāja protokolu. Katram paraugam izolēšanas kvalitātes kontrolei tika pievienots sintētisks UniSp2, UniSp4 un UniSp5 RNS maisījums (Qiagen, ASV; kat. Nr. 339390). Attīrītā RNS tika eluēta vienā solī ar 50 µL no RNāzes brīva ūdens.

1.2.5. Reversā transkripcija un reversās transkripcijas kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija (*RT-qPCR, Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RNS reversā transkripcija un poliadenilācija par komplementāro DNS (cDNS) tika veikta, izmantojot *miRCURY LNA RT Kit* (*Qiagen*, ASV; kat. Nr. 339340) ar UniSp6 *spike-in* procesa kvalitātes kontrolei. Inkubācija tika veikta, izmantojot peqSTAR termocikleru: 42 °C 60 minūtes, 95 °C 5 minūtes, uzturēšana 4 °C temperatūrā. Lai uzlabotu jutību, tika izmantots palielināts RNS veidnes apjoms – 4 µL (standarta 2 µL vietā).

Atklāšanas fāzē genoma mēroga miRNS profilēšana tika veikta, izmantojot *miRCURY LNA miRNA miRNome Pre-designed PCR Panels* (*Qiagen*; kat. Nr. 339322). Mašīnmācīšanās fāzē tika izmantots pielāgots iepriekš izstrādāts panelis (*miRCURY LNA miRNA Custom PCR Panel YCA34464; Qiagen*; kat. Nr. 339330/339332), kas paredzēts 11 kandidāt-miRNS noteikšanai (skat. 1.2. tabulu). Abās fāzēs tika izmantots *miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit* (*Qiagen*, ASV; kat. Nr. 339347). RT-qPCR tika veikta, izmantojot *Applied Biosystems ViiA 7* reālā laika PCR sistēmu. Automātiskie sliekšņa un bāzlīnijas iestatījumi tika izmantoti, lai reģistrētu cikla slieksņa (CT*, cycle threshold*) vērtības visām miRNS.

1.2. tabula

MiRCURY LNA miRNA Custom PCR Panel YCA34464 konfigurācija

Pozīcija	Testa *(Assay)* nosaukums
A01-A24	UniSp6
B01-B24	UniSp3
C01-C24	UniSp2
D01-D24	UniSp5
E01-E24	hsa-miR-30c-5p
F01-F24	hsa-miR-126-3p
G01-G24	hsa-miR-1260a
H01-H24	hsa-miR-20a-3p
I01-I24	hsa-miR-28-3p
J01-J24	hsa-miR-28-5p
K01-K24	hsa-miR-30b-3p
L01-L24	hsa-miR-324-5p
M01-M24	hsa-miR-339-5p
N01-N24	hsa-miR-429
O01-O24	hsa-miR-455-3p
P01-P24	hsa-miR-502-5p

1.2.6. RT-qPCR datu analīze

RT-qPCR dati no miRNS paneļiem tika apstrādāti, izmantojot *miRCURY miRNA PCR Data Analysis* programmatūru (versija 1.0). Datu normalizācija tika veikta, izmantojot globālās vidējās vērtības normalizācijas metodi. Atšķirības miRNS ekspresijas līmeņos starp kontrolgrupu un vēža grupu tika novērtētas, aprēķinot p-vērtības, pamatojoties uz parametrisko Stjūdenta t-testu (*Student's t-test*) no replikātu $2^{-\Delta CT}$ vērtībām (divu izlašu ar vienādu dispersiju, nesaistīts, divpusējs sadalījums). Algoritms *geNorm*, kas ir integrēts miRCURY analīzes programmatūrā, tika izmantots, lai identificētu stabilākās iekšējās kontroles miRNS. Minimālais izlases lielums miRNS panelim tika aprēķināts, pamatojoties uz Lī un Vitmora (*Lee & Whitmore*, 2002) metodiku: statistiskā jauda 90 %, divu reižu atšķirību noteikšana aptuveni 700 miRNS, nozīmīguma līmenis $\alpha = 0{,}05$; minimālais $n = 5$ katrā grupā.

Atšķirīgi ekspresētās miRNS LG un HG grupā tika salīdzinātas ar kontrolgrupu un filtrētas pēc ekspresijas izmaiņu koeficienta un p-vērtības sliekšņa.

1.2.7. MiRNS mērķu un signālceļu analīze

Statistiski nozīmīgi atšķirīgi ekspresēto miRNS saraksti tika iesniegti miEAA (*miRNA Enrichment Analysis and Annotation*) platformā miRNS bagātināšanas analīzei (Kern et al., 2020). Rezultāti tika filtrēti pēc nepatiesās atklāšanas rādītāja (FDR, *false discovery rate*), un tika atlasītas 5 apakškategorijas ar lielāko novēroto miRNS skaitu. MiRNS mērķu prognozēšana tika veikta, izmantojot miRTargetLink 2.0, piemērojot stingrus validācijas kritērijus (Kern et al., 2021). Prognozēto mērķgēnu olbaltumvielu savstarpējās mijiedarbības tīkli (*protein–protein interaction network*) tika konstruēti un vizualizēti, izmantojot *STRING*

(Szklarczyk et al., 2021). Galveno mezglu analīze tika veikta *Cytoscape* vidē (Shannon et al., 2003), izmantojot *Cytoscape* tīkla centralitātes analīzes spraudni (*CytoNCA*, *Cytoscape Network Centrality Analysis plugin*) un Cytoscape galveno gēnu identifikācijas spraudni (*CytoHubba*, *Cytoscape plugin for hub gene identification*) (Tang et al., 2015) ar šādiem centralitātes rādītājiem: pakāpe, starpniecība, tuvums un īpašvektors (CytoNCA); malu perkolācijas komponents (EPC, *Edge Percolated Component*), maksimālā klikas centralitāte (MCC, *Maximal Clique Centrality*), maksimālais kaimiņu komponents (MNC*, Maximum Neighbourhood Component*) un stress (*CytoHubba*).

1.2.8. Pilotdiagnostikas modelis

Pirms galvenās mašīnmācīšanās analīzes tika izveidots pilota neironu tīkla modelis (pakotne *caret*, vide R), izmantojot datus par 23 kontroles personām un 32 UV pacientiem, kā arī 9 atšķirīgi ekspresētas (DE, differentially expressed) miRNS (ekspresijas izmaiņu koeficients > 3 LG vai HG grupā; $p < 0,05$) un 3 atsauces miRNS (vienādi ekspresētas UV pacientiem un kontrolēm, izmantojot *NormFinder*). Delta CT vērtības (normalizācijas miRNS CT − mērķa miRNS CT) tika aprēķinātas katrai miRNS. Sešu DE miRNS kombinācija (miR-429, miR-30b-3p, miR-126-3p, miR-28-5p, miR-324-5p un miR-455-3p), normalizēta pret miR-1260a, nodrošināja precizitāti 0,889 (95 % CI 0,653–0,986), jutību 0,800 un specifiskumu 1,000 ($p = 0,003$). Tāpēc šīs panelis tika izvēlēts tālākai izmantošanai pilnajā mašīnmācīšanās analīzē.

1.2.9. Mašīnmācīšanās

Datu kopa un pazīmes

Mašīnmācīšanās datu kopa ietvēra miRNS ekspresijas līmeņus 11 kandidātmiRNS sākotnējā 210 dalībnieku kohortā (111 UV pacienti, 99 kontroles) atšķirīgās ekspresijas analīzei. Mašīnmācīšanās analīzei tika iekļauti tikai dalībnieki ar pilnīgiem klīniskajiem datiem, kā rezultātā galīgo analīzes kohortu veidoja 152 dalībnieki (89 UV pacienti, 63 kontroles); visas trīs mašīnmācīšanās konfigurācijas tika apmācītas un izvērtētas šajā 152 dalībnieku kohortā. Kombinētā pazīmju kopa ietvēra 24 mainīgos: 11 miRNS ekspresijas līmeņus un 13 klīniskos/demogrāfiskos mainīgos.

Modelēšanā izmantotie 13 klīniskie mainīgie bija:

- Demogrāfiskie: vecums (gadi), dzimums, svars (kg), augums (cm)
- Urīna analīze: eritrocitūrija, leikocitūrija, nitrītu tests (teststrēmele)
- Riska faktori: smēķēšanas anamnēze (pašreizējais/bijušais smēķētājs), aromātisko amīnu iedarbība

- Simptomi/anamnēze: dizūrija, hroniska urīnceļu infekcija, ģimenes onkoloģiskā anamnēze
- un izslēgšanas kritēriju indikators kā binārais kovariants.

Trūkstošās asins kreatinīna vērtības tika imputētas, izmantojot attiecīgās grupas (vēža vai kontroles) vidējo vērtību; uzlabotas imputācijas metodes tika apsvērtas, taču netika pielietotas pārmērīgas pielāgošanās (*overfitting*) riska dēļ mazākās datu kopās.

Mašīnmācīšanās algoritmi un hiperparametru optimizācija

Tika izvērtēti trīs papildinoši mašīnmācīšanās klasifikatori, katram ar atšķirīgām metodoloģiskajām priekšrocībām, kas piemērotas vidēja izmēra biomedicīnas datiem:

- Nejaušo mežu metode (RF, *Random Forest*): lēmumu koku ansamblis, kas izmanto sāknēšanas apkopošanu (*bootstrap aggregation* [bagging]), lai samazinātu pārmērīgu pielāgošanos; uztver nelineārās mijiedarbības un nodrošina iebūvētu pazīmju nozīmīguma ranžēšanu.
- Atbalsta vektoru mašīna (SVM, *Support Vector Machine*): identificē optimālo hiperplakni, kas maksimizē atstarpi starp klasēm; efektīva ar augstdimensiju datiem un mazākām izlasēm, pateicoties fokusam uz visnoderīgākajiem atbalsta vektoriem, padarot to mazāk pakļautu pārmērīgai pielāgošanai.
- XGBoost (*Extreme Gradient Boosting*): lēmumu koku ansambli veido secīgi, katram kokam labojot iepriekšējā kļūdas; natīvi apstrādā trūkstošās vērtības un sasniedz augstu precizitāti, izmantojot uz gradientu balstītu optimizāciju.

Lai maksimizētu modeļu efektivitāti, tika veikta hiperparametru regulēšana, koncentrējoties uz šādiem parametriem: *n_estimators* un *max_depth* nejaušo mežu metodei un XGBoost; *C* un *gamma* atbalsta vektoru mašīnai. *N_estimators* parametram tika testēti diapazoni no 5 līdz 105 ar soli 20 sākotnējās aptuvenas meklēšanas laikā, pēc tam precizēti līdz 80–90 ar soli 1 smalkajai regulēšanai (*fine-tuning*). *Max_depth* parametram tika testēti diapazoni no 3 līdz 50 ar soli 10 sākotnējās meklēšanas laikā, pēc tam precizēti līdz 3–10 ar soli 1. Atbalsta vektoru mašīnai diapazoni bija šādi: *C* [0,1–10], *gamma* [0,001–1].

Pazīmju nozīmīgums (feature importance) un dimensionalitātes redukcija

Pazīmju nozīmīgums tika novērtēts katram klasifikatoram, lai identificētu mainīgos ar vislielāko diskriminējošo spēju. Nejaušo mežu metodei tika izmantots vidējais Džini piemaisījuma samazinājums (*mean decrease in Gini impurity*). Atbalsta vektoru mašīnai tika pielietotas pazīmju svara vērtības, kas iegūtas no lineārā kodola koeficientiem. XGBoost metodei tika aprēķināti uz ieguvumu balstīti pazīmju nozīmīguma rādītāji. Rezultāti tika salīdzināti visos trijos klasifikatoros, lai identificētu konsekventi nozīmīgus prediktorus.

Lai vizualizētu vēža un kontrolgrupu atdalāmību divdimensiju telpā, kombinētajai datu kopai tika pielietota vienmērīgā kolektora aproksimācijas un projekcijas (UMAP, *Uniform Manifold Approximation and Projection*) dimensionalitātes samazināšanas metode, izmantojot Žakāra (Jaccard) attāluma metriku. UMAP saglabā gan lokālo, gan globālo datu struktūru un tā tika izmantota kā papildinošs vizuāls klasifikatora veiktspējas apstiprinājums.

Visas mašīnmācīšanās analīzes tika veiktas programmēšanas valodā *Python*. Visus mākslīgā intelekta ģenerētos ieguldījumus rūpīgi pārskatīja un apstiprināja medicīnas eksperti, lai nodrošinātu precizitāti un atbilstību zinātniskajiem standartiem.

Modeļa novērtēšana un validācija

Modeļa efektivitāte katrai hiperparametru kombinācijai tika novērtēta ar atstāj-vienu-ārā šķērspārbaudi (LOOCV, *Leave-One-Out Cross-Validation*), izmantojot paralēlo apstrādi. Lai nodrošinātu rezultātu stabilitāti un neatkarību no nejaušas inicializācijas, katrs modelis tika apmācīts un novērtēts 20 reizes, izmantojot dažādas nejaušās sēklas (*random seeds*). Efektivitātes rādītāji tika vidēji aprēķināti visās 20 atkārtošanas reizēs, apstiprinot, ka modeļa efektivitāte nav atkarīga no kādas konkrētas nejaušās sēklas. Tika aprēķināti šādi efektivitātes rādītāji: precizitāte; jutība (*Recall*); specifiskums; F1 rādītājs; laukums zem līknes (AUC, *Area Under the Curve*).

Katram klasifikatoram uz vienas un tās pašas 152 dalībnieku kohortas tika novērtētas trīs modeļa konfigurācijas: (1) tikai miRNS ekspresijas dati; (2) tikai klīniskie un demogrāfiskie dati; (3) kombinētie miRNS + klīniskie dati.

2. Rezultāti

Laika periodā no 1990. līdz 2017. gadam tika identificēti 9589 pacienti ar jaundiagnosticētu UV (75 % vīrieši, 25 % sievietes; dzimumu attiecība 3:1). Vidējais vecums diagnozes noteikšanas brīdī bija 68,8 gadi (SD 11,5; vīriešiem 67,8, sievietēm 72,0) un pētījuma periodā statistiski nozīmīgi pieauga no 67,6 līdz 71,2 gadiem ($p < 0,001$), ko galvenokārt noteica vīriešu apakšgrupa. No 7182 pacientiem, kuri nomira pārskata periodā, 67 % (n = 4790) nāves cēlonis bija saistīts ar UV; vidējais nāves vecums pieauga no 71,3 (SD 11,0) līdz 76,0 (SD 9,4) gadiem.

2.1. Saslimstība

Kopējie vecumstandartizētie saslimstības rādītāji (ASR – *Age-Standardised Rate*; uz 100 000 iedzīvotāju) ar UV pakāpeniski pieauga no 6,8 (1990. gadā) līdz 10,8 (2017. gadā), vīriešiem – no 15,1 līdz 21,5, sievietēm – no 1,9 līdz 3,9. Tika novērots viens pārliekuma punkts (*joinpoint*), kas norāda uz vienu periodu ar statistiski nozīmīgu APC: 2,6 % no 1990. līdz 2014. gadam, kam sekoja statistiski nenozīmīgs samazinājums −3,6 % no 2014. līdz 2017. gadam (2.1. tabula). Pārliekuma punktu analīze uzrādīja nozīmīgu standartizētā saslimstības rādītāja pieauguma tendenci abiem dzimumiem (Wong et al., 2018). Saslimstības rādītāju APC visās vecuma grupās pārskata periodā saglabājās stabils; lielākais APC – 2,6 % – reģistrēts > 80 gadu vecuma grupā (no 1990. līdz 2017. gadam). Audzēja stadijas griezumā lielākais APC novērots T1 apakšgrupā (+8,0 % visā periodā; pārliekuma punkts 2013. gadā), savukārt T3 stadijas saslimstība statistiski nozīmīgi samazinājās (APC −2,3 % no 1995. līdz 2017. gadam).

2.1. tabula

Urīnpūšļa vēža saslimstības un mirstības tendences Latvijā 1990.–2017. gadā
(pārliekuma punktu analīze: vecumstandartizēti, sadalījumā pēc vecuma, dzimuma un stadijas grupām)

	1. tendence		2. tendence		AAPC (95 % TI)
	Gadi	**APC**	**Gadi**	**APC**	**1990-2017**
Incidence	1990–2014	2.6*	2014–2017	−3.6	1.9* (0.9 to 2.9)
Dzimums					
Vīriešu	1990–2017	2.1*			2.1* (2.5 to 10.1)
Sieviešu	1990–2017	2.7*			2.7* (2.0 to 3.5)
Vecuma grupas, gadi					
40–59	1990–2017	1.7*			1.7* (0.8 to 2.5)
60–79	1990–2017	2.5*			2.5* (2.1 to 2.8)
80+	1990–2017	2.6*			2.6* (2.0 to 3.1)
T stadija					
1	1990–2013	9.7*	2013–2017	−1.3	8.0* (6.9 to 9.7)
2	1990–2017	0.4			0.4 (−0.3 to 1.1)
3	1990–1995	6.9	1995–2017	−2.3*	−0.7 (−2.2 to 0.9)
4	1990–2017	1.3*			1.3* (0.2 to 2.5)

2.1. tabulas turpinājums

	1. tendence		2. tendence		AAPC (95 % TI)
	Gadi	**APC**	**Gadi**	**APC**	**1990-2017**
Mirstība	1990–2017	0.5*			0.5*(0.1 to 0.9)
Dzimums					
Vīriešu	1990–2017	0.5*			0.5* (0.1 to 1.0)
Sieviešu	1990–2017	0.2			0.2 (−0.8 to 1.3)
Vecuma grupas, gadi					
40–59	1990–2017	−1.1*			−1.1* (−2.2 to −0.1)
60–79		0.7*			0.7* (0.2 to 1.3)
80+		1.9*			1.9* (1.2 to 2.5)

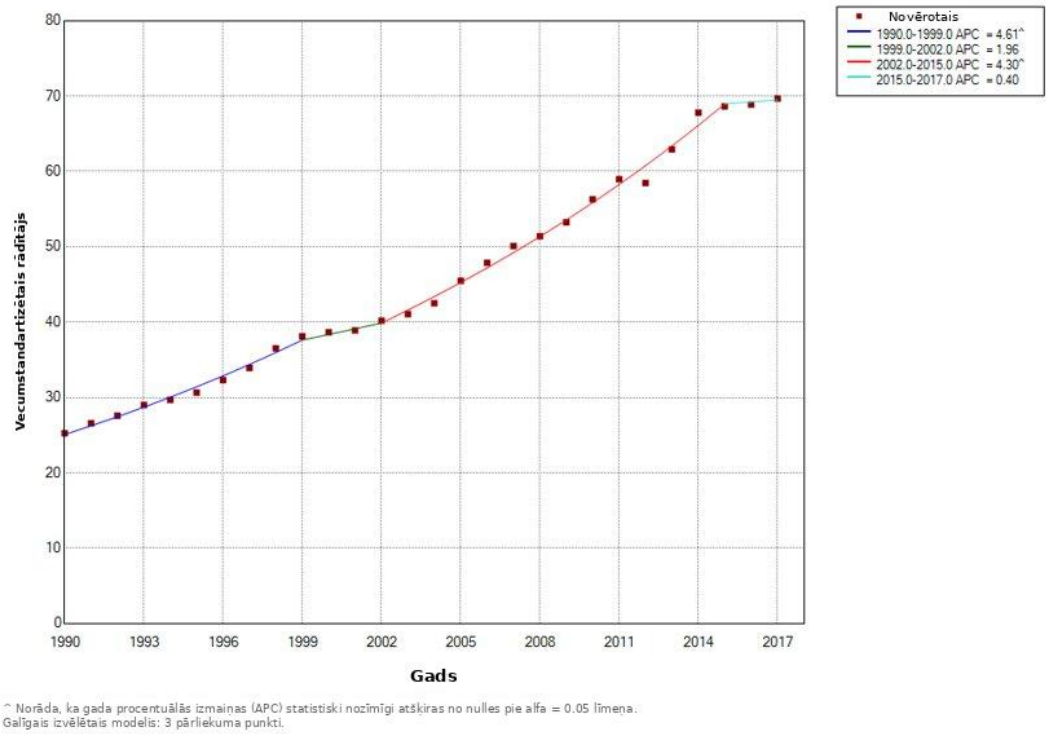
APC – gada procentuālā izmaiņa; AAPC – vidējā gada procentuālā izmaiņa; ASR vecumstandartizētais rādītājs uz 100 000 iedzīvotājiem.

*p < 0,05.

2.2. Izplatība un potenciāli zaudēto dzīves gadu skaits

Pārskata perioda sākumā UV izplatības gadījumu skaits bija 969; līdz 2017. gadam tas gandrīz trīskāršojās, sasniedzot 2834 gadījumus. Pārskata periodā lielākais pacientu skaits pa vecuma grupām 2017. gadā bija 80+ gadu vecuma grupā ar 720 gadījumiem (25 %) un 60–79 gadu vecuma grupā ar 1689 gadījumiem (60 %). Sadalot pacientus pēc dzimuma, 2017. gadā vīrieši veidoja 72 % (n = 2 030) un sievietes – 28 % (n = 804) no kopējā izplatības gadījumu skaita.

Standartizētie izplatības rādītāji (uz 100 000 iedzīvotāju) pieauga no 25,2 (1990. gadā) līdz 69,7 (2017. gadā), ar AAPC 3,8 % (95 % TI: 3,1–4,6) visā periodā, un tika novēroti trīs infleksijas punkti – 1999., 2002. un 2015. gadā (2.1. attēls). UV izplatība 1990. gadā bija 25,2 (uz 100 000 iedzīvotāju gadā), kas ir zemākā vērtība aplūkotajā laika periodā. Statistiski nozīmīgs izplatības pieaugums tika novērots no 1990. līdz 1999. gadam (APC 4,6), sasniedzot izplatību 38,1 (uz 100 000 iedzīvotāju gadā) 1999. gadā. Pēc tam no 1999. līdz 2002. gadam statistiski nozīmīgs izplatības pieaugums netika novērots. No 2002. līdz 2015. gadam tika konstatēts statistiski nozīmīgs izplatības pieaugums, sasniedzot 68,6 (uz 100 000 iedzīvotāju gadā) 2015. gadā ar APC 4,3. Pēc tam līdz 2017. gadam statistiski nozīmīgs pieaugums netika novērots (2.1. attēls).



2.1. attēls. **Urīnpūšļa vēža izplatības tendences, izmantojot *pārliekuma punktu* analīzi**

Abiem dzimumiem visā pētījuma periodā tika novērots standartizēto izplatības rādītāju (uz 100 000 iedzīvotāju) pieaugums (vīrieši: no 53,4 (1990. gadā) līdz 132,5 (2017. gadā); sievietes: no 8,9 (1990. gadā) līdz 29,2 (2017. gadā)). Statistiski nozīmīgs samazinājums ar APC −7,6 % no 2013. līdz 2017. gadam tika novērots tikai 80+ gadu vecuma grupā.

Kopējais potenciāli zaudēto dzīves gadu (YPLL – *years of potential life lost*) skaits UV dēļ Latvijā 28 gadu laikā bija 7450. Salīdzinot YPLL pa periodiem, no 1990. līdz 1992. gadam tika zaudēti 959 gadi (12,1 uz 100 000 vispārējās populācijas), kas pēc tam samazinājās līdz 474 gadiem (7,9 uz 100 000) no 2015. līdz 2017. gadam. Katrs cilvēks, kurš nomira UV dēļ perioda sākumā, vidēji zaudēja 8 dzīves gadus, savukārt perioda beigās šis rādītājs samazinājās līdz 6,5 gadiem.

2.3. Mirstība

UV pacientu ikgadējais nāves gadījumu skaits pieauga no 186 (1990. gadā) līdz 360 (2017. gadā). Vēža specifiskie nāves gadījumi tajā pašā periodā pieauga no 155 līdz 208 gadījumiem gadā.

Standartizētie kopējie mirstības rādītāji (uz 100 000 iedzīvotāju) pieauga no 4,6 (1990. gadā) līdz 7,0 (2017. gadā). Sievietes un 40–59 gadu vecuma grupa bija vienīgās, kurās tika novērots statistiski nenozīmīgs minimāls mirstības pieaugums (2.1. tabula).

Kopējie UV specifiskie vecumstandartizētie mirstības rādītāji (uz 100 000 iedzīvotāju) pieauga no 3,9 (vīriešiem – 8,5, sievietēm – 1,3) 1990. gadā līdz 4,4 (vīriešiem – 9,7, sievietēm – 1,2) 2017. gadā. Kopumā šie rādītāji uzrādīja nelielu pieaugumu ar APC 0,5 %

(2.1. tabula) un statistiski nozīmīgi samazinājās 40–59 gadu vecuma grupā ar APC −1,1 % no 1990. līdz 2017. gadam. Tomēr UV mirstības rādītāji nozīmīgi pieauga > 80 gadu vecuma grupā (APC 1,9 %, 95 % TI: 1,2–2,5) (2.1. tabula).

2.4. Izdzīvotība

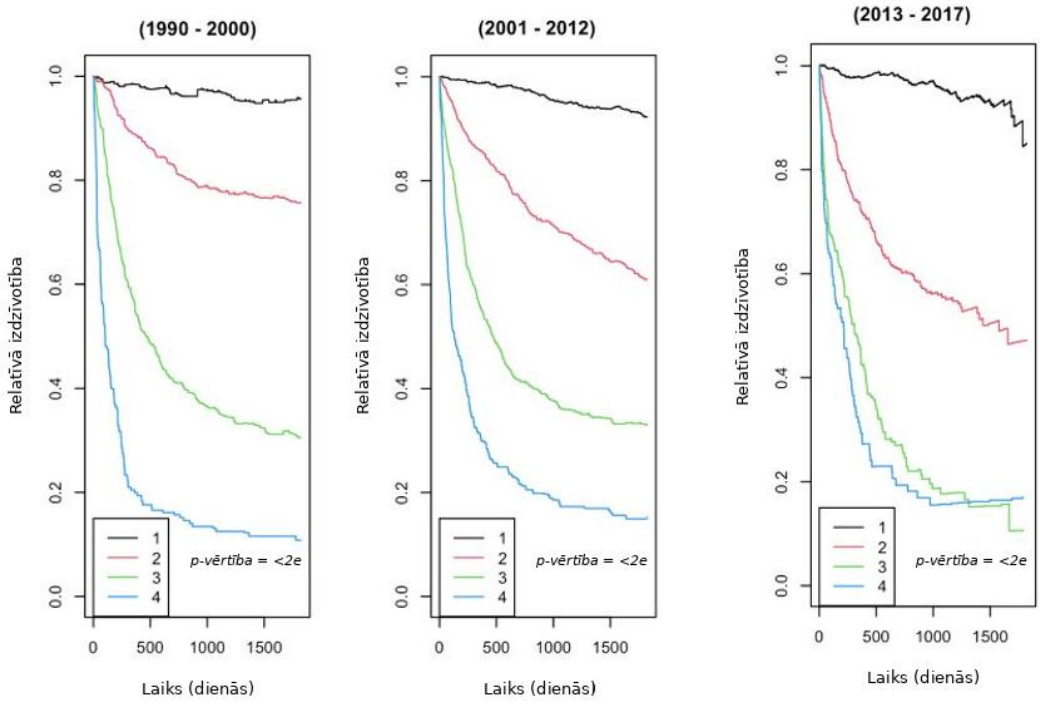
2.4.1. Relatīvā izdzīvotība (RS, *Relative Survival*)

Visā periodā piecu gadu relatīvā izdzīvotība (RS) bija 59,9 % (95 % TI: 58,4–61,3). Statistiski nozīmīgs uzlabojums tika novērots visos trijos pētījuma periodos: 55,0 % (1990.–2000.), 61,9 % (2001.–2012.) un 59,0 % (2013.–2017.; p = 0,006).

Vecuma grupu analīze atklāja skaidru apgrieztu sakarību starp vecumu un izdzīvotību. 40–59 gadu vecuma grupā piecu gadu RS nepārtraukti uzlabojās visos periodos, sasniedzot 76,9 % (95 % TI: 69,4–85,2) 2013.–2017. gadā. 80+ gadu vecuma grupā izdzīvotība visos periodos saglabājās konsekventi viszemākā (43,4 %–50,2 %).

Pēc dzimuma stratificētā izdzīvotības analīze uzrādīja, ka sievietēm konsekventi bija augstāka piecu gadu RS nekā vīriešiem, lai gan atšķirība nebija statistiski nozīmīga (visos periodos p > 0,05).

T2 un T3 stadijas grupās piecu gadu RS laika gaitā nozīmīgi pasliktinājās (2.2. attēls).



2.2. attēls. **Urīnpūšļa vēža T stadijam specifiskā 5 gadu relatīvā izdzīvotība trijos laika periodos**

2.4.2. Kopējā izdzīvotība (OS, *Overall Survival*) un vēža specifiskā izdzīvotība (CSS, *Cancer-Specific Survival*)

Visā periodā mediānā CSS bija 8,45 gadi (95 % TI: 7,562–9,348).

Piecu un desmit gadu kopējās izdzīvotības (OS) rādītāji bija zemākie pirmajā analīzes periodā pēc diagnozes noteikšanas: 38,5 % (95 % TI: 35,3–41,8) no 1996. līdz 1998. gadam un 24,1 % (95 % TI: 21,2–27,0). Piecu un desmit gadu OS rādītāji uzlabojās novērtēšanas periodā, līdz piecu gadu OS sasniedza 48,6 % (95 % TI: 45,6–51,6) no 2008. līdz 2010. gadam, un 10 gadu OS sasniedza 31,0 % (95 % TI: 28,2–34,0) no 2005. līdz 2007. gadam.

Zemākie UV specifiskās piecu un desmit gadu izdzīvotības (CSS) rādītāji tika reģistrēti perioda sākumā (no 1990. līdz 1992. gadam) – attiecīgi 47,2 % (95 % TI: 43,4–51,0) un 41,3 % (95 % TI: 37,5–45,1). Šie rādītāji uzlabojās visā pētījuma periodā: piecu gadu CSS sasniedza 62,0 % (95 % TI: 58,9–65,0) no 2008. līdz 2010. gadam, savukārt desmit gadu CSS sasniedza 52,4 % (95 % TI: 48,8–56,0) no 2005. līdz 2007. gadam.

Aplūkojot OS un CSS sadalījumā pēc dzimuma, piecu gadu izdzīvotība uzlabojās abās dzimumu grupās. Pārskata perioda beigās sievietēm bija labāka izdzīvotība nekā vīriešiem, kas veidoja būtisku pretstatu situācijai sākotnējā periodā ($p < 0,05$) (2.2. tabula).

2.2. tabula

Piecu gadu izdzīvotības rādītāji dažādās dzimumu grupās

Izdzīvotības rādītāji		1990–1992	1993–1995	1996–1998	1999–2001	2002–2004	2005–2007	2008–2010
Vīrieši	OS	42.3 (38.2 līdz 46.5)	40.1* (36.0 līdz 44.2)	37.7 (33.9 līdz 41.4)	38.8* (35.0 līdz 42.6)	39.3 (35.7 līdz 43.0)	45.2* (41.7 līdz 48.7)	48.3 (44.9 līdz 51.7)
	CSS	48.5 (44.3 līdz 52.8)	46.8* (42.5 līdz 51.0)	48.7 (44.7 līdz 52.8)	52.6* (48.5 līdz 56.6)	53.0* (49.1 līdz 57.0)	58.9 (55.2 līdz 62.5)	61.7 (58.2 līdz 65.2)
Sievietes	OS	37.8 (30.0 līdz 45.5)	46.4* (39.2 līdz 53.7)	41.0 (34.5 līdz 47.6)	43.3* (36.7 līdz 49.9)	47.4 (41.0 līdz 53.8)	53.8* (47.6 līdz 60.0)	49.8 (43.5 līdz 56.1)
	CSS	42.2 (34.1 līdz 50.2)	52.5* (45.1 līdz 60.0)	48.6 (41.8 līdz 55.4)	55.1* (48.2 līdz 61.9)	61.5* (55.0 līdz 68.0)	62.5 (56.3 līdz 68.7)	62.8 (56.3 līdz 69.2)

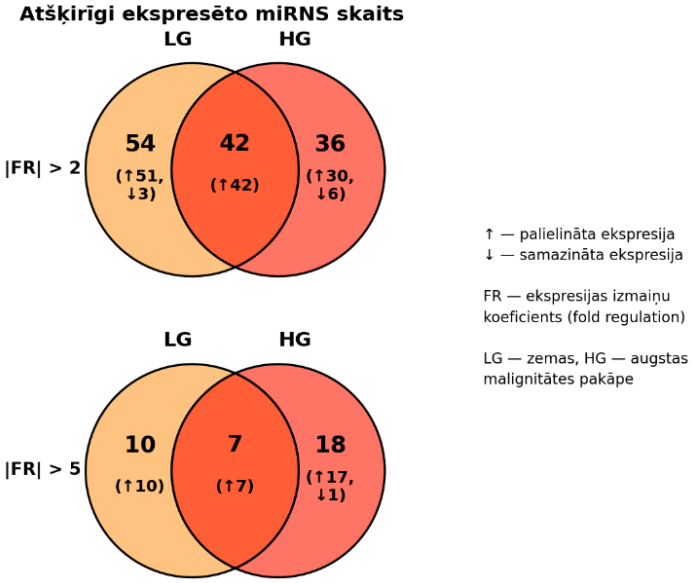
OS – kopējā izdzīvotība; CSS – vēža specifiskā izdzīvotība. *$p < 0,05$.

2.5. Pacientu grupas

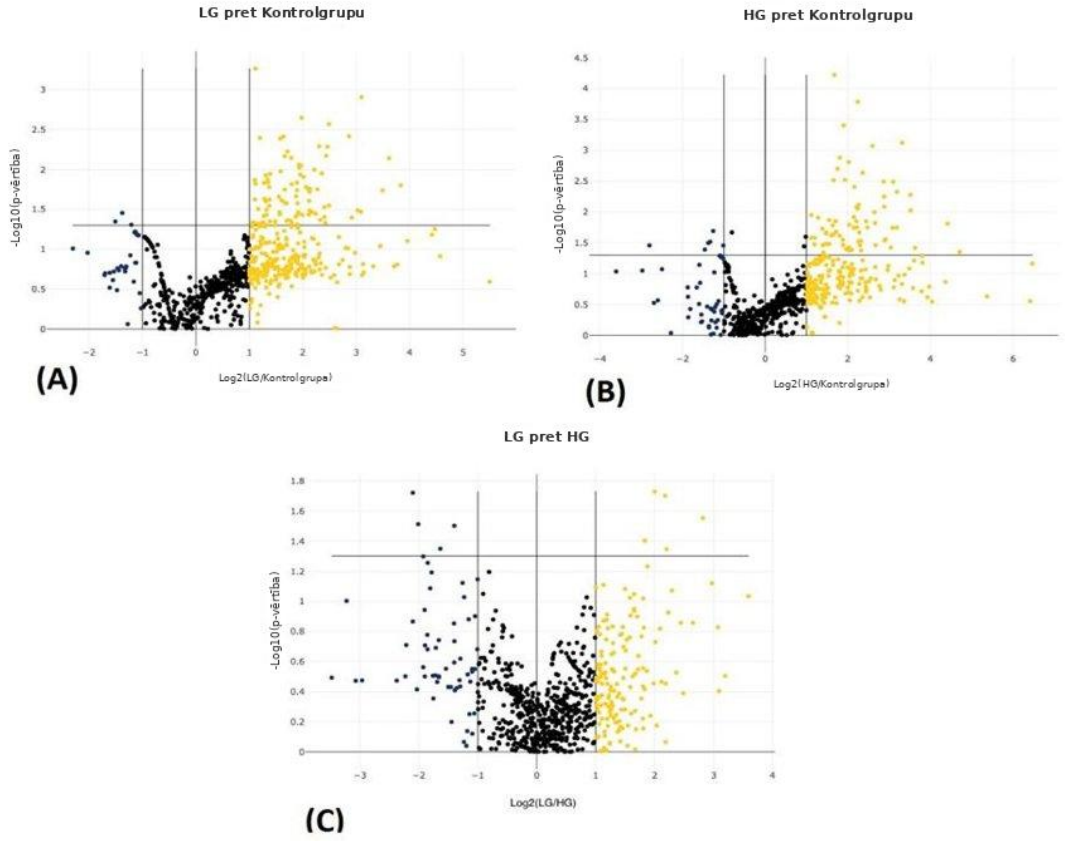
Urīna eksosomu mikroRNS analīzei paraugi tika ievākti no 19 dalībniekiem: 6 pacientiem ar LG UV (LG, ≤ pT1; visi vīrieši, mediānais vecums 71,5 gadi), 6 pacientiem ar HG UV (HG, ≥pT2; 2 vīrieši, 4 sievietes, mediānais vecums 71,5 gadi) un 7 veselām kontroles personām (6 vīrieši, 1 sieviete, mediānais vecums 66 gadi). Stadijas un diferenciācijas pakāpes noteikšana tika veikta saskaņā ar TNM klasifikācijas sistēmu un 2022. gada PVO kritērijiem.

2.6. Atšķirīgi ekspresētas urīna eksosomu miRNS urīnpūšļa vēža pacientiem

Pēc eksosomālo miRNS vispārējo profilu salīdzināšanas vēža pacientu urīna paraugos tika analizētas tās miRNS, kuru ekspresijas izmaiņas (FR, *fold regulation*) salīdzinājumā ar kontroli bija vismaz divas reizes lielākas vai mazākas. Šīm robežvērtībām atbilstošo miRNS skaits LG grupā bija 96 (93 – ar palielinātu un 3 – ar samazinātu ekspresiju) un HG grupā – 78 (72 – ar palielinātu un 6 – ar samazinātu ekspresiju) (2.3. un 2.4. tabula; 2.3. un 2.4. attēls). Starp eksosomās atšķirīgi ekspresētajām miRNS 42 tika konstatētas gan LG, gan HG grupā, un tām visām vēža pacientiem bija palielināta ekspresija.



2.3. attēls. **Atšķirīgi ekspresēto miRNS skaits zemas malignitātes pakāpes (LG) un augstas malignitātes pakāpes (HG) grupās**



2.4. attēls. **Vulkāna diagrammas salīdzinājumam. (A) savvaļas tipa (*wild type*) zemas malignitātes pakāpes (LG) grupa pret kontrolgrupu, (B) savvaļas tipa augstas malignitātes pakāpes (HG) grupa pret kontrolgrupu, (C) savvaļas tipa zemas malignitātes pakāpes (LG) grupa pret augstas malignitātes pakāpes (HG) grupu**

2.3. tabula

Atšķirīgi ekspresētās urīna eksosomu miRNS un atbilstošie mērķgēni zemas malignitātes pakāpes (LG) urīnpūšļa vēža pacientu grupā

miRNS	Ekspresijas izmaiņu koeficients (FR)	p vērtība	Mērķgēns
Paaugstinātu ekspresiju (*Up-regulated*)			
hsa-miR-21-3p	14.25	0.016	*PTEN*
hsa-miR-324-5p	12.24	0.007	
hsa-miR-31-3p	11.27	0.018	
hsa-miR-30b-3p	8.57	0.001	
hsa-miR-188-5p	8.50	0.034	
hsa-miR-769-5p	8.15	0.033	
hsa-miR-132-3p	7.55	0.040	*EGFR*
hsa-miR-628-3p	7.30	0.004	
hsa-miR-126-3p	5.62	0.003	*AKT1*
hsa-miR-221-3p	5.62	0.028	*PTEN*
hsa-miR-455-3p	5.51	0.005	
hsa-miR-34a-3p	5.42	0.007	*AKT1, CTNNB1, MYC*
has-let-7f-2-3p	5.37	0.047	
hsa-miR-28-5p	5.30	0.039	*TP53*
hsa-miR-210-3p	5.29	0030	
hsa-miR-20a-3p	5.11	0.011	*PTEN, MYC*
hsa-miR-10b-3p	5.01	0.043	

2.3. tabulas turpinājums

miRNS	Ekspresijas izmaiņu koeficients (FR)	p vērtība	Mērķgēns
Paaugstinātu ekspresiju (*Up-regulated*)			
hsa-miR-196b-3p	4.94	0.005	
hsa-miR-652-3p	4.84	0.018	
hsa-miR-582-5p	4.73	0.036	
hsa-miR-15b-5p	4.64	0.010	
hsa-miR-27b-3p	4.49	0.034	
hsa-miR-29a-5p	4.39	0.018	
hsa-miR-193b-5p	4.36	0.019	
hsa-miR-301a-3p	4.36	0.033	*PTEN*
hsa-miR-450a-5p	4.35	0.018	
hsa-miR-29c-5p	4.34	0.025	
hsa-miR-135b-5p	4.33	0.037	
hsa-miR-21-5p	4.32	0.018	*PTEN, EGFR*
hsa-miR-152-3p	4.18	0.017	*PTEN*
hsa-miR-16-5p	4.05	0.012	*TP53*
hsa-miR-200a-5p	3.99	0.037	*PTEN, CTNNB1*
hsa-miR-320b	3.94	0.002	
hsa-miR-151a-3p	3.90	0.009	
hsa-miR-20b-3p	3.87	0.012	
hsa-miR-18a-5p	3.82	0.009	*PTEN*
hsa-miR-425-5p	3.82	0.009	*PTEN*
hsa-miR-148b-3p	3.78	0.034	
hsa-miR-31-5p	3.75	0.036	
hsa-miR-15a-5p	3.74	0.027	
hsa-miR-129-5p	3.73	0.049	
hsa-miR-27a-3p	3.71	0.015	
hsa-miR-376c-3p	3.71	0.018	
hsa-miR-101-3p	3.67	0.022	
hsa-miR-197-3p	3.65	0.039	
has-let-7e-3p	3.46	0.015	
hsa-miR-24-2-5p	3.46	0.049	
hsa-miR-181a-3p	3.45	0.044	
hsa-miR-664a-3p	3.44	0.007	
hsa-miR-106b-3p	3.30	0.043	*PTEN*
hsa-miR-23a-3p	3.28	0.006	
hsa-miR-331-3p	3.24	0.044	
hsa-miR-185-5p	3.23	0.027	*AKT1*
hsa-miR-99b-5p	3.18	0.026	
hsa-miR-28-3p	3.17	0.007	*TP53*
hsa-miR-501-3p	3.16	0.018	
hsa-miR-191-5p	3.12	0.004	
hsa-miR-502-3p	3.04	0.024	
hsa-miR-151a-5p	3.00	0.011	
hsa-miR-378a-3p	2.99	0.004	
hsa-miR-200a-3p	2.97	0.034	*PTEN, CTNNB1, EGFR*
hsa-miR-324-3p	2.97	0.037	
hsa-miR-532-3p	2.93	0.022	

2.3. tabulas turpinājums

miRNS	Ekspresijas izmaiņu koeficients (FR)	p vērtība	Mērķgēns
Paaugstinātu ekspresiju (*Up-regulated*)			
hsa-miR-500a	2.80	0.045	
hsa-miR-222-3p	2.80	0.050	*PTEN*
hsa-miR-141-3p	2.62	0.011	*PTEN*
hsa-miR-24-3p	2.61	0.045	*TP53, MYC*
hsa-miR-19a-3p	2.60	0.024	*PTEN*
hsa-miR-22-3p	2.59	0.017	*AKT1*
hsa-miR-25-3p	2.59	0.028	*TP53*
hsa-miR-200c-3p	2.55	0.014	*PTEN*
hsa-miR-200b-3p	2.54	0.013	
hsa-miR-125a-5p	2.51	0.050	*AKT1*
hsa-miR-320c	2.50	0032	
hsa-miR-423-5p	2.50	0.037	
hsa-miR-33a-5p	2.48	0.025	*MYC*
hsa-miR-429	2.47	0.012	*PTEN*
hsa-miR-320d	2.43	0.023	
hsa-miR-26b-5p	2.43	0.038	*PTEN*
hsa-miR-181a-5p	2.42	0.015	*PTEN*
hsa-miR-19b-3p	2.42	0.038	*TP53*
hsa-miR-320a	2.40	0.046	*PTEN*
hsa-miR-424-5p	2.38	0.046	
hsa-miR-10b-5p	2.38	0.047	*TP53*
hsa-miR-203a-3p	2.29	0.004	
hsa-miR-107	2.26	0.048	
hsa-miR-374b-5p	2.24	0.031	
hsa-miR-934	2.17	0.001	
hsa-miR-361-5p	2.17	0.0150	
hsa-miR-93-5p	2.15	0.014	*PTEN*
hsa-miR-29c-3p	2.15	0.024	*PTEN*
hsa-miR-103a-3p	2.14	0.047	*PTEN*
hsa-miR-628-5p	2.09	0.046	
Pazemināt ekspresiju (Down-regulated)			
hsa-miR-1247-5p	−2.31	0.049	
hsa-miR-492	−2.60	0.035	*PTEN*
hsa-miR-135b-3p	−2.84	0.045	

FR – ekspresijas izmaiņu koeficients (*fold regulation*)

2.4. tabula

Atšķirīgi ekspresētās urīna eksosomu miRNS un atbilstošie mērķgēni augstas malignitātes pakāpes (HG) urīnpūšļa vēža pacientu grupā

miRNS	Ekspresijas izmaiņu koeficients (FR)	*P* vērtība	Mērķgēns
***Paaugstinātu ekspresiju* (*Up-regulated*)**			
hsa-miR-150-5p	26.15	0.044	*TP53, CTNNB1*
hsa-miR-126-3p	21.35	0.015	*AKT1*
hsa-miR-205-5p	12.37	0.038	*PTEN*
hsa-miR-324-5p	11.47	0.009	
hsa-miR-628-3p	11.42	0.005	
hsa-miR-28-5p	9.95	0.001	*TP53*
hsa-miR-18a-5p	9.14	0.005	*PTEN*
hsa-miR-21-3p	9.10	0.018	*PTEN*
hsa-miR-24-1-5p	8.57	0.003	
hsa-miR-342-3p	8.49	0.018	
hsa-miR-130b-3p	8.24	0.038	*PTEN*
hsa-miR-197-3p	7.54	0.028	
hsa-miR-376c-3p	7.41	0.029	
hsa-miR-182-5p	7.38	0.008	*PTEN*
hsa-miR-20a-3p	7.36	0.006	*PTEN*
hsa-miR-590-3p	7.30	0.003	
hsa-miR-21-5p	6.38	0.035	*PTEN, EGFR*
hsa-let-7f-2-3p	6.31	0.015	
hsa-miR-200b-5p	6.26	0.010	
hsa-miR-374a-5p	6.05	0.001	
hsa-miR-7-1-3p	5.56	0.018	*EGFR*
hsa-miR-130b-5p	5.44	0.014	
hsa-miR-505-5p	5.14	0.002	
hsa-miR-183-5p	5.01	0.042	
hsa-miR-320b	4.97	0.029	
hsa-miR-105-5p	4.91	0.035	*AKT1*
hsa-miR-27b-3p	4.85	0.021	
hsa-miR-450a-5p	4.81	0.008	
hsa-miR-454-3p	4.79	0.030	
hsa-miR-28-3p	4.73	0.000	*TP53*
hsa-miR-146b-5p	4.71	0.009	
hsa-miR-425-5p	4.66	0.018	*PTEN*
hsa-miR-191-5p	4.65	0.008	
hsa-miR-301a-3p	4.62	0.014	*PTEN*
hsa-miR-151a-3p	4.47	0.004	
hsa-miR-320c	4.43	0.012	
hsa-miR-18a-3p	4.43	0.018	
hsa-miR-148b-3p	4.27	0.041	
hsa-miR-342-5p	4.12	0.042	
hsa-miR-664a-3p	4.10	0.016	
hsa-miR-455-3p	4.09	0.038	
hsa-miR-574-3p	4.06	0.002	*EGFR*
hsa-miR-618	3.89	0.040	
hsa-miR-365a-3p	3.81	0.003	
hsa-miR-200b-3p	3.74	0.000	
hsa-miR-181d-5p	3.69	0.034	

2.4. tabulas turpinājums

miRNS	Ekspresijas izmaiņu koeficients (FR)	*P* vērtība	Mērķgēns
***Paaugstinātu ekspresiju* (*Up-regulated*)**			
hsa-miR-193b-5p	3.68	0.028	
hsa-miR-200c-3p	3.50	0.001	*PTEN*
hsa-miR-23b-3p	3.48	0.024	*PTEN*
hsa-miR-374b-5p	3.37	0.002	
hsa-miR-92a-3p	3.29	0.021	*PTEN*
hsa-miR-320d	3.26	0.014	
hsa-miR-429	3.19	0.000	*PTEN, MYC*
hsa-miR-151a-5p	3.15	0.003	
hsa-miR-339-3p	3.15	0.023	
hsa-miR-26b-5p	3.12	0.023	*PTEN*
hsa-miR-99b-5p	3.11	0.016	
hsa-miR-489-3p	3.03	0.024	
hsa-miR-361-5p	2.92	0.014	
hsa-miR-320a	2.91	0.033	*PTEN*
hsa-miR-34a-3p	2.79	0.022	*AKT1, CTNNB, MYC*
hsa-miR-26a-5p	2.78	0.021	*PTEN*
hsa-miR-187-5p	2.77	0.033	
hsa-miR-218-5p	2.66	0.045	*EGFR*
hsa-miR-532-3p	2.66	0.047	
hsa-let-7d-3p	2.63	0.034	
hsa-let-7d-5p	2.61	0.019	
hsa-miR-125a-5p	2.43	0.012	*AKT1*
hsa-miR-106b-5p	2.30	0.026	*PTEN*
hsa-let-7g-5p	2.29	0.033	
hsa-miR-423-3p	2.17	0.011	
hsa-miR-423-5p	2.15	0.026	
Pazeminātu ekspresiju* (*Down-regulated)			
hsa-miR-548m	−2.02	0.035	
hsa-miR-1247-5p	−2.39	0.020	
hsa-miR-492	−2.52	0.030	*PTEN*
hsa-miR-302b-3p	−2.60	0.032	
hsa-miR-135b-3p	−2.75	0.041	
hsa-miR-1-3p	−6.99	0.035	

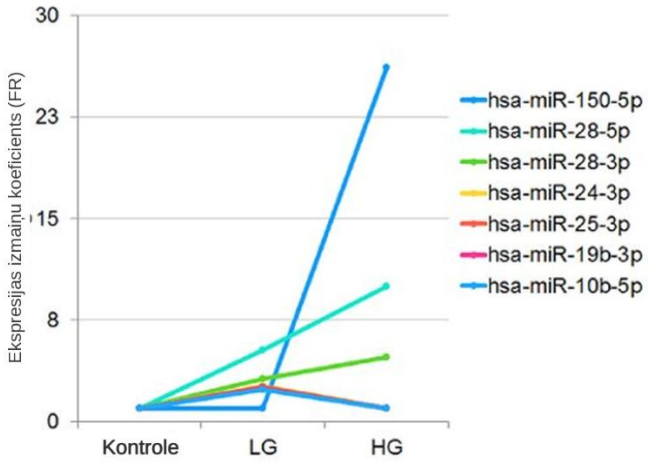
FR – ekspresijas izmaiņu koeficients (*fold regulation*)

2.7. *TP53* un *PTEN* saistītās eksosomālās miRNS

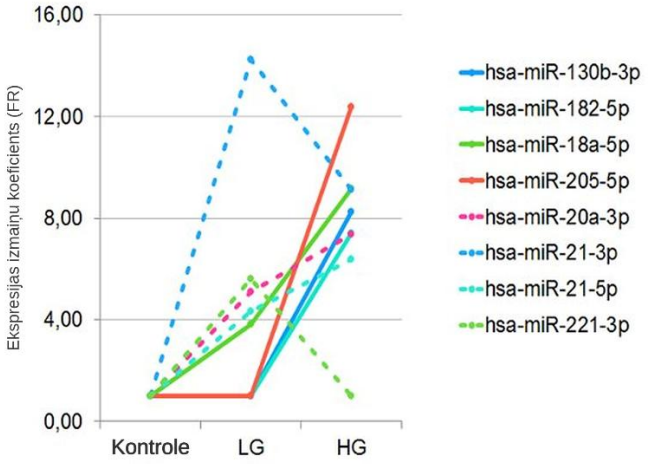
Lielākajai daļai miRNS LG un HG grupu profilos ir palielināta ekspresija (2.3. un 2.4. tabula). Tas liecina, ka daudzas no šīm miRNS var būt iesaistītas audzēja supresoru ekspresijas samazināšanā. LG grupā tika identificētas septiņas miRNS (miR-28-5p, miR-16-5p, miR-28-3p, miR-24-3p, miR-25-3p, miR-19b-3p un miR-10b-5p), bet HG grupā – trīs miRNS (miR-150-5p, miR-28-5p un miR-28-3p), kas ir vērstas pret *TP53* un tika atrastas *miRTargetLink* datubāzē ar spēcīgu validāciju (2.5. attēls). Divām no šīm miRNS, miR-28-5p un miR-28-3p, ekspresija bija būtiski paaugstināta abās grupās, un ekspresijas izmaiņu koeficients bija lielāks HG grupā nekā LG grupā, savukārt miR-150-5p bija ievērojami paaugstināts tikai HG grupā un LG grupā nesasniedza statistisku nozīmīgumu.

LG grupā ir 22 eksosomālās miRNS un HG grupā – 17 eksosomālās miRNS, kas tieši ir vērstas pret PTEN ar spēcīgu validāciju (2.6. attēls).

Koncentrējoties uz eksosomālajām miRNS, kuru FR ir lielāks par 5, HG grupā bija vairāk ar TP53 un PTEN saistīto miRNS (2 pret TP53 un 7 pret PTEN vērtas miRNS) nekā LG grupā (1 pret *TP53* un 3 pret *PTEN* vērstas miRNS). Šis novērojums liecina, ka *TP53* un *PTEN* HG grupā tiek spēcīgāk nomākti nekā LG grupā (2.3. un 2.4. tabula).



2.5. attēls. **Pret *TP53* vērsto eksosomālo miRNS ekspresijas līmeņu izmaiņas urīnpūšļa vēža progresijas laikā**



2.6. attēls. **Pret *PTEN* vērsto eksosomālo miRNS ekspresijas līmeņu izmaiņas urīnpūšļa vēža progresijas laikā**

2.8. Eksosomālo miRNS signālceļu bagātināšanās analīze

Gan LG, gan HG grupā ar augstu statistisko nozīmīgumu tika konstatēta miRNS bagātināšanās eksosomās, mikropūslīšos un cirkulējošās frakcijās. KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) signālceļu un MNDR (*Mammalian ncRNA-Disease Repository*) slimību kategorijās galvenokārt tika atrastas ar vēzi saistītas apakškategorijas. Izmantojot

samazinātas ekspresijas miRNS sarakstu, statistiski nozīmīgus bagātinātos signālceļus neizdevās identificēt, jo katrā grupā bija mazs miRNS skaits.

2.9. Paaugstinātas ekspresijas miRNS mērķgēnu un to mijiedarbības analīze

Tika identificēti 1425 prognozētie mērķgēni 91 paaugstinātas ekspresijas miRNS LG grupā un 805 mērķgēni 71 paaugstinātas ekspresijas miRNS HG grupā. Izmantojot šos gēnus, tika izveidoti regulatorie gēnu mijiedarbības tīkli. Galveno mezglu gēnu atlasei tika salīdzināti 50 augstākā ranga gēni katrā no četrām *CytoNCA* un *CytoHubba* metodēm. Tika iegūti 19 galvenie mezglu gēni no LG paaugstinātas ekspresijas miRNS mērķgēnu grupas un 32 no HG paaugstinātas ekspresijas miRNS mērķgēnu grupas. Abās grupās pārklājās 17 mērķgēni. Abās galveno mezglu gēnu analīzēs ar katru no četrām metodēm *TP53* ieņēma pirmo vietu, izņemot MCC no *CytoHubba* (34. vieta), savukārt *PTEN* ieņēma 6.–11. vietu LG grupā un 7.–10. vietu HG grupā.

2.10. Urīnpūšļa vēža diagnostikas uzlabošana, izmantojot mašīnmācīšanos miRNS ekspresijas un klīnisko datu analīzē

Mašīnmācīšanās analīze tika veikta 152 dalībnieku kohortai (89 urīnpūšļa vēža pacienti un 63 veselas kontrolpersonas), kuri atbilda visiem iekļaušanas kritērijiem un kuriem bija pilnīgi klīniskie dati. Šīs kohortas klīniski-patoloģiskais raksturojums ir apkopots 2.5. tabulā.

2.5. tabula

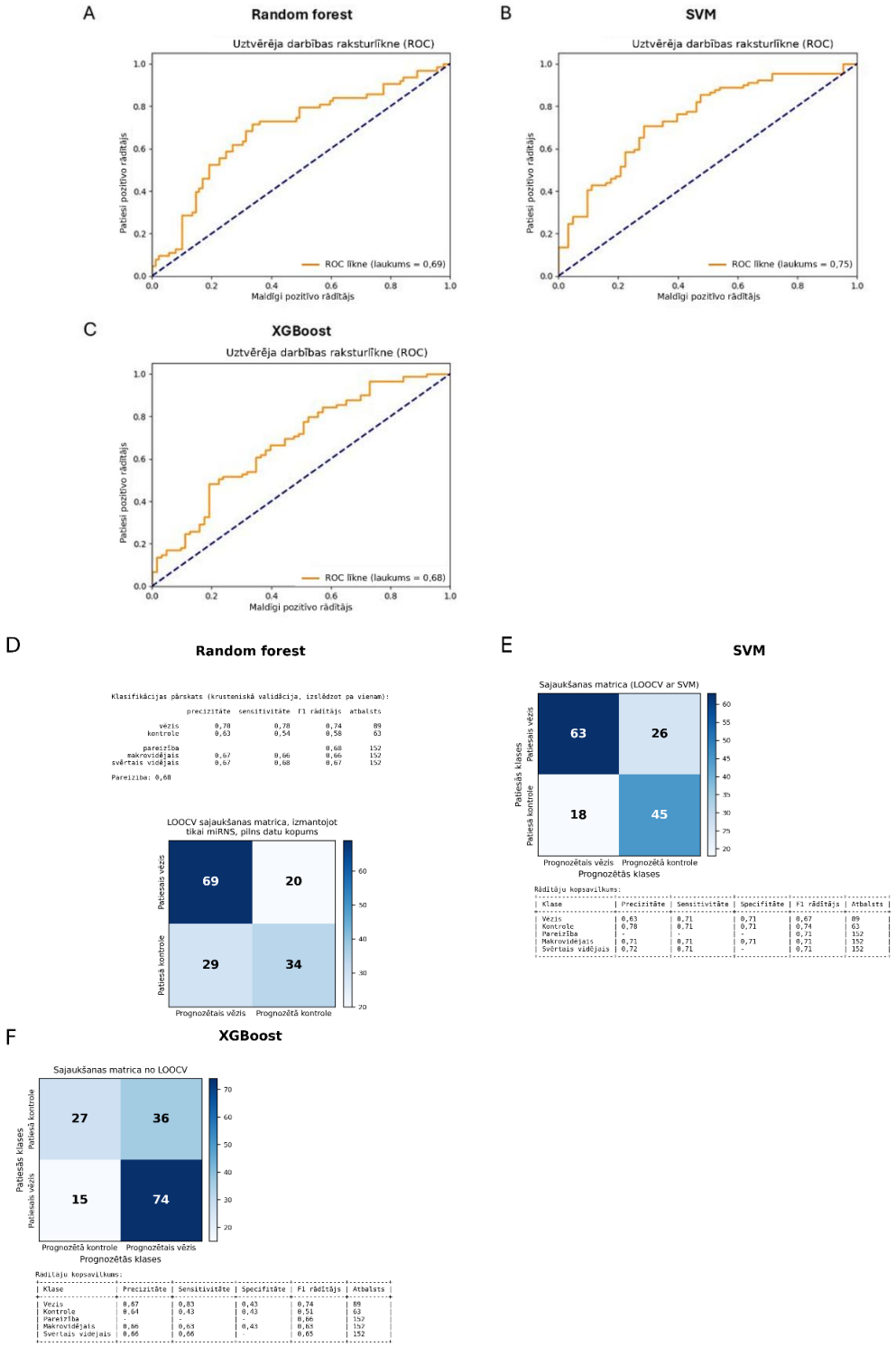
Mašīnmācīšanās pētījuma kohortas klīniskie un patoloģiskie parametri

Mainīgais	Pētījuma grupas	
	Kontroles (N = 63)	Vēža (N = 89)
Vecums (gadi)		
Mediāna	66	74
Dzimums		
Vīrietis	39	70
Sieviete	24	19
Patoloģiskā stadija		
≤pT1	–	80
≥pT2	–	9
Diferenciācijas pakāpe		
LG	–	52
HG	–	37
Eritrocitūrija		
Jā	4	50
Nē	59	39
Smēķēšanas anamnēze		
Pašreizējais/Kādreizējais	30	47
Nekad	33	42

N – skaits; LG – zema malignitātes pakāpe (low grade); HG – augsta malignitātes pakāpe (high grade).

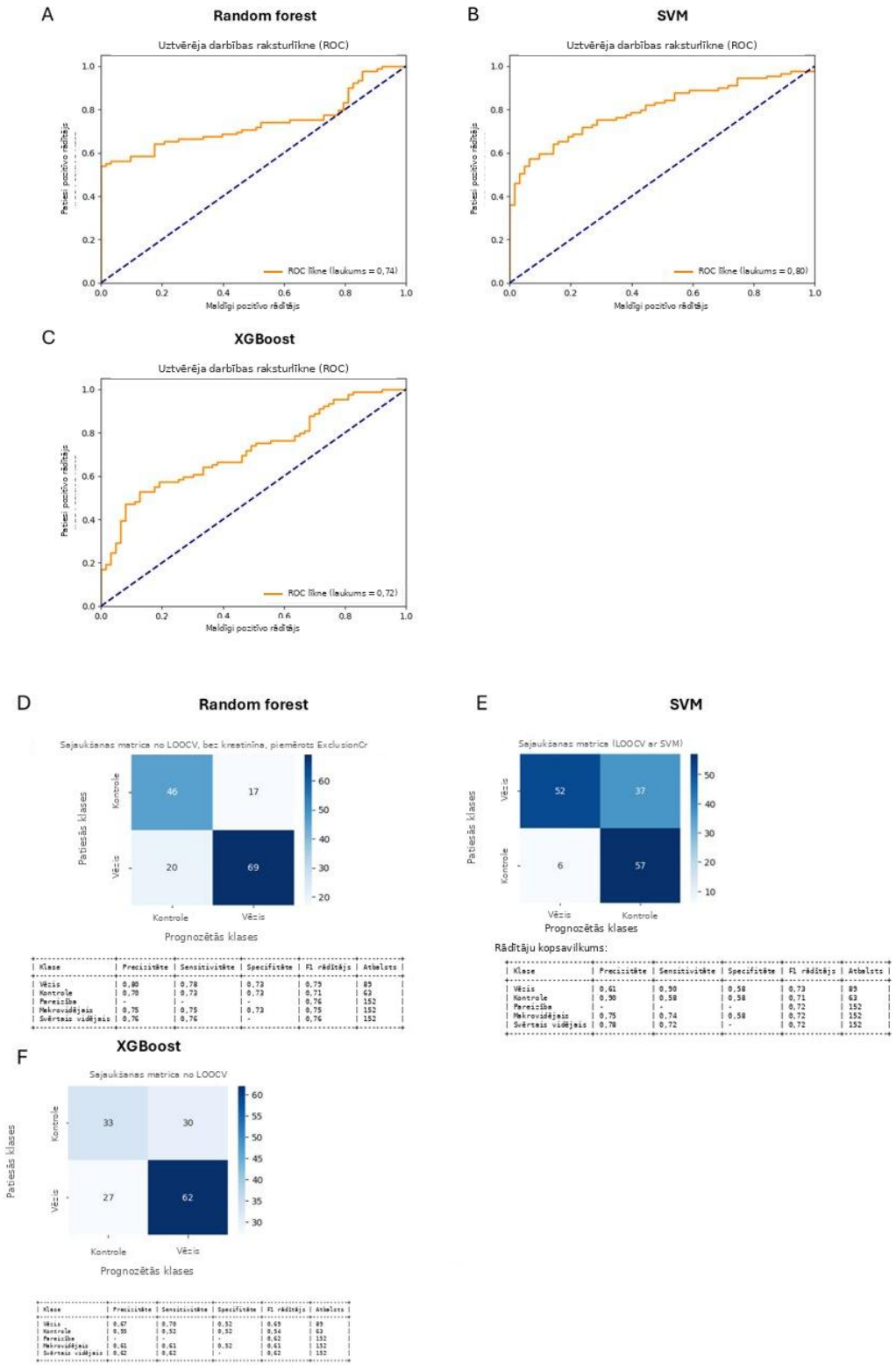
Astoņas miRNS no atklāšanas fāzes (mir-30b-3p, mir-28-3p, mir-339-5p, mir-20a-3p, mir-126-3p, mir-429, mir-28-5p un mir-324-5p) uzrādīja statistiski nozīmīgu ekspresijas atšķirību starp vēža un kontrolgrupām ($p < 0,05$).

Atsevišķā analīzē, kurā izmantoti tikai miRNS dati, trīs klasifikatori sasniedza šādu diagnostisko sniegumu (skat. 2.7. attēlu).



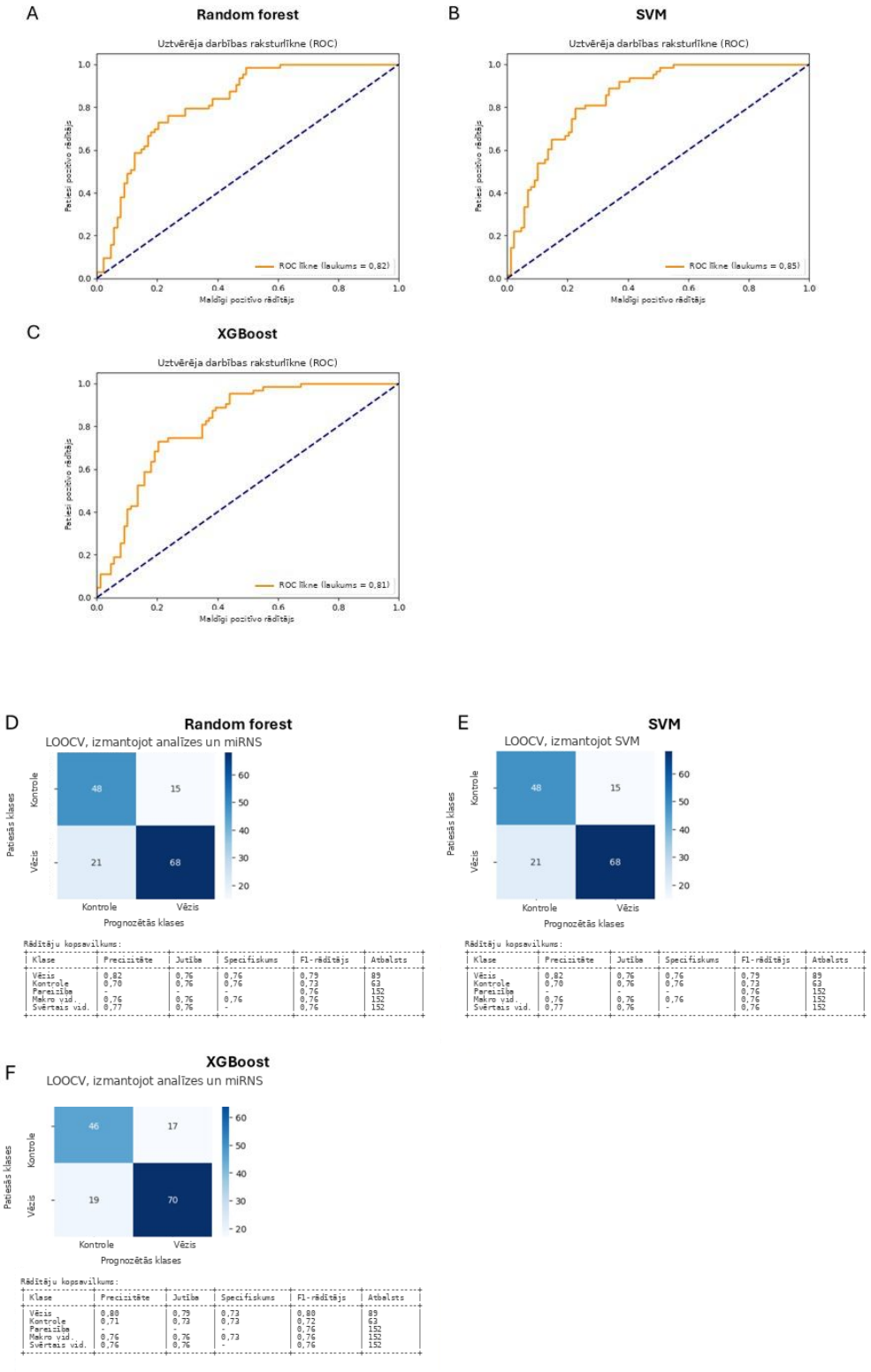
2.7. attēls. **Uztvērēja darbības raksturlīknes (ROC) analīze (A–C) un neskaidrību matricas (D–F) modeļiem, kas trenēti ar diferenciāli ekspresēto miRNS datiem, izmantojot *Random Forest* (A, D), SVM (B, E) un XGBoost (C, F).**

Analoģiski tika izvērtēts modelis, kas bija trenēts tikai ar klīniskajiem un demogrāfiskajiem mainīgajiem – vecumu, dzimumu, svaru, augumu, eritrocitūriju, leikocitūriju, nitrītu testu, smēķēšanas anamnēzi, aromātisko amīnu iedarbību, dizūriju, hroniskām urīnceļu infekcijām un onkoloģisko anamnēzi ģimenē (skat. 2.8. attēlu):



2.8. attēls. **ROC līkņu analīze (A–C) un neskaidrību matricas (D–F) modeļiem, kas trenēti ar klīniskajiem un demogrāfiskajiem datiem, izmantojot *Random Forest* (A, D), SVM (B, E) un XGBoost (C, F).**

Kombinējot miRNS ekspresijas datus ar klīniskajiem mainīgajiem vienotā multimodālā modelī, diagnostiskais sniegums konsekventi pārspēja abas atsevišķās konfigurācijas visos trīs klasifikatoros, kas apliecina molekulāro un klīnisko datu savstarpēji papildinošo diagnostisko vērtību (skat. 2.9. attēlu).



2.9. attēls. **ROC līkņu analīze (A–C) un neskaidrību matricas (D–F) modeļiem, kas trenēti ar apvienoto miRNS un klīnisko datu kopu, izmantojot Random Forest (A, D), SVM (B, E) un XGBoost (C, F)**

Pazīmju nozīmīgums tika izvērtēts visiem trim klasifikatoriem apvienotajā datu kopā (24 pazīmes: 11 miRNS + 13 klīniskie mainīgie). Visi modeļi konsekventi identificēja šādas galvenās prognostiskās pazīmes:

- Eritrocitūrija (eritrocīti urīna teststrēmelē) – vadošais klīniskais prediktors visos trijos klasifikatoros;
- Vecums (gadi) – konsekventi otrs augstākais klīniskais prediktors;
- hsa-miR-20a-3p, hsa-miR-324-5p un hsa-miR-339-5p – augstāk ierindotās miRNS, konsekventi identificētas *Random Forest, SVM* un *XGBoost* modeļos;
- hsa-miR-28-5p, hsa-miR-429 un hsa-miR-455-3p – papildu pazīmes, sniedza būtisku ieguldījumu uz kokiem balstītajos modeļos (*Random Forest, XGBoost*);
- Leikocitūrija, dzimums, smēķēšanas anamnēze – zemāks, bet konsekvents klīnisko pazīmju devums.

Jāatzīmē, ka smēķēšanas anamnēze – labi zināms urīnpūšļa vēža riska faktors – visos modeļos ierindojās relatīvi zemu. Tas, visticamāk, skaidrojams ar to, ka tika reģistrēts tikai pašreizējais smēķēšanas statuss, neiekļaujot kumulatīvo paciņu gadus, kas labāk atspoguļotu kancerogēno slodzi.

UMAP dimensiju samazināšanas analīze apstiprināja skaidru nodalījumu starp vēža un kontrolgrupu, kad abi datu tipi tika apvienoti, vizuāli apliecinot klasifikatoru sniegumu.

Secinājumi

1. Pēdējo 28 gadu laikā tika novērots urīnpūšļa vēža saslimstības un mirstības rādītāju pieaugums, izņemot vēža specifisko mirstību 40–59 gadu vecuma grupā, kurā tika novērota samazināšanās tendence.
2. Piecu un desmit gadu relatīvā izdzīvotība Latvijā laika gaitā ir uzlabojusies, taču tā ir zemāka par mediāno izdzīvotību citās Eiropas valstīs.
3. Tika identificētas vairākas atšķirīgi ekspresētas miRNS, kas iesaistītas *TP53* un *PTEN* gēnu epiģenētiskajā regulācijā, kā iespējami diagnostiskie biomarķieri.
4. Mašīnmācīšanās, izmantojot trīs savstarpēji papildinošus klasifikatorus (*Random Forest, SVM, XGBoost*), kas novērtēti trīs datu konfigurācijās (tikai miRNS, tikai klīniskie dati un kombinētie dati), parādīja, ka klīnisko datu un identificēto miRNS biomarķieru apvienošana nodrošināja labāko diagnostisko veiktspēju – SVM klasifikators sasniedza AUC vērtību 0,85, jutību 0,76 un specifiskumu 0,76.
5. Identificētais miRNS panelis un multimodālā diagnostiskā pieeja pirms klīniskās izmantošanas prasa validāciju lielākās kohortās un apstiprinājumu bioloģiskos pētījumos.

Priekšlikumi

1. Slimību profilakses un kontroles centra (SPKC) uzturētajā Ar noteiktām slimībām slimojošu pacientu reģistrā datu vākšana par ļaundabīgajiem audzējiem būtu sistemātiski jāpilnveido arī turpmāk, prioritāti piešķirot TNM stadijas, audzēja diferenciācijas pakāpes, ārstēšanas un blakusslimību pilnīgai reģistrēšanai, lai turpmākie pētījumi varētu sniegt detalizētāku priekšstatu par izdzīvotību un prognozi.
2. Lai gan urīna mikroRNS kā vēža biomarķieru klīniskā izmantošana ir daudzsološa, joprojām pastāv vairāki izaicinājumi. Daudzus no tiem, kaut arī tie ir raksturīgi šai jomai, varētu pārvarēt ar ciešāku sadarbību zinātniskajā kopienā – kopīgojot datu kopas, izmantojot atvērtas piekļuves platformas, piemērojot standartizētus protokolus eksosomu izolēšanai, RNS izdalīšanai un RT-qPCR, kā arī pilnvērtīgāk izmantojot jaunās tehnoloģijas.
3. Turpmākajos pētījumos būtu jāapsver progresīvāku pazīmju atlases un dimensionalitātes samazināšanas metožu izmantošana, lai uzlabotu diagnostiskā modeļa interpretējamību un veiktspēju. Modeļa identificēto ietekmīgāko pazīmju bioloģiskās nozīmes izpēte varētu arī sniegt ieskatu urīnpūšļa vēža pamatā esošajos molekulārajos mehānismos un palīdzēt atklāt jaunus biomarķierus agrīnai diagnostikai.
4. Šajā pētījumā identificētais urīna eksosomu mikroRNS panelis – miR-324-5p, miR-20a-3p, miR-429, miR-455-3p, miR-28-5p un miR-30b-3p – būtu jāvalidē neatkarīgā, prospektīvi atlasītā kohortā, izmantojot šajā darbā iegūtos ekspresijas sliekšņus, lai novērtētu tās reproducējamību un klīnisko pielietojamību.
5. Prognozētās mijiedarbības starp identificētajām mikroRNS un to mērķgēniem – īpaši tām, kuru mērķis ir *TP53* un *PTEN* – būtu jāapstiprina ar eksperimentālām pieejām, piemēram, luciferāzes reportiergēna testiem, RNS imūnprecipitāciju vai gēna ekspresijas nomākšanu (*knockdown*), lai pārbaudītu šīs regulatorās sakarības un labāk izprastu urīnpūšļa vēža pamatā esošos molekulāros mehānismus.
6. Multimodālā diagnostiskā datu kopa būtu jāpaplašina, sadarbojoties vairākiem centriem, lai sasniegtu izlases apjomu, kas ir pietiekams modeļa noturīgai ārējai validācijai. Mašīnmācīšanās analīze būtu jāpaplašina arī uz longitudinālajiem novērojumu datiem, lai izvērtētu, vai urīna eksosomu mikroRNS ekspresijas profils spēj prognozēt slimības recidīvu, progresēšanu un atbildreakciju uz ārstēšanu.

Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

Publikācijas:

1. Bitiņa-Barlote, Ē., Plonis, J., Cauce, V., Vjaters, E., Gardovskis, J., Miklaševičs, E., Nakazawa-Miklaševiča, M. 2021. Bladder cancer trends in Latvia during 1990-2017: incidence, mortality, and survival rates. Central European Journal of Urology 2021; 74(1): 14–23.. doi: 10.5173/ceju.2021.0266.R2
2. Bitiņa-Barlote, Ē., Plonis, J., Andrejeva, M., Vjaters, E., Gardovskis, J., Daneberga, Z., Miklaševičs, E., Nakazawa-Miklaševiča, M. Profiles of urinal exosomal miRNAs derived from bladder cancer. Cent European J Urol. 2024; doi: 10.5173/ ceju.2023.279.R1
3. Bitiņa-Barlote, Ē., Bļizņuks, D., Siliņa, S., Šatcs, M., Vjaters, E., Lietuvietis, V., Nakazawa-Miklaševiča, M., Plonis, J., Miklaševičs, E., Daneberga, Z., Gardovskis, J.. Liquid Biopsy Based Bladder Cancer Diagnostic by Machine Learning. Diagnostics. 2025; 15(4), 492. https://doi.org/10.3390/diagnostics15040492

Ziņojumi un tēzes:

1. Bitina-Barlote E., Plonis J., Vjaters E., Gardovskis J., Daneberga Z., Miklaševičs E., Nakazawa-Miklaševiča M. Urinary exosomal miRNA profiles and target genes in bladder cancer: Pilot study. European Urology Open Science, Volume 52, Supplement 1, June 2023, Page S22. https://doi.org/10.1016/S2666-1683(23)00294-X.
2. Bitiņa-Barlote Ē., Plonis J., Vasiļonoks J.K., Vjaters E., Gardovskis J., Daneberga Z., Miklaševičs E. , Nakazawa-Miklaševiča M. Urine exosomal miRNA profiles implicmate the key role of TP53 in bladder cancer development. European Urology Open Science, Volume 40, Supplement 1, June 2022, Pages S31-S32. https://doi.org/10.1016/S2666-1683(22)00653-X
3. Bitiņa-Barlote Ē, Plonis J., Andrejeva M., Vjaters E., Gardovskis J., Miklaševičs E., Nakazawa-Miklaševiča M. Urinary exosomal miRNAs as potential biomarker for bladder cancer diagnosis: pilot study. Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences. "Knowledge for Use in Practice", Abstracts, Riga. Latvia, 2021, p 114.
4. Bitiņa-Barlote Ē., Plonis J., Cauce V., Vjaters E., Gardovskis J., Miklaševičs E., Nakazawa-Miklaševiča M.Prevalence trends and years of life lost due to bladder cancer among the inhabitants of Latvia over past 28 years. Medicina (Kaunas); Volume 56, Supplement 1, 2020, p 128.
5. Bitina-Barlote E. Plonis J. Cauce V. Jukonis J. Vjaters E. Gardovskis J. Miklaševičs E. Bladder cancer incidence and mortality trends in Latvia: 1996-2017. European Urology Supplements Volume 18, Issue 3, 2019. p e2501-e2502. DOI: https://doi.org/10.1016/S1569-9056(19)32197-9
6. Bitina-Barlote E. Plonis J. Cauce V. Jukonis J. Vjaters E. Gardovskis J. Miklaševičs E. Bladder cancer 5-year survival trends in Latvia: 1996-2017. European Urology Supplements Volume 18, Issue 3, 2019, p e2498-e2499. DOI: https://doi.org/10.1016/S1569-9056(19)32195-5

Literatūras un avotu saraksts

1. Ahmad, O. B., Boschi-Pinto, C., Lopez, A. D., Murray, C. J., Lozano, R., & Inoue, M. (2001). Age standardization of rates: a new WHO standard. Geneva: World Health Organization, 9(10), 1–14.
2. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68(6), 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492
3. Challagundla, K. B., Wise, P. M., Neviani, P., Chava, H., Murtadha, M., Xu, T., Kennedy, R., Ivan, C., Zhang, X., Vannini, I., Fanini, F., Amadori, D., Calin, G. A., Hadjidaniel, M., Shimada, H., Jong, A., Seeger, R. C., Asgharzadeh, S., Goldkorn, A., & Fabbri, M. (2015). Exosome-mediated transfer of microRNAs within the tumor microenvironment and neuroblastoma resistance to chemotherapy. Journal of the National Cancer Institute, 107(7). https://doi.org/10.1093/jnci/djv135
4. Crocetto, F., Barone, B., Ferro, M., Busetto, G. M., La Civita, E., Buonerba, C., Di Lorenzo, G., Terracciano, D., & Schalken, J. A. (2022). Liquid biopsy in bladder cancer: state of the art and future perspectives. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 170, 103577. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103577
5. European Associtation of Urology (2026). EAU guidelines presented at the EAU Annual Congress London 2026. EAU Guidelines Office. https://uroweb.org/guidelines
6. Grimaldi, A. M., Lapucci, C., Salvatore, M., Incoronato, M., & Ferrari, M. (2022). Urinary miRNAs as a diagnostic tool for bladder cancer: A systematic review. Biomedicines, 10(11), 2766. https://doi.org/10.3390/biomedicines10112766
7. Hong, S. K. (2016). Biomarkers for bladder cancer: the search continues! Investigative and Clinical Urology, 57(2), 73–74. https://doi.org/10.4111/icu.2016.57.2.73
8. International Agency for Research on Cancer. (2022). Age-standardized rate (World) per 100,000, mortality, males, in 2022. https://gco.iarc.who.int/today
9. Jacob, M., Varghese, J., & Weil, P. A. (2018). Cancer: an overview. In V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, & P. A. Weil (Eds.), Harper's Illustrated Biochemistry, 31st ed. McGraw-Hill Education.
10. Kaufman, D. S., Shipley, W. U., & Feldman, A. S. (2009). Bladder cancer. The Lancet, 374(9685), 239–249. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60491-8
11. Kern, F., Aparicio-Puerta, E., Li, Y., Fehlmann, T., Kehl, T., Wagner, V., Ray, K., Ludwig, N., Lenhof, H. P., Meese, E., & Keller, A. (2021). miRTargetLink 2.0–interactive miRNA target gene and target pathway networks. Nucleic Acids Research, 49(W1), W409–W416. https://doi.org/10.1093/nar/gkab297
12. Kern, F., Fehlmann, T., Solomon, J., Schwed, L., Grammes, N., Backes, C., Van Keuren-Jensen, K., Craig, D. W., Meese, E., & Keller, A. (2020). miEAA 2.0: integrating multi-species microRNA enrichment analysis and workflow management systems. Nucleic Acids Research, 48(W1), W521–W528. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa309
13. Kim, H. J., Fay, M. P., Feuer, E. J., & Midthune, D. N. (2000). Permutation tests for joinpoint regression with applications to cancer rates. Statistics in Medicine, 19(3), 335–351. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0258(20000215)19:3<335::aid-sim336>3.0.co;2-z
14. Lai, C., Hu, Z., Hu, J., Li, Z., Li, L., Liu, M., Wu, Z., Zhou, Y., Liu, C., & Xu, K. (2024). Screening model for bladder cancer early detection with serum miRNAs based on machine learning: A mixed-cohort study based on 16,189 participants. Cancer Medicine, 13(20), e70338. https://doi.org/10.1002/cam4.70338
15. Lee, M. L. T., & Whitmore, G. A. (2002). Power and sample size for DNA microarray studies. Statistics in Medicine, 21(23), 3543–3570. https://doi.org/10.1002/sim.1335

16. Ling, H., Pickard, K., Ivan, C., Isella, C., Ikuo, M., Mitter, R., Spizzo, R., Bullock, M., Braicu, C., Pileczki, V., Vincent, K., Pichler, M., Stiegelbauer, V., Hoefler, G., Almeida, M. I., Hsiao, A., Zhang, X., Primrose, J., Packham, G., … Nicoloso, M. S. (2016). The clinical and biological significance of miR-224 expression in colorectal cancer metastasis. Gut, 65(6), 977–989. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309372

17. Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. Nature Cell Biology, 21(1), 9–17. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9

18. Moisoiu, T., Dragomir, M. P., Iancu, S. D., Schallenberg, S., Birolo, G., Ferrero, G., Burghelea, D., Stefancu, A., Cozan, R. G., Licarete, E., Allione, A., Matullo, G., Iacob, G., Bálint, Z., Badea, R. I., Naccarati, A., Horst, D., Pardini, B., Leopold, N., & Elec, F. (2022). Combined miRNA and SERS urine liquid biopsy for the point-of-care diagnosis and molecular stratification of bladder cancer. Molecular Medicine, 28(1), 39. https://doi.org/10.1186/s10020-022-00462-z

19. Qin, J.-X., Liu, X., Wang, X.-L., Wang, G.-Y., Liang, Q., Dong, Y., Pang, K., Hao, L., Xue, L., Zhao, Y., Hu, Z.-X., Li, R., Lv, Q., Chao, L., Meng, F.-L., Shi, Z.-D., & Han, C.-H. (2022). Identification and analysis of microRNA editing events in recurrent bladder cancer based on RNA sequencing: microRNA editing level is a potential novel biomarker. Frontiers in Genetics, 13, 984279. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.984279

20. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Research, 13(11), 2498–2504. https://doi.org/10.1101/gr.1239303

21. Shukla, G. C., Singh, J., & Barik, S. (2011). MicroRNAs: processing, maturation, target recognition and regulatory functions. Molecular and Cellular Pharmacology, 3(3), 83–92.

22. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. Nucleic Acids Research, 49(D1), D605–D612. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074

23. Tang, Y., Li, M., Wang, J., Pan, Y., & Wu, F. X. (2015). CytoNCA: a cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks. Biosystems, 127, 67–72. https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2014.11.005

24. Tilki, D., Burger, M., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Hakenberg, O. W., Palou, J., Reich, O., Rouprêt, M., Shariat, S. F., & Zlotta, A. R. (2011). Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. European Urology, 60(3), 484–492. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.05.053

25. Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clinical Chemistry, 56(11), 1733–1741. https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405

26. Wu, P., Li, D., Zhang, C., Dai, B., Tang, X., Liu, J., Wu, Y., Wang, X., Shen, A., Zhao, J., Zi, X., Li, R., Sun, N., & He, J. (2024). A unique circulating microRNA pairs signature serves as a superior tool for early diagnosis of pan-cancer. Cancer Letters, 588, 216655. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216655

27. Wu, P., Zhang, B., Ocansey, D. K. W., Xu, W., & Qian, H. (2021). Extracellular vesicles: a bright star of nanomedicine. Biomaterials, 269, 120467. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials. 2020. 120467

28. Xie, Y., Ma, X., Chen, L., Li, H., Gu, L., Gao, Y., Zhang, Y., Li, X., Fan, Y., Chen, J., & Zhang, X. (2017). MicroRNAs with prognostic significance in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. Scientific Reports, 7(1), 5619. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05801-3

Pateicības

Vispirms vēlos izteikt vissirsnīgāko un dziļāko pateicību savai promocijas darba zinātniskajai vadītājai profesorei Miki Nakazavai-Miklaševičai, kuras atbalsts jau no paša sākuma ir bijis patiesi novērtējams. Viņa iemācīja man laboratorijas darba pamatus – sākot ar pirmajiem eksosomu izolēšanas soļiem līdz pat vissarežģītākajām analīzēm – un vienmēr bija līdzās, kad man bija nepieciešams padoms. Visdārgākā man ir apziņa, ka jebkurā brīdī varēju vērsties pie viņas un viņa nekad neatteica palīdzību. Viņa atbalstīja mani ikvienā šī darba posmā – ar pacietību, humoru un nesatricināmu ticību manām spējām, iedrošinot mani pat tad, kad pati sevī šaubījos.

Tāpat esmu dziļi pateicīga savam promocijas darba līdzvadītājam Jurim Plonim par viņa padomiem un ieguldījumu visā šī ceļa garumā.

Vēlos izteikt sirsnīgu pateicību profesoram Edvīnam Miklaševičam par iespēju uzsākt doktorantūras studijas un par pētījuma pamatkoncepciju, kas veidoja šo darbu. Viņa iedrošinājums un motivācija, īpaši vissarežģītākajos brīžos, atgādināja, ka vienmēr jāturpina iet uz priekšu – lai cik grūts arī nešķistu ceļš.

No sirds vēlos pateikties visam Rīgas Stradiņa universitātes Onkoloģijas un molekulārās ģenētikas institūta kolektīvam. Lai gan nav iespējams nosaukt katru atsevišķi, ikviens kolēģis savā veidā sniedza ieguldījumu – atbalstot, daloties padomos un iedrošinot, īpaši vissarežģītākajos šī ceļa brīžos. Viņu kopējais gars palīdzēja man atrast jēgu un mērķi šajā darbā tieši tad, kad tas bija visvairāk nepieciešams. Īpašu pateicību esmu parādā profesorei Zandai Danebergai par viņas mentorību, atvērtību un iedrošinājumu ikvienā šī pētījuma posmā. Sirsnīgi pateicos Mihailam Šatcam, Anetei Čerņeikinai un Inesei Čakstiņai-Dzērvei par tehnisko palīdzību, profesionālajiem padomiem un koleģiālo atbalstu.

Vēlos pateikties arī Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas kolēģiem par nenovērtējamo palīdzību pacientu atlasē un paraugu vākšanā, kas bija būtiska šī pētījuma sekmīgai norisei.

Sirsnīgu pateicību veltu Rīgas Tehniskās universitātes profesoram Dmitrijam Blizņukam, kura zināšanas mašīnmācīšanās jomā bija izšķirošas šajā darbā iegūto ievērojamo rezultātu sasniegšanā.

No sirds vēlos pateikties visiem pacientiem, kuri, neraugoties uz savām veselības grūtībām, izvēlējās piedalīties šajā pētījumā cerībā nākotnē palīdzēt citiem. Viņu drosme un dāsnums padarīja šo pētījumu iespējamu.

Esmu pateicīga saviem skolotājiem un mentoriem visā manas dzīves garumā, kuri veidoja mani par to ārstu un cilvēku, kāda esmu šodien, kā arī savai dārgajai draudzenei Ingai Sūnai un viņas ģimenei par nemainīgo iedrošinājumu un atbalstu.

Visbeidzot un visdziļāk pateicos savai ģimenei. Savām meitām Ariannai un Olīvijai Elīzei Barlotei – šis darbs bija ne tikai man, bet arī viņām. Jūs ik dienu devāt man spēku un jēgu. Savai mammai Valentīnai Bitiņai, tētim Jurijam Bitiņam, māsām Svetlanai un Mariannai Bitiņai un māsasmeitai Margaritai Andrejevai – esmu bezgala pateicīga. Bez manas ģimenes, kas ikvienā solī bija man līdzās, nekas no tā nebūtu bijis iespējams.