



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Τα miRNAs ως προγνωστικοί και προβλεπτικοί
δείκτες στην Ακτινοθεραπεία του πρώιμου
καρκίνου του προστάτη**

Στέφανος Κάχρης

Ηράκλειο 2022

ἐν μόνον ἀγαθόν εἶναι, τὴν ἐπιστήμην, καὶ ἐν μόνον
κακὸν, τὴν ἀμαθίαν

Σωκράτης (*Διογένης Λαέρτιος: Σωκράτης, 2.31*)

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Μαυρουδής Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, επιβλέπον μέλος

Σπαντίδος Δημήτριος, Ομότιμος Καθηγητής Ιολογίας

Σοφράς Φραγκίσκος, Ομότιμος Καθηγητής Ουρολογίας

Πρόλογος

Η εκπληκτική τεχνολογική πρόοδος της ακτινοθεραπείας τα τελευταία χρόνια έχει επιτύχει εξαιρετικά σύμμορφες θεραπείες και κατανομές δόσης αδιανόητες τις προηγούμενες δεκαετίες. Οι ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του προστάτη έχουν ωφεληθεί τα μέγιστα από τις σύγχρονες τεχνικές, με ογκολογικά αποτελέσματα τουλάχιστον ισάξια με αυτά των χειρουργικών τεχνικών. Όμως, την εξατομίκευση αυτή του πλάνου θεραπείας για κάθε ασθενή δεν ακολουθεί η εξατομίκευση της συνταγογράφησης της δόσης, η οποία βασίζεται ακόμα και σήμερα σε στατιστικές αναλύσεις μεγάλων μελετών και μετααναλύσεων. Η ιατρική ακριβείας δεν έχει βρει ακόμα τον δρόμο της σ' αυτή τη συνιστώσα της ακτινοθεραπείας. Λόγω έλλειψης κατάλληλων προβλεπτικών και προγνωστικών βιοδεικτών δεν είναι δυνατή η εκτίμηση του αποτελέσματος της θεραπείας, η πιθανότητα εμφάνισης παρενεργειών, η πιθανότητα αποτυχίας και πρόοδου νόσου (τοπικής ή απομακρυσμένης) ή η εκ των προτέρων γνώση για το επίπεδο δόσης που θα προσφέρει μια σημαντική πιθανότητα ίασης για έναν συγκεκριμένο ασθενή.

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να μελετήσει τις διαφορές στις συγκεκριμένες τεσσάρων κυκλοφορούντων miRNAs στον ορό ασθενών που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία για καρκίνο του προστάτη με στόχο τη συσχέτισή τους με τα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά και την πορεία της νόσου, ώστε να αναδειχτούν νέοι πιθανοί προβλεπτικοί ή προγνωστικοί βιοδείκτες. Επίσης, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των ευρημάτων με γονιδιακούς στόχους και μοριακές οδούς μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης, ώστε να συνδεθούν ορθολογικά τα εργαστηριακά ευρήματα με το κλινικό αποτέλεσμα.

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στα εργαστήρια της Κλινικής Ιολογίας και της Μεταφραστικής Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε ασθενείς που έλαβαν ακτινοθεραπεία για καρκίνο προστάτη στο τμήμα Ακτινοθεραπείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, υπό την επίβλεψη και υποστήριξη των καθηγητών Παθολογικής Ογκολογίας και Δημητρίου Μαυρουδή και Κλινικής Ιολογίας και Γεωργίου Σουρβίνου.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη από τους αξιότιμους καθηγητές και τους αγαπητούς φίλους και συνεργάτες.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Δημήτρη Μαυρουδή πρώτα απ' όλα για την εμπιστοσύνη που μου δείχνει όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας, για την αμέριστη συμπαράστασή του, την ουσιαστική καθοδήγηση και την υποστήριξη από την αρχή μέχρι και την ολοκλήρωση της διατριβής. Επίσης, τον ευχαριστώ για την υπομονή, τον χρόνο και τους πόρους που διέθεσε ώστε να έχουμε ένα αίσιο τέλος.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κύριο Γεώργιο Σουρβίνο για την πολύτιμη καθοδήγηση και την υποστήριξη στο χώρο του εργαστηρίου της Κλινικής Ιολογίας. Χωρίς τη βοήθεια του ίδιου και των πολύτιμων συνεργατών του θα ήταν πολύ δύσκολη έως και αδύνατη η ολοκλήρωση του εργαστηριακού τμήματος της διατριβής.

Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους καθηγητές κύριο Δημήτριο Σπαντίδο και κύριο Φραγκίσκο Σοφρά για την εμπιστοσύνη και τη θερμή υποστήριξη αυτής της διατριβής, από την πρώτη στιγμή και χωρίς καν δεύτερη σκέψη.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στις κυρίες Ελίζα Τσίτουρα και Χρυσάνθη Κοκκινάκη για την ανεκτίμητη βοήθεια στο σκέλος του εργαστηρίου. Οι πολύτιμες γνώσεις και η εμπειρία της πρώτης και η τεχνική κατάρτιση και η εργατικότητα της δεύτερης έφεραν εις πέρας τις πολύωρες και κοπιαστικές αντιδράσεις της RT-qPCR, παρέχοντας τα εργαστηριακά δεδομένα της μελέτης μας. Για έναν κλινικό ιατρό όπως εγώ, η επιβίωσή μου σε συνθήκες εργαστηρίου θα ήταν εξαιρετικά δύσκολη.

Περισσότερο απ' όλα, θέλω να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην κα Χαρά Παπαδάκη, χωρίς τη συνολική και πολυεπίπεδη βοήθειά της θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση αυτού του έργου. Η στατιστική ανάλυση, η βιοπληροφορική ανάλυση και η συγγραφή της ξενόγλωσσης δημοσίευσης των αποτελεσμάτων μας οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στη δική της συνεισφορά.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον αγαπητό συνάδελφο κο Κώστα Ρούνη για την πολύτιμη βοήθεια στη στατιστική επεξεργασία και την παρουσίαση των δεδομένων, τον κο Χριστόφορο Νικολάου για την εξειδικευμένη του βοήθεια στη βιοπληροφορική ανάλυση, τις πάντα πρόθυμες για βοήθεια νοσηλεύτριες του τμήματος Ακτινοθεραπείας κες Χρύσα και Μαρία Φραγκιαδάκη και όλους τους άλλους φίλους και συνεργάτες που συνέβαλαν με τον τρόπο τους σ' αυτό το έργο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για τη συνεχή υποστήριξη και την αμέριστη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής και ιδιαίτερα στην εξαιρετική φιλόλογο σύζυγό μου, για τη γραμματική και συντακτική επιμέλεια του κειμένου.

Είμαι ευγνώμων και σας ευχαριστώ όλους!

Περιεχόμενα

Πρόλογος	ii
Ευχαριστίες	iii
Περιεχόμενα	v
Περιεχόμενα εικόνων	viii
Περιεχόμενα πινάκων	x
Συντιμήσεις	xi
Περίληψη	xiv
Summary	xv
1. Γενικό μέρος	1
1.1. Καρκίνος του προστάτη	1
1.1.1. Εισαγωγή	1
1.1.2. Διάγνωση	2
1.1.3. Ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA)	4
1.1.4. Ο ρόλος της υγρής βιοψίας	6
1.1.5. Θεραπευτικές επιλογές για τον καρκίνο του προστάτη	6
1.2. Ακτινοθεραπεία	7
1.2.1. Γενικά εισαγωγικά	7
1.2.2. Είδη ακτινοβολίας	8
1.2.3. Βιολογική δράση της ακτινοβολίας	8
1.2.4. Η τέχνη της ακτινοθεραπείας	9
1.2.5. Ακτινοθεραπεία στον καρκίνο του προστάτη	11
1.3. Τα microRNAs	12
1.3.1. Ιστορική αναδρομή	12
1.3.2. Ονοματολογία	14
1.3.3. Τα γονίδια των miRNAs	14
1.3.4. Έκφραση των miRNAs	15

1.3.5.	Μεταγραφή και ωρίμανση των miRNAs	15
1.3.6.	Μηχανισμός δράσης.....	17
1.3.7.	Ρυθμιστικοί ρόλοι των miRNAs	18
1.3.8.	Ιοί και miRNA	19
1.3.9.	Ο ρόλος των miRNAs στις ανθρώπινες νόσους.....	21
1.3.10.	Ο ρόλος των miRNAs στην καρκινογένεση	22
1.3.11.	Κυκλοφορούντα miRNAs.....	25
1.3.12.	Τα miRNAs ως βιοδείκτες.....	26
1.4.	MicroRNAs και ακτινοθεραπεία.....	27
1.4.1.	Epidermal growth factor receptor (EGFR)	29
1.4.2.	Insulin-like growth factor receptor type 1	29
1.4.3.	Οδός PI3K/ATK	29
1.4.4.	Οδός MAPK/ERK.....	30
1.4.5.	Οδός NF-κB.....	30
1.4.6.	Οδός TGF-β	30
1.4.7.	Γονίδια απόκρισης στη βλάβη του DNA και ρύθμισης κυτταρικού κύκλου	31
1.4.8.	Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και miRNAs	31
1.4.9.	MiRNAs και ακτινοθεραπεία στον άνθρωπο	32
1.5.	Τα microRNAs στον καρκίνο του προστάτη.....	34
1.5.1.	Λειτουργικός ρόλος της απορρύθμισης των miRNA στον καρκίνο του προστάτη.....	34
1.5.2.	Απόπτωση και miRNAs.....	35
1.5.3.	Τα miRNAs και η κυτταρική διήθηση και μετανάστευση.....	37
1.5.4.	Τα miRNAs και η σηματοδότηση των ανδρογόνων	39
1.5.5.	Τα miRNAs και η οδός PTEN/AKT	40
1.5.6.	MiRNAs και συντήξεις γονιδίων TMPRSS2:ETS	41

1.5.7.	Τα miRNAs και οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA που εξαρτώνται από την EZH2	42
1.5.8.	Κυκλοφορούντα miRNAs στον καρκίνο του προστάτη	42
1.5.9.	Τα miRNAs ως βιοδείκτες στον καρκίνο του προστάτη.....	47
2.	Ειδικό μέρος.....	51
2.1.	Υλικό και μέθοδος	52
2.1.1.	Επιλογή των miRNAs.....	52
2.1.2.	Ασθενείς	53
2.1.3.	Λήψη δειγμάτων.....	54
2.1.4.	Απομόνωση του RNA	55
2.1.5.	Quantitative real-time PCR και έκφραση των miRNAs.....	55
2.1.6.	Στατιστική ανάλυση	56
2.1.7.	Γονίδια – στόχοι των miRNAs και ανάλυση εμπλουτισμού οδών (pathway enrichment analysis).....	57
2.2.	Αποτελέσματα	58
2.2.1.	Σχεδιασμός μελέτης και χαρακτηριστικά των ασθενών	58
2.2.2.	Στατιστικές συσχετίσεις της έκφρασης των miRNAs	61
2.2.3.	Έκφραση των miRNAs και κλινική έκβαση νόσου	64
2.2.4.	Ανάλυση στόχων και οδών εμπλουτισμού των mRNAs	66
2.3.	Συζήτηση	70
2.4.	Συμπεράσματα και προοπτικές	78
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	115

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1. Επίπτωση και θνητότητα των συχνότερων νεοπλασιών στους άρρενες	2
Εικόνα 2. Υγρή βιοψία.....	7
Εικόνα 3. Παραδείγματα προγονικών βρόγχων δύο miRNAs.	15
Εικόνα 4. Η βιογένεση των miRNAs.....	16
Εικόνα 5. Οι λειτουργίες σίγασης των miRNAs.....	18
Εικόνα 6. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του καρκίνου και οι αντίστοιχες θεραπευτικές προσεγγίσεις. (59).....	22
Εικόνα 7. MiRNAs που εμπλέκονται στα σηματοδικά μονοπάτια του καρκίνου.	24
Εικόνα 8. Η βιογένεση των miRNAs και οι τρόποι εξωκυττάριας συσκευασίας	26
Εικόνα 9. Τα miRNAs που εμπλέκονται στην ανταπόκριση του κυττάρου στην έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία.(90)	28
Εικόνα 10. Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τους κοινούς και τους ειδικούς στόχους κωδικοποίησης πρωτεϊνών των τεσσάρων αναλυθέντων miRNAs.....	58
Εικόνα 11. Διάγραμμα ροής της μελέτης.....	60
Εικόνα 12. Κατανομή τιμών PSA σε σχέση με την εμφάνιση βιοχημικής υποτροπής.	61
Εικόνα 13. Συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs και της τιμής του PSA πριν από την έναρξη της ακτινοθεραπείας.	62
Εικόνα 14. Έκφραση του miR-106b πριν από την ακτινοθεραπεία σε σχέση με (A) την εξωπροστατική επέκταση και (B) τη διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων.	63
Εικόνα 15. Επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων miRNAs πριν από και μετά την ακτινοθεραπεία.	64
Εικόνα 16. Διαφορική έκφραση των miR-21 και miR-106b σε υποομάδες ασθενών.	65
Εικόνα 17. Καμπύλες Kaplan Meier για την ολική επιβίωση.....	66
Εικόνα 18. Σχέδιο λειτουργικού εμπλουτισμού για την ομάδα των 628 γονιδίων που στοχεύονται από τουλάχιστον δύο miRNAs.....	68
Εικόνα 19. Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.	69

Εικόνα 20. Τα γονίδια στόχοι του miR-21, τα οποία εμπλέκονται σε μία επιτυχημένη ανάπτυξη καρκίνου.....	74
Εικόνα 21. Η διττή δράση του miR-106 στην ανάπτυξη του καρκίνου.....	75

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1. Βαθμονόμηση της International Society of Urological Pathology (ISUP) για τον καρκίνο του προστάτη	3
Πίνακας 2. Σύστημα ταξινόμησης του βαθμού κακοήθειας του καρκίνου του προστάτη της ESMO και του D'Amico και συν.....	3
Πίνακας 3. Σύστημα ταξινόμησης του βαθμού κακοήθειας του καρκίνου του προστάτη της EUA	3
Πίνακας 4. Τα MicroRNAs και οι Λειτουργίες τους	19
Πίνακας 5. Λειτουργίες των miRNAs.	20
Πίνακας 6. Τα miRNAs στις ανθρώπινες νόσους.....	21
Πίνακας 7. Τα miRNAs στις νεοπλασίες.....	23
Πίνακας 8. miRNAs που εμπλέκονται στην πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη.	49
Πίνακας 9. Κωδικοί των TaqMan Assays για κάθε εξεταζόμενο miRNA	56
Πίνακας 10. Χαρακτηριστικά των ασθενών.....	59
Πίνακας 11. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs με κλινικές παραμέτρους.	62
Πίνακας 12. Συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των τεσσάρων miRNAs	63
Πίνακας 13. Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης των miRNAs με την βιοχημική υποτροπή μετά την ΑΚΘ στις ομάδες υψηλού κινδύνου και ΑΚΘ διάσωσης.	65
Πίνακας 14. Ανάλυση οδών εμπλουτισμού σύμφωνα με την KEGG.....	67
Πίνακας 15. Jaccard Index.....	69
Πίνακας 16. Συσχέτιση του mir-21 με καλοήθη νοσήματα	77
Πίνακας 17. Συσχέτιση του mir-106b με καλοήθη νοσήματα	78

Συντμήσεις

3D-CRT:	Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy
AKT:	Protein Kinase B
ASTRO:	American Society for Therapeutic Radiology and Oncology
ATM:	ATM (Ataxia - Telangiectasia Mutated) serine/threonine kinase
AUA:	American Urological Association
AUC:	Area Under Curve
BAD:	BCL2 associated Agonist of cell Death
Bak1:	BCL2 Antagonist/Killer 1
Bcl-2:	B-cell lymphoma 2
BGT2:	B-cell translocation gene 2
BIM:	Bcl-2-like protein 11
BRCA1:	BReast CAncer type 1
CARPA:	Cancer of the Prostate Risk Assessment
CDC25:	Cell Division Cycle 25
CDK2:	Cyclin-Dependent Kinase 2
Chk1(2):	Checkpoint kinase 1(2)
CIC:	Protein capicua homolog
CRPC:	Castrate-Resistant Prostate Cancer
CSA:	Cockayne syndrome A
CTCs	Circulating tumor cells
ctDNA	Circulating tumor DNA
ddH ₂ O	Double-distilled water
DGCR:	DiGeorge Chromosomal Region
DNA:	DeoxyriboNucleic Acid
DNA-PK:	DNA-dependent serine/threonine Protein Kinase
dNTPs:	Deoxynucleotide Triphosphates
E2F1-3:	E2F Transcription Factor 1
EAU:	European Association of Urology
EMT:	Epithelial–Mesenchymal Transition
ERBB2:	Erythroblastic oncogene B 2, ή πιο γνωστό ως: HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) ή HER2/neu
ERG:	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog gene
ERK:	Extracellular signal-Regulated Kinase
ESMO:	European Society for Medical Oncology
ESTRO:	European Society for Therapeutic Radiology and Oncology
ETS:	E26 Transformation-Specific family
EAU:	European Association of Urology

EZH2:	Enhancer of Zeste Homolog 2
FAF1:	Fas Associated Factor 1
FOXO3:	Forkhead box O3
GAS5:	Growth Arrest-specific 5
HIF-1 α :	Hypoxia-inducible factor 1 α
hMSH2:	Human MutS Homolog 2
IER3:	Immediate Early Response 3
IGF:	Insulin-like Growth Factor
IGFBP:	Insulin-like Growth Factor-Binding Protein
IGRT:	Image-guided radiation therapy
IMRT:	Intensity-Modulated Radiation Therapy
ISUP:	International Society of Urological Pathology
KEGG:	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MCL1:	Myeloid Cell Leukemia 1
MCM7:	Minichromosome maintenance complex component 7
MDM2:	Mouse double minute 2 homolog (MDM2) επίσης γνωστή ως E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2
miRNA:	micro RNA
miRNP:	microRNA ribonucleoprotein complex
mRNA:	messenger RNA
mTOR:	mechanistic Target of Rapamycin
NBS1:	Nibrin
NCCN:	National Comprehensive Cancer Network
NF- κ B:	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHEJ:	Non-Homologous End Joining
NKRF:	NF- κ B Repressing Factor
noxa:	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
OS:	Overall survival
p14(ARF):	Alternate Reading Frame protein του τύπου p14
P70S6K:	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PDCD4:	Programmed Cell Death protein 4
PHLPP2:	PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase 2
PI3K:	PhosphoInositide 3-Kinase
PIK3CD:	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic subunit Delta
piRNAs:	Piwi-interacting RNAs
Piwi:	P-element Induced Wimpy testis
PSA:	Prostate Specific Antigen

PTEN:00	Phosphatase and tensin homolog
puma:	p53 upregulated modulator of apoptosis επίσης γνωστή ως Bcl-2-binding component 3
qRT-PCR:	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RAD51:	DNA repair protein RAD51 homolog 1
RECK:	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
REST:	RE-1 Silencing Transcription Factor
RFS:	Relapse-free survival
RISC:	RNA Induced Silencing Complex
RNA:	RiboNucleic Acid
ROC:	Receiver Operating Characteristic
SBTR:	Stereotactic Body Radiation Therapy
SGPP1:	Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1
SIOG:	International Society of Geriatric Oncology
siRNAs:	small interfering RNAs
SNX1:	Sorting nexin-1
SOX9	SRY(sex determining region Y)-Box Transcription Factor 9
SUO:	Society of Urologic Oncology
TGF:	Transforming (ή Tumor κατά άλλους) Growth Factor
TMPRSS2:	TransMembrane PRoteaSe, Serine 2
TNFSF10:	Tumor Necrosis Factor SuperFamily, member 10
VMAT	Volumetric Modulated Arc Therapy
Wnt:	Wingless-related integration site
YAP1:	Yes-associated protein 1
ZBTB7A:	Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A
ENY:	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Περίληψη

Η ακτινοθεραπεία αποτελεί βασική θεραπευτική επιλογή για τους ασθενείς με εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη. Δεν υπάρχουν μέχρι τώρα οι κατάλληλοι βιοδείκτες που να προβλέπουν το αποτέλεσμα της θεραπείας και να υποδεικνύουν μία ομάδα ασθενών σε μεγαλύτερο κίνδυνο για αρνητική εξέλιξη της νόσου, ώστε να λαμβάνονται έγκαιρα κατάλληλες θεραπευτικές αποφάσεις.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε τη σημασία της έκφρασης τεσσάρων miRNAs στην κλινική έκβαση ασθενών που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία και τη συσχέτισή τους με συγκεκριμένες κυτταρικές οδούς μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης. Τα επίπεδα έκφρασης των miR-21, miR106b, miR-141 και miR-375 εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο RT-qPCR στον ορό 56 ασθενών που έπασχαν από καρκίνο του προστάτη πριν και μετά την ακτινοθεραπεία.

Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-106b πριν από την ακτινοθεραπεία συσχετίστηκαν με εξωκαπική επέκταση νόσου και διήθηση σπερματοδόχων κύστεων ($p=0.031$ και 0.044 , αντίστοιχα). Στην υποομάδα ασθενών υψηλού κινδύνου ($n=47$), τα επίπεδα έκφρασης του miR-21 μετά την ακτινοθεραπεία ήταν υψηλότερα στους ασθενείς που εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή σε σύγκριση με τους υπόλοιπους ($p=0.043$). Στην υποομάδα ασθενών που έλαβαν ακτινοθεραπεία διάσωσης, ($n=20$), τα επίπεδα έκφρασης μετά την ακτινοθεραπεία των miR-21 και miR-106b ήταν υψηλότερα στους ασθενείς που εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή σε σχέση με αυτούς που δεν εμφάνισαν ($p=0.043$ και $p=0.032$, αντίστοιχα). Στο σύνολο των ασθενών της μελέτης, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του miR-21 πριν την ακτινοθεραπεία και του miR-106b μετά την ακτινοθεραπεία συσχετίστηκαν με στατιστικά σημαντική μικρότερη ολική επιβίωση ($p=0.049$ και $p=0.050$, αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασης των miR-141 και miR-375 με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ή την έκβαση της νόσου. Η βιοπληροφορική ανάλυση αποκάλυψε σημαντικό εμπλουτισμό σε οδούς απόκρισης στη βλάβη του DNA.

Συμπερασματικά, τα κυκλοφορούντα miRNAs πριν από ή μετά την ακτινοθεραπεία είναι πιθανό να έχουν προγνωστική σημασία σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του προστάτη.

Summary

Radiotherapy is a major treatment option for patients with localized prostate cancer. There are no suitable biomarkers to predict treatment outcome or to reveal a high-risk group of patients for disease progression, so that appropriate treatment decisions can be made in a timely manner.

In the present study we aimed to investigate the significance of miRNAs in the outcomes of prostate cancer patients undergoing radiotherapy and to identify the related pathways through bioinformatics analysis. The expression levels of miR-21, miR-106b, miR-141 and miR-375 involved in the response to radiotherapy were assessed by RT-qPCR in the serum of PCa patients (n=56) prior- and post-RT.

Low expression levels of miR-106b prior-RT were associated with extracapsular extension and seminal vesicles invasion by the tumor ($p=0.031$ and 0.044 , respectively). In the high-risk subgroup (n=47), post-RT expression levels of miR-21 were higher in patients with biochemical relapse (BR) compared to non-relapse ($p=0.043$). Also, in the salvage treatment subgroup (post-operative BR; n=20), post-RT expression levels of miR-21 and miR-106b were higher in patients with BR compared to non-relapse ($p=0.043$ and $p=0.032$, respectively). In the whole group of patients, high expression levels of miR-21 prior-RT and of miR-106b post-RT were associated with significantly shorter overall survival (OS; $p=0.049$ and $p=0.050$, respectively). No associations were observed among miR-141 and miR-375 expression levels with clinicopathological features or treatment outcome. Bioinformatics analysis revealed significant enrichment in DNA damage response pathways.

In conclusion, circulating miRNAs prior or post-RT may hold prognostic implications in patients with PCa.

1. Γενικό μέρος

1.1. Καρκίνος του προστάτη

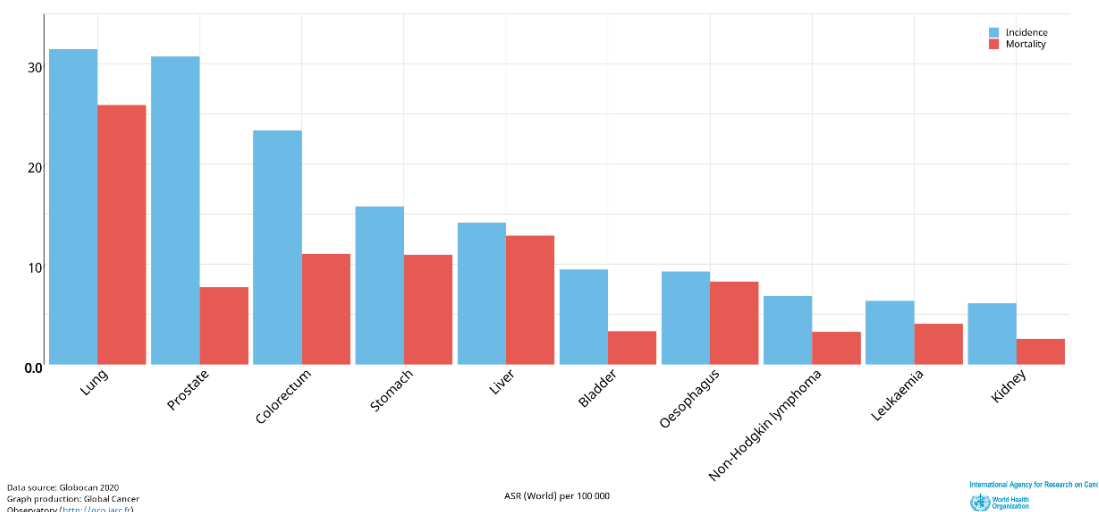
1.1.1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα εμφάνισης καρκίνο στους άρρενες σε παγκόσμιο επίπεδο, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, με 30,7 νέα περιστατικά ανά 100.000 άνδρες. Όμως πρόκειται για νόσο με αργή σχετικά εξέλιξη και σε συνδυασμό με την πρόοδο στην έγκαιρη διάγνωση και την αποτελεσματική θεραπευτική του αντιμετώπιση, τοποθετείται στην 6^η θέση όσο αφορά τη θνητότητα, με 7,7 θανάτους ανά 100.000 ανδρικού πληθυσμού.(1) Υπολογίζεται ότι το 2020 εμφανίστηκαν περίπου 1.193.000 νέα περιστατικά παγκοσμίως και συνέβησαν περίπου 375.000 θάνατοι εξαιτίας αυτού. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, όπου καταλαμβάνει την πρώτη θέση στη συχνότητα εμφάνισης νέων περιστατικών καρκίνου στους άνδρες, υπολογίζεται ότι το ποσοστό της 5ετούς επιβίωσης ανεξαρτήτως σταδίου φτάνει το 98%, υψηλότερο από κάθε άλλη κακοήθεια. Τα ποσοστά θανάτου έχουν μειωθεί κατά 52% από το 1985 έως το 2015.(2)

Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου είναι η μεγάλη ηλικία, τα υψηλά επίπεδα των ανδρογόνων, το κληρονομικό ιστορικό, διαιτητικοί παράγοντες και οι χρόνιες φλεγμονές.(3)

Το μεγαλύτερο ποσοστό καρκινωμάτων αναπτύσσεται στην περιφερική ζώνη του οργάνου (>70%). Πρόκειται κυρίως για αδenoκαρκινώματα, ενώ σπανιότερα ανευρίσκονται καρκινώματα από μεταβατικό επιθήλιο, πορογενή καρκινώματα, νευροενδοκρινείς όγκοι, σαρκώματα, λεμφώματα κ.α. Η επέκταση της νόσου μπορεί να γίνει είτε τοπικά, με διήθηση της κάψας, του γύρω λιπώδους ιστού, των σπερματοδόχων κύστεων, της ουρήθρας και της ουροδόχου κύστης ή του ορθού, είτε στους περιοχικούς λεμφαδένες είτε τέλος αιματογενώς, με μεταστάσεις κυρίως στα οστά, τους πνεύμονες, τον εγκέφαλο και το ήπαρ.

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, worldwide, males, all ages



Εικόνα 1. Επίπτωση και θνητότητα των συχνότερων νεοπλασιών στους άρρενες
Εκτιμώμενη επίπτωση και θνητότητα των συχνότερων νεοπλασιών στους άρρενες ανά 100.000 άτομα, για το 2020, σε παγκόσμιο επίπεδο.
Από: International Agency for Research on Cancer, <https://gco.iarc.fr>.

1.1.2. Διάγνωση

Οι κυριότεροι τρόποι πρώιμης διάγνωσης είναι η δακτυλική εξέταση και η μέτρηση του ειδικού προστατικού αντιγόνου ορού (PSA), με μικρή όμως θετική προγνωστική αξία (24% και 37% αντίστοιχα).(4) Τα τελευταία 30 χρόνια έχει συντελεστεί μια αξιοσημείωτη μεταβολή στη διάγνωση και τη σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη, ο οποίος, ενώ συνήθως ανευρισκόταν σε τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό στάδιο, σήμερα ανακαλύπτεται τυχαία με τις εξετάσεις διαλογής. Οι κυριότεροι οδηγοί αυτής της εξέλιξης είναι η μέτρηση του PSA ως δοκιμασία ελέγχου και της βιοψίας καθοδηγούμενης από διορθικό υπερηχοτομογράφημα για τη διάγνωση.

Ο βαθμός διαφοροποίησης κατά Gleason (Gleason score) αποτελεί ένα από τους βασικότερους προγνωστικούς δείκτες για την πορεία της νόσου. Σύμφωνα με τη βαθμονόμηση της International Society of Urological Pathology το 2014, η οποία είναι σε ισχύ στις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρίας του 2021(5), οι ασθενείς μπορούν να ταξινομηθούν σε 5 ομάδες, οι οποίες έχουν αποδειχθεί ότι συσχετίζονται πολύ καλά με το κίνδυνο υποτροπής, την 5ετή επιβίωση ελεύθερη βιοχημικής υποτροπής και την ειδική για τη

νόσο θνησιμότητα (Πίνακας 1).(6) Για την καλύτερη εκτίμηση του κινδύνου των ασθενών είναι απαραίτητο να λάβουμε υπόψη μας και τα επίπεδα του PSA.

Gleason Score	ISUP grade
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4, 3+5 ή 5+3)	4
9-10	5

Η περισσότερο διαδεδομένες ταξινομήσεις είναι αυτές των κατευθυντήριων οδηγιών της ESMO (7) και του D'Amico και συν.(8) και της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρίας(5), κατά τις οποίες οι ασθενείς χωρίζονται σε τρεις ομάδες κινδύνου, όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 2 και Πίνακας 3). Στους ανεγχείρητους όμως ασθενείς, η τιμή του Gleason score είναι απλώς ενδεικτική, καθώς δε μπορεί να καθοριστεί με ακρίβεια στα ιστοτεμάχια των βιοψιών με λεπτή βελόνα. Για το λόγο αυτό αναζητούνται νέοι δείκτες, όχι μόνο για την ορθή διάγνωση αλλά και για την ακριβέστερη ταξινόμηση των ασθενών όσον αφορά τον κίνδυνο από τη νόσο, που θα έχει ως συνέπεια τη λήψη της καλύτερης θεραπευτικής απόφασης.

Ασθενείς χαμηλού κινδύνου:	T1a-T2a, Gleason score=6, PSA<10 ng/ml
Ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου:	T2b-T2c, Gleason score=7, PSA=10-20 ng/ml
Ασθενείς υψηλού κινδύνου:	T≥T3a ή Gleason score=8-10 ή PSA>20 ng/ml

Ασθενείς χαμηλού κινδύνου	Ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου	Ασθενείς υψηλού κινδύνου	
PSA < 10 ng/mL και ISUP grade 1 (GS < 7) και cT1-2a	PSA 10–20 ng/ml ή ISUP grade 2/3 (GS 7) ή cT2b	PSA > 20 ng/mL ή ISUP grade 4/5 (GS > 7) ή cT2c	Οποιοδήποτε PSA, GS, ISUP grade, cT3–4, ή cN+
Εντοπισμένη νόσος			Τοπικά προχωρημένη νόσος

1.1.3. Ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA)

Το ειδικό προστατικό αντιγόνο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1979. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη 237 αμινοξέων με μοριακό βάρος 33kDa, η οποία κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 19, στη θέση 13 (19q13). Στο γονίδιο αυτό υπάρχει μία περιοχή σύνδεσης στεροειδών ορμονών, μέσω των οποίων επιτελείται η ρύθμισή του. Στην περιοχή αυτή συνδέονται κυρίως τα ανδρογόνα και σε μικρότερο βαθμό η προγεστερόνη, η οιστραδιόλη, η 1,25 (OH)₂D₃, ενεργοποιητές της τυροσινικής κινάσης και ο TGF-β. Παράγεται στα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη κυρίως (φυσιολογικός, υπερπλαστικός ή νεοπλασματικός ιστός) και εκκρίνεται στο σπερματικό υγρό όπου ασκεί πρωτεολυτική δράση, το καθιστά λεπτόρρευστο και έτσι αυξάνεται η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Στον προστάτη μπορεί να προκαλέσει διάσπαση των πρωτεϊνών δέσμευσης του αυξητικού παράγοντα παρόμοιου με την ινσουλίνη (IGFBPs) με αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας των IGF-I και IGF-II, τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καρκινική ανάπτυξη.(3)

Η αύξηση της συγκέντρωσης του PSA στο πλάσμα μπορεί να συμβεί εξαιτίας αρκετών καταστάσεων που διαταράσσουν τη φυσιολογική αρχιτεκτονική του προστάτη και ευνοούν τη διάχυσή του, όπως ο καρκίνος. Όμως, αρκετές άλλες καλοήθεις αιτίες προκαλούν την αύξησή της, όπως φλεγμονές (οξεία ή χρόνια προστατίτιδα), η δακτυλική εξέταση, η καλοήθης υπερτροφία, χειρουργικές επεμβάσεις ή βιοψίες και η εκσπερμάτιση και έτσι μειώνουν τη διαγνωστική του αξία, αυξάνοντας τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Όμως πρόκειται για μία απλή, ασφαλής και ευρέως αποδεκτή δοκιμασία, η οποία άλλαξε δραματικά το τοπίο στη διάγνωση και τη σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη, όπως και στη μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών και την εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία (ακτινοθεραπεία, ορμονοθεραπεία, χημειοθεραπεία).

Το PSA έχει αποδειχτεί ότι παράγεται σε πολύ μικρές ποσότητες σε σχέση με τον προστατικό ιστό και σε αρκετούς άλλους ιστούς αλλά και στις γυναίκες, όπως ο μαστός, οι σιελογόνοι αδένες, ο θυρεοειδής αδένας, αλλά και καρκίνους (π.χ. καρκίνος μαστού).(9) Στην κλινική πράξη όμως εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ως ειδικός προστατικός δείκτης.

1.1.3.1. Το PSA στη διάγνωση και τη σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη

Το PSA αποτελεί πιο ευαίσθητο δείκτη από τη δακτυλική εξέταση και το διορθικό υπερηχοτομογράφημα για τη διάγνωση του καρκίνου. Ο συνδυασμός και των τριών μπορεί να επιτύχει τη μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια.(10) Το 40% των καρκίνων που ανιχνεύονται με το PSA, δεν είναι ψηλαφητοί, ενώ αναφέρεται ότι το ποσοστό της υπερδιάγνωσης, της ανεύρεσης δηλαδή κλινικά μη σημαντικών καρκίνων, μπορεί να φτάνει και το 16%,(3) γι' αυτό και οι κατευθυντήριες οδηγίες για τη χρήση του ως εξέταση διαλογής είναι υπό αναθεώρηση.(6)

Η αυθαίρετη αρχική κλίμακα που πρότεινε ως φυσιολογικές τις τιμές έως 4ng/ml και «γκρίζα ζώνη» από 4-10ng/ml, αποδείχθηκε ανεπαρκής οδηγώντας είτε σε περιττές βιοψίες ανθρώπους μεγαλύτερης ηλικίας, στους οποίους αυξάνεται φυσιολογικά το PSA λόγω καλοήθους υπερτροφίας, είτε χάνοντας πρώιμους καρκίνους σε αυτά τα άτομα. Επίσης, σε ένα ποσοστό 15-20% των ανδρών με τιμή PSA από 2,5 έως 4ng/ml θα διαγνωστεί καρκίνος του προστάτη μέσα στην επόμενη 5ετία. Η ειδικότητα, η ευαισθησία και η θετική προγνωστική αξία της δοκιμασίας μπορεί να αυξηθεί με διάφορους τρόπους (ηλικιακό κατώφλι, ταχύτητα μεταβολής PSA, πυκνότητα PSA, λόγος free/total PSA, proPSA, BPSA),(11) χωρίς όμως να μπορούμε να εξαλείψουμε όλους τους περιορισμούς.

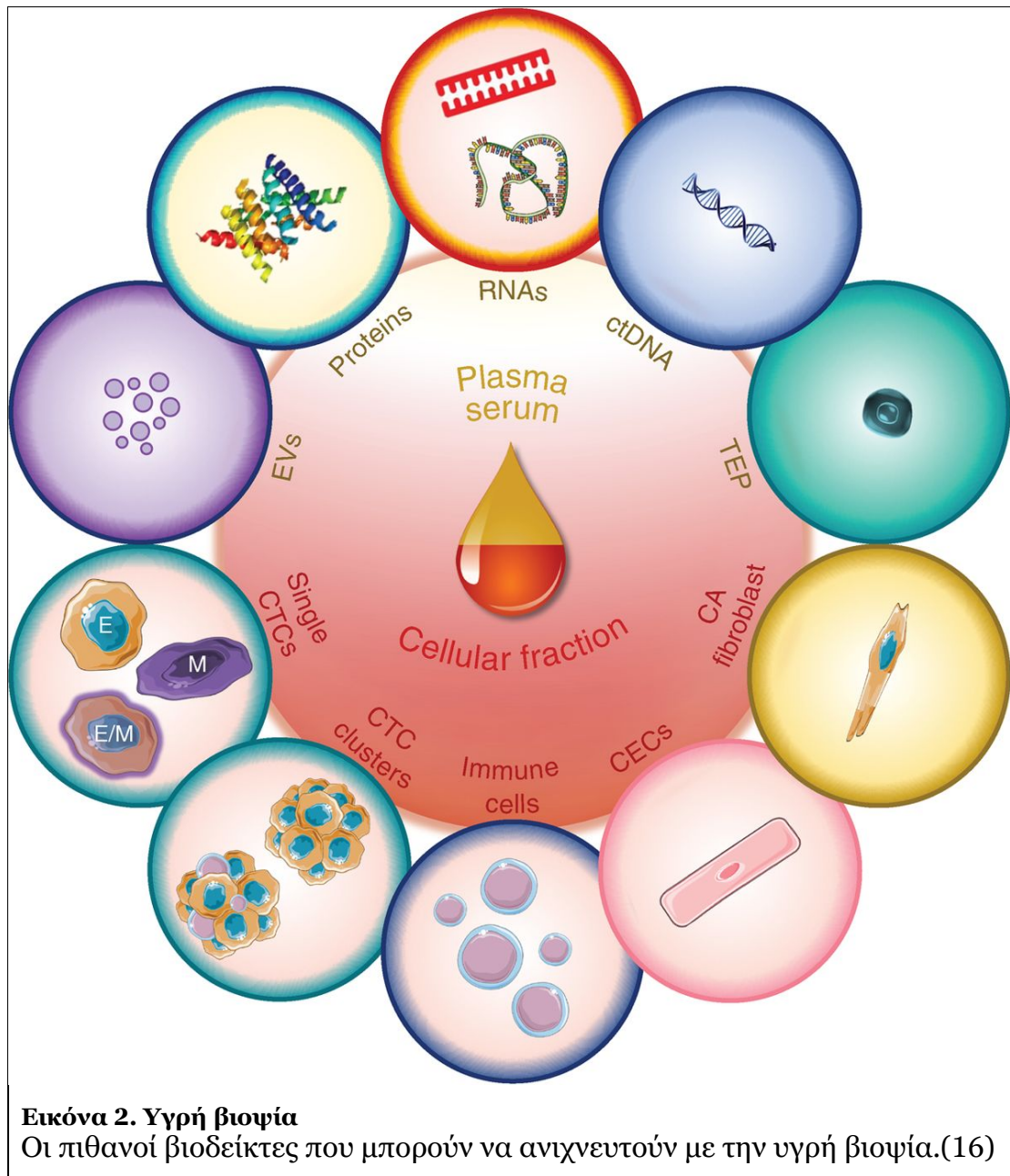
Παρόλο που οι τιμές του PSA έχουν συσχετιστεί τόσο με το κλινικό και το παθολογοανατομικό στάδιο της νόσου όσο με το καρκινικό φορτίο, από μόνες τους αδυνατούν να καθορίσουν επακριβώς το στάδιο της νόσου. Σε συνδυασμό όμως με το Gleason score και μέσω των μαθηματικών τύπων που διατύπωσε ο Roach το 1993 ή νομογραμμάτων που έχουν αναπτυχθεί(12) μπορούμε να εκτιμήσουμε με σχετική ακρίβεια την πιθανότητα εξωκαπικής επέκτασης της νόσου, της διήθησης των σπερματοδόχων κύστεων και της πιθανότητας λεμφαδενικής επέκτασης της νόσου. Οι τύποι αυτοί μπορεί να υπερεκτιμούν την πιθανότητα λεμφαδενικής νόσου ιδίως στα πρώιμα στάδια (T₁-T₂). (13)

1.1.4. Ο ρόλος της υγρής βιοψίας

Η υγρή βιοψία είναι μία πολλά υποσχόμενη, ελάχιστα επεμβατική δοκιμασία η οποία ανιχνεύει κυκλοφορούν DNA (ctDNA) προερχόμενο από τους όγκους, κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) ή άλλα μόρια ή συστατικά που προέρχονται από όγκους στο αίμα των ασθενών. Αν και η παρουσία των CTCs είχε αναφερθεί ήδη από το 1869(14) και του ctDNA από το 1987,(15) γνώρισε ιδιαίτερη άνθιση μόνο την τελευταία περίπου δεκαετία. Εκτός από το αίμα, όλα τα υπόλοιπα βιολογικά υγρά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο ανίχνευσης στοιχείων των όγκων, όπως σίελος, ούρα, ακόμα και το μητρικό γάλα. Η υγρή βιοψία μπορεί να βοηθήσει όχι μόνο στην πρόιμη διάγνωση των νεοπλασιών, αλλά και στην παρακολούθηση της εξέλιξής τους (πρόιμη ανίχνευση υποτροπών) και τη λήψη στοχευμένων θεραπευτικών αποφάσεων μέσω της ανίχνευσης μεταλλάξεων σε υποδοχείς ή άλλα μόρια-στόχους των καρκινικών κυττάρων. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της υγρής βιοψίας είναι ότι μπορεί να επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, σε αντίθεση με την κανονική ιστική βιοψία. Στον καρκίνο του προστάτη δεν έχει ακόμα ευρεία κλινική εφαρμογή, κυρίως λόγω έλλειψης καθορισμένων κατευθυντήριων οδηγιών και μεθόδων ανίχνευσης αλλά και της επιλογής των κατάλληλων βιοδεικτών.(14)

1.1.5. Θεραπευτικές επιλογές για τον καρκίνο του προστάτη

Οι θεραπευτικές επιλογές για έναν ασθενή που πάσχει από καρκίνο του προστάτη ποικίλλουν, ανάλογα την ομάδα κινδύνου στην οποία ανήκει, το στάδιο της νόσου και το προσδόκιμο επιβίωσής του. Ο ασθενής μπορεί να βρίσκεται σε απλή ή ενεργό παρακολούθηση, να υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση ή ακτινοθεραπεία ή να λάβει ορμονοθεραπεία, χημειοθεραπεία ή βιολογική θεραπεία. Υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες (6, 17) που προτείνουν μια λογική ακολουθία θεραπευτικών βημάτων, η οποία όμως πρέπει σε κάθε περίπτωση να εξατομικεύεται και να συζητείται με τον ασθενή.



1.2. Ακτινοθεραπεία

1.2.1. Γενικά εισαγωγικά

Ακτινοθεραπεία είναι η θεραπευτική προσέγγιση ασθενών που πάσχουν από κακοήθεις νεοπλασίες (ενίοτε και από καλοήθεις νόσους) με τη χρήση ιονιζουσών ακτινοβολιών. Σκοπός της ακτινοθεραπείας είναι η απόδοση επακριβούς δόσης ακτινοβολίας σε μία συγκεκριμένη περιοχή, με τη μικρότερη δυνατή ακτινοβόληση των γύρω φυσιολογικών ιστών, με στόχο την εκρίζωση της νόσου, την υψηλή ποιότητα ζωής των ασθενών και την επιμήκυνση της επιβίωσής τους.

1.2.2. Είδη ακτινοβολίας

Στην ακτινοθεραπεία χρησιμοποιούνται ιονίζουσες ακτινοβολίες, αυτές, δηλαδή, που προκαλούν ιονισμούς στο μέσο στο οποίο προσπίπτουν. Διακρίνονται σε ηλεκτρομαγνητικές και σωματιδιακές ακτινοβολίες. Οι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες αποτελούνται από τις ακτίνες-X και τις ακτίνες-γ. Είναι της ίδιας ποιότητας (ηλεκτρομαγνητικά κύματα) αλλά διαφέρουν στον τρόπο παραγωγής τους (ακτίνες-X: τεχνητά παραγόμενη ακτινοβολία από λυχνίες, επιταχυντές κλπ, ακτίνες-γ: εκπέμπονται από ασταθείς ραδιενεργούς πυρήνες, π.χ. Co-60, Ir-192 κλπ) και τις ενέργειες των φωτονίων τους. Οι σωματιδιακές ακτινοβολίες αποτελούνται από ταχέως κινούμενα σωματίδια όπως ηλεκτρόνια, πρωτόνια, νετρόνια, σωματίδια-α ή βαρέα ιόντα (πυρήνες άνθρακα, αζώτου, νέου, αργού κλπ). Στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται κυρίως ακτίνες-X και ηλεκτρόνια. Η αλληλεπίδρασή τους με την ύλη γίνεται με το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, το φαινόμενο Compton (το επικρατούν φαινόμενο για το φάσμα ενεργειών της ακτινοθεραπείας) και το φαινόμενο της διδύμου γενέσεως.(18)

1.2.3. Βιολογική δράση της ακτινοβολίας

Η βιολογική δράση της ακτινοβολίας συμβαίνει τόσο σε κυτταρικό επίπεδο, όσο και στο μικροπεριβάλλον των ιστών. Το μόριο – στόχος στην ακτινοθεραπεία είναι το DNA. Όταν μία δέσμη ακτίνων-X προσπέσει στο ανθρώπινο σώμα δημιουργείται ένας καταρράκτης από δευτερογενή ηλεκτρόνια μέσω του φαινομένου Compton. Τα ηλεκτρόνια αυτά είτε (σπανίως) πλήττουν άμεσα τα μόρια του DNA, είτε (συνήθως) αλληλεπιδρούν με τα μόρια του νερού και δημιουργούν ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου. Οι τελευταίες είναι μόρια εξαιρετικά δραστικά, πλήττουν τα οργανικά μόρια δημιουργώντας ελεύθερες οργανικές ρίζες. Οι ρίζες αυτές παρουσία οξυγόνου μετατρέπονται σε οργανικούς εστέρες και έτσι μονιμοποιείται η βλάβη.(19) Η προσβολή του DNA είτε από τις ελεύθερες ρίζες είτε άμεσα από τα ηλεκτρόνια έχει ως συνέπεια τη διάσπαση της μίας ή και των δύο ελίκων του.(20) Αυτό συνεπάγεται την ενεργοποίηση μιας σειράς μηχανισμών (DNA damage response -DDR- pathways) με στόχο την επιδιόρθωση της βλάβης ή την παύση του κυτταρικού κύκλου ή τέλος την ενεργοποίηση των μηχανισμών του αποπτωτικού θανάτου του κυττάρου.(21) Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας περιορίζεται από την

ενδογενή ακτινοαντοχή ορισμένων καρκινικών κυττάρων.(22) Στους μηχανισμούς ακτινοαντοχής περιλαμβάνονται η επιδιόρθωση του DNA,(23) η τροποποίηση – παραποίηση των αποπτωτικών σημάτων μετά τη βλάβη του DNA,(24) η αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των οξειδωτικών ριζών,(25) ελαττωματικές ενδοκυττάριας οδοί σηματοδότησης όπως αυτό της Πρωτεΐνης της Θερμικής Αποπληξίας 90 (Heat Shock Protein 90 -HSP90)(26) και ενεργοποίηση οδών επιθηλιακής – μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT).(27)

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας είναι η ύπαρξη υποξίας, της παθολογικής αυτής κατάστασης όπου οι ιστοί έχουν χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Η απουσία οξυγόνου στα κύτταρα εμποδίζει τη μονιμοποίηση των βλαβών της ακτινοβολίας (μειωμένη μετατροπή ελεύθερων οργανικών ριζών σε οργανικούς εστέρες). Επίσης, η κατάσταση αυτή προκαλεί -εν μέρει και μέσω της σταθεροποίησης του HIF-1α- ενεργοποίηση γονιδίων που αφορούν την επιβίωση και την ανάπτυξη του όγκου καθώς και υποβάθμιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA με αποτέλεσμα γενομική αστάθεια και ανάπτυξη περισσότερο επιθετικών φαινότυπων όγκου.(28) Η επίδραση της υποξίας περιορίζεται με την κλασματοποίηση της ακτινοθεραπείας, που αναφέρεται στην επόμενη παράγραφο, κατά την οποία ένα κλάσμα ακτινοθεραπείας σκοτώνει τα περισσότερα ευαίσθητα ευοξικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τα υποξικά κύτταρα να επανοξυγονώνονται και να ακτινοευαισθητοποιούνται μέχρι το επόμενο κλάσμα της ακτινοθεραπείας.(29)

Το μικροπεριβάλλον των ιστών επηρεάζεται κυρίως μέσω της δράσης της ακτινοβολίας στο ενδοθήλιο των αγγείων, προκαλώντας ανάλογα με τη δόση απόπτωση και καταστροφή αγγείων(30) ή ωρίμανση και αύξηση της αιμάτωσης.(31)

1.2.4. Η τέχνη της ακτινοθεραπείας

Η βιολογική δράση της ακτινοβολίας ισχύει τόσο για τα φυσιολογικά κύτταρα όσο και για τα καρκινικά. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν διαφορετική απόκριση στην ακτινοβολία και γενικά μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών σε σχέση με τα φυσιολογικά. Τις διαφορές αυτές προσπαθούμε με διάφορους τρόπους να τις μεγεθύνουμε, ώστε να προκαλέσουμε από τη μια τη

μεγαλύτερη δυνατή βλάβη στα καρκινικά κύτταρα και άρα να έχουμε μεγαλύτερη πιθανότητα ελέγχου της νόσου και από την άλλη τη μικρότερη δυνατή βλάβη στα φυσιολογικά κύτταρα και άρα λιγότερες παρενέργειες. Ήδη από τις απαρχές της ακτινοθεραπείας η προσπάθειά μας επικεντρώθηκε στον να ακτινοβολούμε όσο το δυνατόν πιο εύστοχα τον όγκο – στόχο και όσο το δυνατόν λιγότερο τους γύρω φυσιολογικούς ιστούς. Η ραγδαία εξέλιξη της τεχνολογίας επέτρεψε την εξέλιξη των τεχνικών της ακτινοθεραπείας σε υπερθετικό βαθμό σε λιγότερο από 20 χρόνια.(32) Αρχικά περάσαμε από τις απλές δισδιάστατες τεχνικές ακτινοθεραπείας στις τρισδιάστατες σύμμορφες τεχνικές (3D-CRT), με τρισδιάστατο καθορισμό του στόχου και των φυσιολογικών ιστών, ώστε η δέσμη των ακτίνων-X να κατευθύνεται με μεγαλύτερη ακρίβεια προς τον στόχο και να προσαρμόζεται στο σχήμα του, προστατεύοντας περισσότερο τα ευαίσθητα όργανα. Στη συνέχεια ήρθε η ακτινοθεραπεία με δέσμη διαμορφούμενης έντασης (IMRT), όπου μέσω της διαφορετικής έντασης της ακτινοβολίας μέσα στο ίδιο το πεδίο επιτυγχάνει ακόμα καλύτερη συμμόρφωση της δόσης γύρω από τον στόχο. Με απεικονιστικές τεχνικές και τον ασθενή στο μηχάνημα της θεραπείας (IGRT) βελτιώθηκε ακόμα περισσότερο η ακρίβεια στόχευσης του όγκου και μειώθηκαν τα σφάλματα τοποθέτησης του ασθενούς. Ακολουθώντας, με την τοξοειδή ακτινοβολία του ασθενούς στη VMAT τεχνική βελτιώθηκε ακόμα περισσότερο η συμμόρφωση της δόσης στον στόχο και η προστασία των φυσιολογικών δομών και παράλληλα μειώθηκε δραστικά ο χρόνος θεραπείας με ό,τι αυτό σημαίνει για την ποιότητα της θεραπείας (μείωση σφαλμάτων από την κίνηση του ασθενούς και του στόχου κατά τη διάρκεια της θεραπείας) αλλά και την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Τέλος, με τη στερεοτακτική ακτινοθεραπεία σώματος (SBRT), η οποία εφαρμόζεται σε λίγα κέντρα λόγω υψηλής εξειδίκευσης και απαιτητικού ποιοτικού ελέγχου, η θεραπεία ολοκληρώνεται μέσα σε μία εβδομάδα το πολύ και παρακάμπτονται ορισμένα ακτινοβιολογικά εμπόδια για την επιτυχία της θεραπείας.(33)

Ένας άλλος τρόπος για να διαφοροποιήσουμε τη δράση της ακτινοβολίας ανάμεσα στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα είναι η κλασματοποίηση. Η συνολική δόση της ακτινοβολίας στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων δε δίνεται εφάπαξ αλλά σε μικρές ημερήσιες δόσεις. Η κλασματοποίηση αυτή της δόσης βασίζεται σε ακτινοβιολογικά δεδομένα της εκάστοτε νόσου και των φυσιολογικών ιστών και αποσκοπεί στην πρόκληση της μέγιστης μόνιμης

βλάβης στη νόσο, δίνοντας την ευκαιρία στους φυσιολογικούς ιστούς να ανα-
νήψουν, κατά το δυνατόν, από τη ζημιά που έχει προκαλέσει η ακτινοβο-
λία.(19) Ο καρκίνος του προστάτη φαίνεται να διαφέρει ακτινοβιολογικά από
άλλες νεοπλασίες, επωφελούμενος κυρίως από λιγότερα σε αριθμό και μεγαλύ-
τερα σε δόση κλάσματα ακτινοβολίας.(34) Οι νεότερες ακτινοθεραπευτικές τε-
χνικές που αναφέραμε στην προηγούμενη παράγραφο μας δίνουν τη δυνατό-
τητα αυτή της υποκλασματοποίησης, να δίνουμε, δηλαδή, με ασφάλεια ημερή-
σια κλάσματα ακτινοβολίας μεγαλύτερα των 1,8-2Gy (συμβατική κλασματο-
ποίηση) και λιγότερα σε αριθμό.

1.2.5. Ακτινοθεραπεία στον καρκίνο του προστάτη

Η ακτινοθεραπεία αποτελεί μια από τις βασικότερες θεραπευτικές προσεγ-
γίσεις ασθενών με πρώιμο καρκίνο του προστάτη. Πλήθος τυχαιοποιημένων
μελετών και μετααναλύσεων την έχουν καθιερώσει ως ισάξια ογκολογικά थे-
ραπεία με τις χειρουργικές επεμβάσεις κάθε είδους και υποστηρίζεται στις κα-
τευθυντήριες οδηγίες των μεγαλύτερων και εγκυρότερων επιστημονικών εται-
ριών (ESMO, EAU/ESTRO/SIOG, NCCN, AUA/ASTRO/SUO).(5, 7, 35, 36)
Μπορεί να εφαρμοστεί ως ριζική θεραπεία, με ποσοστά 10ετούς επιβίωσης χω-
ρίς υποτροπή της τάξεως του 70-90%, συγκρίσιμα με αυτά της ριζικής προστα-
τεκτομής.(3) Μπορεί επίσης να εφαρμοστεί και ως συμπληρωματική θεραπεία,
μετά από ριζική προστατεκτομή, σε ασθενείς που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο
τοπικής υποτροπής, (π.χ. θετικά χειρουργικά όρια, εξωκαπική επέκταση της
νόσου ή διήθηση σπερματοδόχων κύστεων). Τέλος, εφαρμόζεται ως θεραπεία
διάσωσης μετά από ριζική προστατεκτομή σε ασθενείς που εμφανίζουν τοπική
ή βιοχημική υποτροπή.

Για την ακτινοθεραπεία του καρκίνου του προστάτη χρησιμοποιούνται σε
κάθε ακτινοθεραπευτικό τμήμα οι πιο σύγχρονες διαθέσιμες τεχνικές. Ο λόγος
είναι ότι από τη μία υπάρχει ευθέως ανάλογη συσχέτιση της αύξησης της δόσης
με τον τοπικό έλεγχο της νόσου και την επιβίωση των ασθενών,(37) από την
άλλη ο προστάτης βρίσκεται σε άμεση επαφή με την ουροδόχο κύστη και το
ορθό. Όσο πιο σύγχρονη είναι η εφαρμοζόμενη τεχνική, τόσο μεγαλύτερη είναι
η προστασία για τα όργανα αυτά και τόσο μικρότερο το ποσοστό παρενερ-
γειών. Παρόλα αυτά, η συνταγογραφούμενη δόση ακτινοβολίας βασίζεται α-
κόμα σε στατιστικά και μόνο κριτήρια μετααναλύσεων και μεγάλων

πολυκεντρικών μελετών, χωρίς να μπορεί να γίνει εξατομίκευσή της, καθώς δεν υπάρχουν προγνωστικοί και προβλεπτικοί δείκτες, ώστε να μπορούμε να λάβουμε εξατομικευμένες αποφάσεις.

Όμως, όπως συμβαίνει σε όλες τις νεοπλασίες και παρά την αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας στον καρκίνο του προστάτη, η ανάπτυξη ακτινοαντοχής αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στον έλεγχο της νόσου.(38) Η κατανόηση των μοριακών συμβάντων που προκαλούν αυτή την ακτινοαντοχή είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη τεχνικών και στρατηγικών που θα οδηγήσουν σε βελτιωμένες θεραπείες.

1.3. Τα microRNAs

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά μόρια RNA μήκους 18-25 νουκλεοτιδίων που ρυθμίζουν μία πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών.(39) Κωδικοποιούνται από το DNA ευκαρυωτικών πυρήνων όχι για να μεταφέρουν πληροφορίες για πρωτεϊνοσύνθεση, αλλά για να ρυθμίσουν την έκφραση των γονιδίων σε μετά-μεταγραφικό (post-transcriptional) στάδιο.(40) Αυτό επιτυγχάνεται με τη σύνδεσή τους στα messenger-RNAs (mRNAs) τα οποία περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα την καταστολή της μετάφρασης και άρα τη σίγαση (silencing) των γονιδίων.(41, 42) Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του mRNA σε δύο τμήματα, την αποσταθεροποίησή του με μείωση του μήκους της πολυαδενυλικής ουράς και την λιγότερο αποδοτική μετάφρασή του σε πρωτεΐνη στα ριβοσώματα.

1.3.1. Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη αναφορά για τα miRNAs έγινε το 1993 από τη Lee,(43) η οποία μελετούσε τα στάδια ανάπτυξης του σκώληκα *Caenorhabditis elegans* (Καινοραβδίτης ο κομψός). Πρόκειται για μη παρασιτικό νηματώδη σκώληκα ο οποίος ζει στο έδαφος και έχει μήκος περίπου 1mm. Στη μελέτη αυτή ανακάλυψαν το γονίδιο *lin-4*, το οποίο δεν κωδικοποιεί κάποια πρωτεΐνη αλλά μικρά RNAs, ένα από τα οποία έχει μήκος 22 βάσεων με μερική συμπληρωματικότητα με αρκετές αλληλουχίες του mRNA του γονιδίου *lin-14*. Αυτή η συμπληρωματικότητα

θεωρήθηκε ότι αναστέλλει τη μετάφραση του *lin-14* γονιδίου στην LIN-14 πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα τα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης να μειώνονται και ο σκώληκας να προχωρά στο επόμενο στάδιο ανάπτυξης. Εκείνη την εποχή, θεωρήθηκε ότι αυτό το RNA ήταν της ιδιοσυγκρασίας του νηματώδους.

Αργότερα, το 2000, βρέθηκε ένα δεύτερο μικρό RNA, το *let-7*, αρχικά στον ίδιο νηματώδη σκώληκα και έπειτα σε πολλά άλλα είδη συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου και για πρώτη φορά καθιερώθηκε ο όρος miRNA.(44) Έκτοτε τα miRNAs έχουν ανακαλυφθεί σε φυτά, ζώα όλων των ειδών (από πρωτόζωα έως θηλαστικά), ακόμα και σε ιούς. (45)

Εν τω μεταξύ, ανακαλύφθηκαν άλλα είδη μικρών μορίων RNA, όπως τα small interfering RNAs (siRNAs: μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs)(46) και τα Piwi-interacting RNAs (piRNAs: RNAs που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Piwi).(47) Τα περισσότερα από αυτά φαίνεται να λειτουργούν στα πλαίσια της ευρύτερης διεργασίας της σίγασης μέσω RNA. Η διαφορά τους συνίστανται στο γεγονός ότι τα miRNAs μετά τη μεταγραφή τους αναδιπλώνονται προς τους εαυτούς τους και σχηματίζουν διακριτές δομές δίκην φουρκέτας, ενώ τα siRNAs προκύπτουν είτε από πολύ μακρύτερες φουρκέτες οι οποίες αποδίδουν μόρια μεγαλύτερης ποικιλίας, είτε από συμπλέγματα RNA διπλής αλύσου. Τα piRNAs προκύπτουν από προγονικά μόρια χωρίς κανένα χαρακτηριστικό που να υπονοεί χαρακτηριστικά διπλής αλύσου.

Με την πάροδο του χρόνου ανακαλύπτονταν ολοένα και περισσότερα miRNAs και προσδιορίζονταν οι ρόλοι τους: πολλαπλασιασμός των κυττάρων, κυτταρικός θάνατος, μεταβολισμός λίπους στις μύες, νευρική ανάπτυξη στους νηματώδεις σκώληκες, διαφοροποίηση αιματολογικών σειρών στα θηλαστικά, έλεγχος της ανάπτυξης των φύλλων και των ανθών στα φυτά. Η πρώτη ασθένεια που συσχετίστηκε με διαταραχή των miRNAs ήταν η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. (48) Μέχρι τις αρχές του 2019 είχαν καταγραφεί περίπου 2300 διαφορετικά ώριμα miRNAs στον άνθρωπο. (49)

1.3.2. Ονοματολογία

Το επίσημο όνομα κάθε miRNA αποτελείται από τρία πρώτα γράμματα τα οποία υποδηλώνουν το είδος του οργανισμού όπου ανιχνεύονται ακολουθούμενο από το miR και στη συνέχεια από έναν αριθμό που δείχνει τη σειρά ανακάλυψής του, ανεξαρτήτως είδους.(50) Π.χ., hsa-miR-222 είναι το miRNA που ανακαλύφθηκε 222^ο και το hsa αναφέρεται στον άνθρωπο (*homo sapiens*). Αν κάποιο miRNA παράγεται από γονίδια δύο διαφορετικών τόπων, προστίθεται άλλος ένας αριθμός, π.χ. hsa-miR-1-1 (χρωμόσωμα 20) και hsa-miR-1-2 (χρωμόσωμα 18). Όταν υπάρχουν ελάχιστες διαφορές στις αλληλουχίες του ίδιου miRNA, προστίθεται επιπλέον ένα γράμμα της αλφαβήτου με αυξάνοντα τρόπο, π.χ. hsa-miR-27-a και hsa-miR-27-b.

1.3.3. Τα γονίδια των miRNAs

Τα miRNAs παράγονται από δικά τους γονίδια ή από ιντρόνια (introns). Η πλειονότητα των γονιδίων που έχουν χαρακτηριστεί ως miRNA-γονίδια εντοπίζονται είτε στις περιοχές του DNA που βρίσκονται ανάμεσα σε γονίδια (intergenic) είτε στην αντίθετη από την κωδικοποιούσα αλυσίδα (antisense) σε γειτονικό γονίδιο και έτσι θεωρούνται ότι μεταγράφονται ανεξάρτητα.(51) Σε μερικές όμως περιπτώσεις, το miRNA μεταγράφεται μαζί με το γονίδιο στο οποίο φιλοξενείται και έτσι θεωρείται ότι είναι συζευγμένη η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου με το αντίστοιχο miRNA.(52) Υπολογίζεται ότι περίπου το 40% των γονιδίων που κωδικοποιούν τα miRNAs μπορεί να βρίσκονται είτε στα ιντρόνια είτε στα εξώνια, στην πλευρά της κωδικοποιούσας αλυσίδας και έτσι μεταγράφονται και ρυθμίζονται μαζί με τα αντίστοιχα τους γονίδια. Άλλα γονίδια των miRNAs βρίσκονται σε συστοιχίες, με διάταξη και πρότυπο έκφρασης που υποδεικνύει μεταγραφή ως ένα ενιαίο αντίγραφο. Αυτή η διάταξη αποτελεί εξαίρεση για τον άνθρωπο, στη Δροσόφιλα όμως, πάνω από τα μισά γνωστά miRNAs της βρίσκονται σε συστοιχίες. Ενδιαφέρουσα συστοιχία στον άνθρωπο είναι αυτή των miR-15a και miR-16, τα οποία βρίσκονται σε μία περιοχή του χρωμοσώματος 13, η οποία πιστεύεται ότι φιλοξενεί ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Και αυτό, διότι είναι η θέση των πιο κοινών δομικών παρεκκλίσεων τόσο στο λέμφωμα τύπου μανδύα όσο και στη Β λεμφοκυτταρική λευχαιμία.(53)

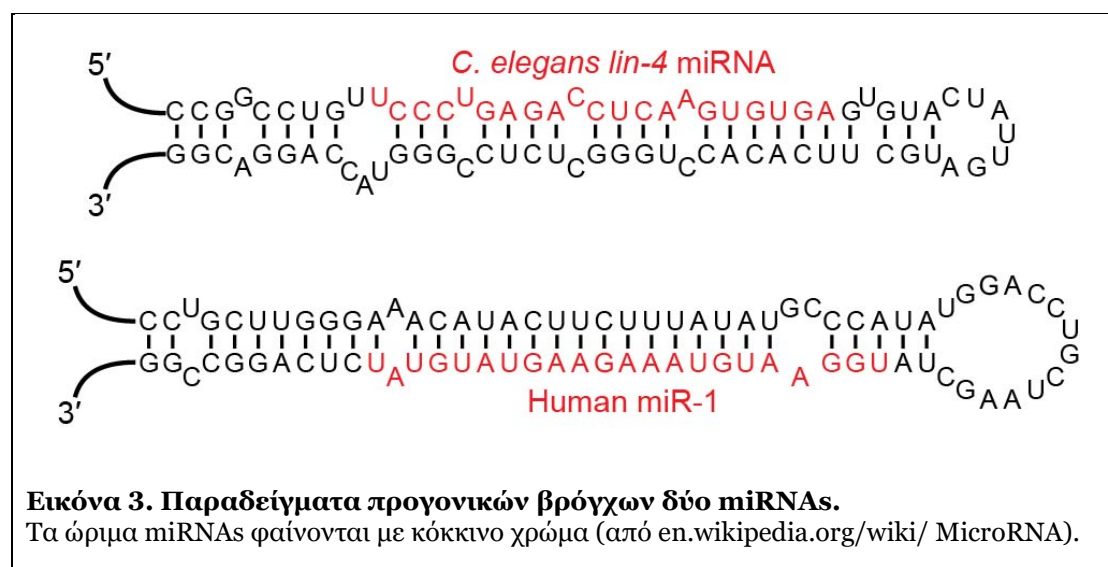
1.3.4. Έκφραση των miRNAs

Πολλά miRNAs έχουν ενδιαφέροντες τύπους έκφρασης. Για παράδειγμα, παράλογα και ορθόλογα (paralogs: ίδιο είδος, διαφορετική λειτουργία, orthologs: διαφορετικό είδος, παρόμοια λειτουργία) των miRNAs των *lin-4* και *let-7* του *C. elegans* έχουν ειδική έκφραση για κάθε στάδιο της εξέλιξης. Το miR-1 εντοπίζεται πρωταρχικώς στην καρδιά των θηλαστικών, το miR-122 εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ και το miR-223 βρίσκεται κυρίως στα κοκκιοκύτταρα και τα μακροφάγα του μυελού των οστών των ποντικών.(54)

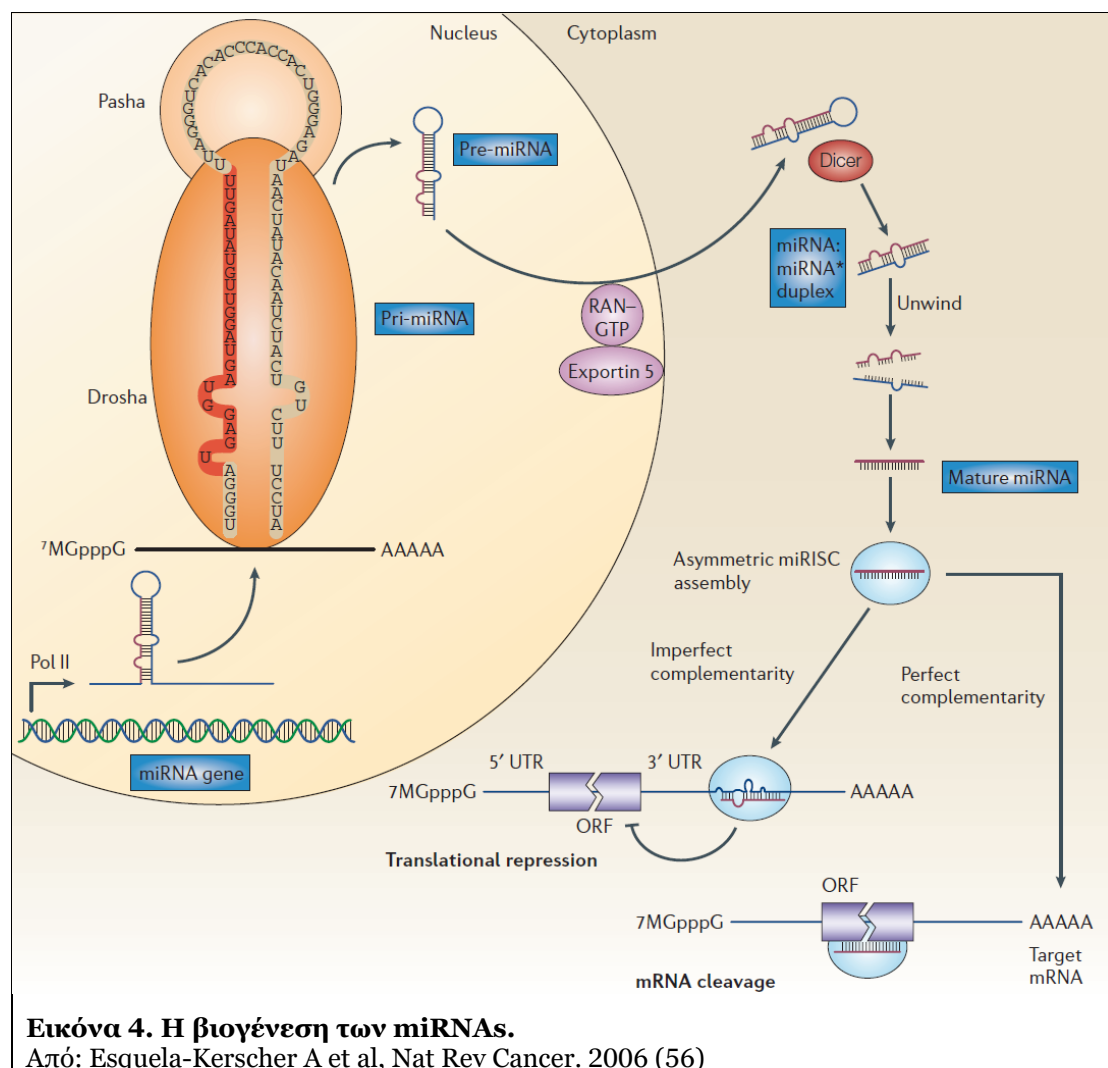
Μία άλλη αξιοσημείωτη όψη της έκφρασης των miRNAs είναι η ξεκάθαρη αφθονία συγκεκριμένων miRNAs στα κύτταρα. Για παράδειγμα, τα miR-2, miR-52, και miR-58 υπάρχουν κατά μέσο όρο σε περισσότερα από 50.000 μόρια ανά ενήλικο κύτταρο σκώληκα. Δεν είναι ακόμα γνωστό αν αυτή η υψηλή έκφραση αποδίδεται σε ενισχυμένη μεταγραφή ή αργή αποσύνθεση. Μερικά miRNAs εκφράζονται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα. Για παράδειγμα, το miR-124 είναι παρόν στον ενήλικο σκώληκα κατά μέσο όρο σε 800 μόρια ανά κύτταρο. Αυτό το χαμηλότερο επίπεδο μέσου όρου (αν και ακόμα υψηλότερο από ενός τυπικού mRNA) μπορεί να οφείλεται σε χαμηλή έκφραση σε πολλά κύτταρα ή υψηλή έκφραση σε μόλις λίγα κύτταρα.

1.3.5. Μεταγραφή και ωρίμανση των miRNAs

Τα miRNAs συνήθως αντιγράφονται από την RNA-πολυμεράση II,(51) ενώ κάποια λιγότερα αντιγράφονται από την RNA-πολυμεράση III. Η πολυμεράση συνδέεται σε έναν προωθητή (promoter) στο DNA ο οποίος βρίσκεται κοντά



στην περιοχή που θα αντιγραφεί και αντιγράφει μία αλληλουχία βάσεων. Στο μόριο αυτό το 5' άκρο καλύπτεται από πολλαπλά μόρια αδενοσίνης (ουρά poly(A)), αναδιπλώνεται και τα δύο σκέλη του ενώνονται. Έτσι, σχηματίζεται ένα αρχικό miRNA (pri-miRNA) σε σχήμα φουρκέτας. Στο επόμενο στάδιο, αποκόπτεται το πάνω μέρος της φουρκέτας από ένα σύμπλεγμα ενζύμων που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Drosha (RNA-άση) και DGCR8 (πρωτεΐνη που συνδέεται με μόριο DNA διπλής αλύσου) με αποτέλεσμα ένα ενδιάμεσο μόριο 60-70 βάσεων, το pre-miRNA.(42) Το μόριο αυτό εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με την Exportin 5, όπου μία δεύτερη RNA-άση, η Dicer αφαιρεί το τερματικό άκρο του pre-miRNA και απομένει ένα διπλό μόριο περίπου 20 βάσεων. Η μία από τις δύο αλύσους αποτελεί το ώριμο μόριο miRNA, το οποίο εισέρχεται σε ένα μεγάλο σύμπλεγμα πρωτεϊνών, το RISC (RNA induced



Εικόνα 4. Η βιογένεση των miRNAs.
 Από: Esquela-Kerscher A et al, Nat Rev Cancer. 2006 (56)

silencing complex). Η επιλογή γίνεται με βάση τη θερμοδυναμική αστάθεια και το λιγότερο ισχυρό ταίριασμα των βάσεων το 5' άκρο σε σχέση με την άλλη αλυσίδα (miRNA*). Έχει παρατηρηθεί ότι η αλυσίδα που σχεδόν πάντα εισέρχεται στο RISC είναι αυτή που το 5' άκρο της είναι πιο χαλαρά συζευγμένο. Η παρατήρηση αυτή υποθέτει ένα ένζυμο τύπου ελικάσης, το οποίο δοκιμάζει να ξεχωρίσει και τα δύο άκρα του συμπλόκου με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός να γίνεται με πολύ μεγαλύτερη μεροληψία στο πιο χαλαρό άκρο.(40) Το κομμάτι που δεν εισέρχεται στο RISC αποδομείται . Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου και οι δύο αλυσίδες είναι λειτουργικά miRNA που στοχεύουν διαφορετικούς πληθυσμούς mRNA.(55)

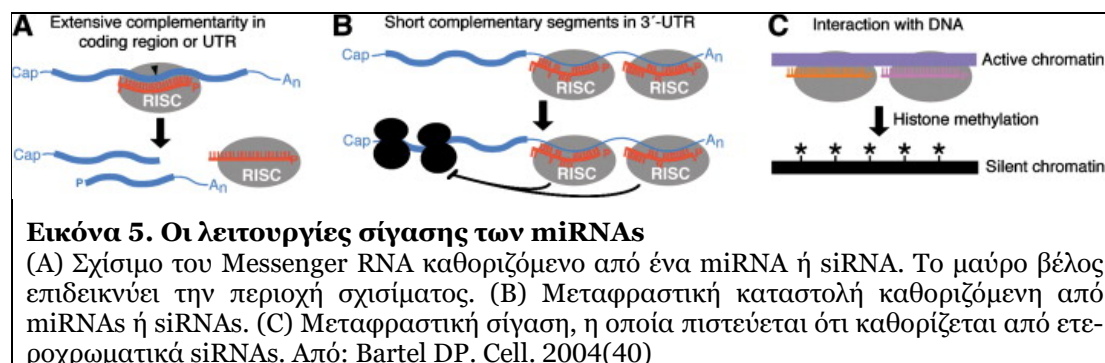
1.3.6. Μηχανισμός δράσης

Κεντρικό ρόλο στη λειτουργία του RISC παίζουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας των Αργοναυτών (Argonaute – Ago). Οι Ago περιέχουν δύο περιοχές που συνδέονται μόρια RNA: η περιοχή PAZ που συνδέεται το 3' άκρο του ώριμου miRNA και η περιοχή PIWI, η οποία δομικά ομοιάζει με ριβονουκλεάση-H και αλληλεπιδρά με το 5' άκρο της αλυσίδας - στόχου. Μερικές πρωτεΐνες Ago (π.χ. η Ago2) μπορούν να κόψουν απ' ευθείας το μόριο στόχο.

Αφότου εισέλθουν τα miRNA στο σύμπλεγμα RISC, το οποίο είναι και γνωστό ως miRNP (microRNA ribonucleoprotein complex), αυτό ενεργοποιείται (RISC*) και καθοδηγείται προς τα μόρια mRNA – στόχους που περιέχουν συμπληρωματικές ή σχεδόν συμπληρωματικές αλληλουχίες.

Η σίγαση των γονιδίων επιτυγχάνεται είτε με την αποδόμηση του mRNA είτε με την παρεμπόδιση της μετάφρασης. Για παράδειγμα, το miR-16 περιέχει συμπληρωματική αλληλουχία για πολλά mRNAs. Όταν αυτό συνδεθεί ολοκληρωτικά με ένα mRNA, τότε η Ago2 διασπά το mRNA, το οποίο οδηγείται σε άμεσο υποβιβασμό και αποσύνθεση. Η διάσπαση γίνεται ακριβώς μεταξύ των βάσεων 10 και 11 του miRNA. Όταν δεν υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα, η σίγαση επιτυγχάνεται με την παρεμπόδιση της μετάφρασης. Μερικές φορές, για να επιτευχθεί η σίγαση, είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη δράση πολλών miRNAs.(40) Αυτό προτείνει τη λεπτή ρύθμιση της έκφρασης ορισμένων γονιδίων τροποποιώντας ποσοτικά και ποιοτικά τις συγκεντρώσεις των miRNAs στο κύτταρο. Μία σημαντική διαφορά ανάμεσα στα ζωικά και τα φυτικά κύτταρα είναι

ότι στα φυτικά κύτταρα το ταίριασμα των αλληλουχιών είναι τελειότερο μεταξύ miRNA και mRNA και έτσι κύριος μηχανισμός σίγασης είναι η διάσπαση του mRNA. Στα ζωικά κύτταρα, το ατελές ταίριασμα όχι μόνο δεν γίνεται καλά ανεκτό αλλά μάλλον αποτελεί τον κανόνα.



Σε ένα 6% των ανθρώπινων miRNAs παρατηρείται επεξεργασία στην αλληλουχία των βάσεων μετά την αντιγραφή από το DNA (IsomiRs) με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να διαφέρει από αυτό που κωδικοποιήθηκε από το DNA. Αυτό αυξάνει την ποικιλία και τους στόχους δράσης των miRNA, πέρα από το συσχετιζόμενο γονίδιο.

1.3.7. Ρυθμιστικοί ρόλοι των miRNAs

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4)(41) αναφέρονται μερικά miRNAs τα οποία έχουν επιβεβαιωμένες λειτουργίες βασισμένες σε πειράματα. Για μερικές από τις περιπτώσεις αυτές, η λειτουργία καθορίστηκε από τις φαινοτυπικές συνέπειες από μεταλλαγμένο miRNA ή μία αλλαγμένη συμπληρωματική του θέση. Σε άλλες περιπτώσεις, η λειτουργία κατανοήθηκε από τα αποτελέσματα μεταλλάξεων διαγονιδιακών (transgenic) κατασκευών που οδήγησαν σε έκτοπη έκφραση του miRNA.

Για τη συντριπτική πλειονότητα των miRNAs, οι φαινοτυπικές συνέπειες της διακοπής ή της μεταβολής της ρύθμισής τους είναι άγνωστες. Όμως, έχουν αναπτυχθεί υπολογιστικές προσεγγίσεις για να βρουν τους ρυθμιζόμενους στόχους τους, παρέχοντας στοιχεία της λειτουργίας τους βασιζόμενα στο γνωστό ρόλο αυτών των στόχων. Σε επόμενο πίνακα (**Πίνακας 5**) αναφέρονται υπολογιστικά προβλεφθέντες στόχοι οι οποίοι επιβεβαιώθηκαν από επακόλουθα πειράματα ή ανεξάρτητες φυλογενετικές αποδείξεις. Μέσω υπολογιστικών

μεθόδων, έχει εκτιμηθεί ότι περίπου το ένα τρίτο των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ρυθμίζονται από τα miRNAs.(57)

Πίνακας 4. Τα MicroRNAs και οι Λειτουργίες τους

Παραδείγματα για τα οποία είναι γνωστές φαινοτυπικές συνέπειες από διαταραγμένη ή έκτοπη ρύθμιση miRNA Συντμήσεις Ειδών: *Caenorhabditis elegans*, Ce; *Drosophila melanogaster*, Dm; *Arabidopsis thaliana*, At.

miRNA	Γονίδιο(α) στόχος(ι)	Βιολογικός ρόλος του miRNA /Γονιδίου στόχου
Νηματώδης		
lin-4 RNA	<i>Ce lin-14</i> πιθανός μεταγραφικός παράγοντας	Χρονισμός πρώιμων αναπτυξιακών μεταβάσεων των προνυμφών
	<i>Ce lin-28</i> πρωτεΐνη τομέα ψυχρού shock	Χρονισμός πρώιμων αναπτυξιακών μεταβάσεων των προνυμφών
let-7 RNA	<i>Ce lin-41</i> πιθανή πρωτεΐνη σύνδεσης RNA	Χρονισμός όψιμων αναπτυξιακών μεταβάσεων των προνυμφών
	<i>Ce hbl-1</i> μεταγραφικός παράγοντας	Χρονισμός όψιμων αναπτυξιακών μεταβάσεων των προνυμφών
lsey-6 RNA	<i>Ce cog-1</i> μεταγραφικός παράγοντας	Δεξιά/Αριστερή ασυμμετρία της έκφρασης χημειούποδοχέων
Έντομα		
<i>bantam</i> miRNA	<i>Dm hid</i> προ-αποπτωτική πρωτεΐνη	Απόπτωση και έλεγχος της ανάπτυξης
miR-14	Άγνωστο	Απόπτωση και μεταβολισμός του λίπους
Θηλαστικά		
miR-181	Άγνωστο	Αιμοποιητική διαφοροποίηση
Φυτά		
miR165/166	<i>At REV</i> και σχετιζόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες	Έναρξη αξονικού μεριστώματος και ανάπτυξη φύλλων
miR172	<i>At AP2</i> και σχετιζόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες	Ανάπτυξη ανθών, χρονισμός μετάβασης ανθοφορίας
miR-JAW	<i>At TCP4</i> και σχετιζόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες	Ανάπτυξη φύλλων, εμβρυονικά μοτίβα
miR159	<i>At MYB33</i> και σχετιζόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες	Ανάπτυξη φύλλων

1.3.8. Ιοί και miRNA

Τουλάχιστον 40 miRNAs έχουν αναγνωρισθεί ότι κωδικοποιούνται από ιούς που προσβάλλουν θηλαστικά.(34) Κατά την εξέλιξή τους οι ιοί επωφελήθηκαν από τα miRNAs ώστε να αυξήσουν την πιθανότητα μιας επιτυχημένης μόλυνσης. Ο ιός Epstein-Barr (EBV), για παράδειγμα, μέσω miRNAs, μειώνει την ανοσολογική απάντηση των κυττάρων που μολύνει.(50) Όλα τα στελέχη του κυτταρομεγαλοϊού έχουν καλά διατηρημένες στο γονιδίωμά τους περιοχές που κωδικοποιούν συγκεκριμένα miRNAs και πιστεύεται ότι τα χρησιμοποιούν για να

Πίνακας 5. Λειτουργίες των miRNAs.

Οι ρυθμιστικοί στόχοι των μεταζώων είχαν προβλεφθεί υπολογιστικά και έπειτα υποστηρίχθηκαν πειραματικά. Οι φυτικοί ρυθμιστικοί στόχοι προβλέφθηκαν υπολογιστικά και έπειτα υποστηρίχθηκαν από ανεξάρτητες φυλογενετικές ή/και πειραματικές ενδείξεις. Συντμήσεις ειδών: *Drosophila melanogaster*, Dm; human, Hs; *Arabidopsis thaliana*, At.

miRNA	Γονίδια στόχοι	Βιολογικός ρόλος του γονιδίου στόχου
Έντομα		
miR-7	<i>Dm HLHm3</i> βασικός μεταγραφικός καταστολέας της HLH	Ερμηνεύει τις αποφάσεις που προάγονται μέσω οπών (Notch-mediated) στη νευρική ανάπτυξη
	<i>Dm hairy</i> βασικός μεταγραφικός καταστολέας της HLH	Ερμηνεύει τις αποφάσεις που προάγονται μέσω οπών στη νευρική ανάπτυξη
	<i>Dm m4</i> οικογένεια Brd πρωτεϊνών	Ερμηνεύει τις αποφάσεις που προάγονται μέσω οπών στη νευρική ανάπτυξη
οικογένεια miR-14	<i>Dm grim</i> ανταγωνιστής αναστολέα κασπάσης (caspase inhibitor)	Προάγει την απόπτωση
	<i>Dm reaper</i> ανταγωνιστής αναστολέα κασπάσης	Προάγει την απόπτωση
	<i>Dm sickle</i> ανταγωνιστής αναστολέα κασπάσης	Προάγει την απόπτωση
Θηλαστικά		
miR-1	<i>Hs</i> νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (<i>BDNF</i>)	Αυξητικός παράγοντας, νευρική ανάπτυξη
	<i>Hs</i> Glucose-6-phosphate dehydrogenase (<i>G6PD</i>)	Αντίσταση στο οξειδωτικό στρες
miR-19a	<i>Hs</i> PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase (<i>PTEN</i>)	Ογκοκατασταλτικό γονίδιο
miR-23a	<i>Hs</i> Stromal cell-derived factor 1 (<i>SDF-1</i>)	Αύξηση και εντοπισμός των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων
	<i>Hs BRN-3b</i> μεταγραφικός παράγοντας POU-domain	Νευρική ανάπτυξη
miR-26a	<i>Hs SMAD-1</i> μεταγραφικός συνδιαμορφωτής (co-modulator)	Ρυθμίζει την έκφραση του εξαρτώμενου γονιδίου του TGF
miR-34	<i>Hs Delta1</i> διαμεμβρανική πρωτεΐνη	Ενεργοποιεί τη Notch κατά τη διάρκεια αποφάσεων για την τύχη των κυττάρων
	<i>Hs Notch1</i> διαμεμβρανικός υποδοχέας για τη Delta	Αποφάσεις για την τύχη των κυττάρων κατά την ανάπτυξη
miR-101	<i>Hs ENX-1</i> polycomb gene	Πολλαπλασιασμός αιμοποιητικών κυττάρων και άλλες ρυθμίσεις γονιδίων
	<i>Hs N-MYC</i> βασικός μεταγραφικός παράγοντας της HLH	Πρωτο-ογκογονίδιο, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμός κυττάρων
miR-130	<i>Hs</i> Macrophage colony stimulating factor-1 (<i>MCSF</i>)	Ρύθμισης της σειράς των μονοπύρηνων μακροφάγων
Φυτά		
miR170/171	<i>At SCL6-III, -IV</i> & σχετιζόμενοι μεταφραστικοί παράγοντες	Σχετίζεται με γονίδια για το ακτινικό μοτίβο της ρίζας
miR156/157	<i>At SPL2</i> & σχετιζόμενοι μεταφραστικοί παράγοντες	Σχετίζεται με γονίδια για την ταυτοποίηση του μεριστέματος των ανθών
miR160	<i>At ARF10, ARF17</i> & σχετιζόμενοι μεταφραστικοί παράγοντες	Σχετίζεται με γονίδια για την απάντηση auxin & την ανάπτυξη
miR167	<i>At ARF8</i> & <i>ARF6</i> μεταφραστικοί παράγοντες	Σχετίζεται με γονίδια για την απάντηση auxin & την ανάπτυξη
miR164	<i>At CUC1, CUC2</i> & σχετιζόμενοι μεταφραστικοί παράγοντες	Σχηματισμός του κορυφαίου μεριστέματος και διαχωρισμός των οργάνων
miR169	<i>At CBF-HAP2</i> DNA-binding proteins	άγνωστο
miR162	<i>At DCL1</i> Dicer-like RNase III	βιογένεση miRNA

ρυθμίζουν τις λειτουργίες των κυτταρικών και των ιικών γονιδίων.(51) Ακόμα και ιοί που σχετίζονται με την ογκογένεση, όπως ο HPV-16 για τον καρκίνο τραχήλου μήτρας ή ο Ερπητοϊός που σχετίζεται με το Σάρκωμα Kaposi, έχουν βρεθεί να κωδικοποιούν ξεχωριστά miRNAs στα μολυσμένα κύτταρα.(52, 53)

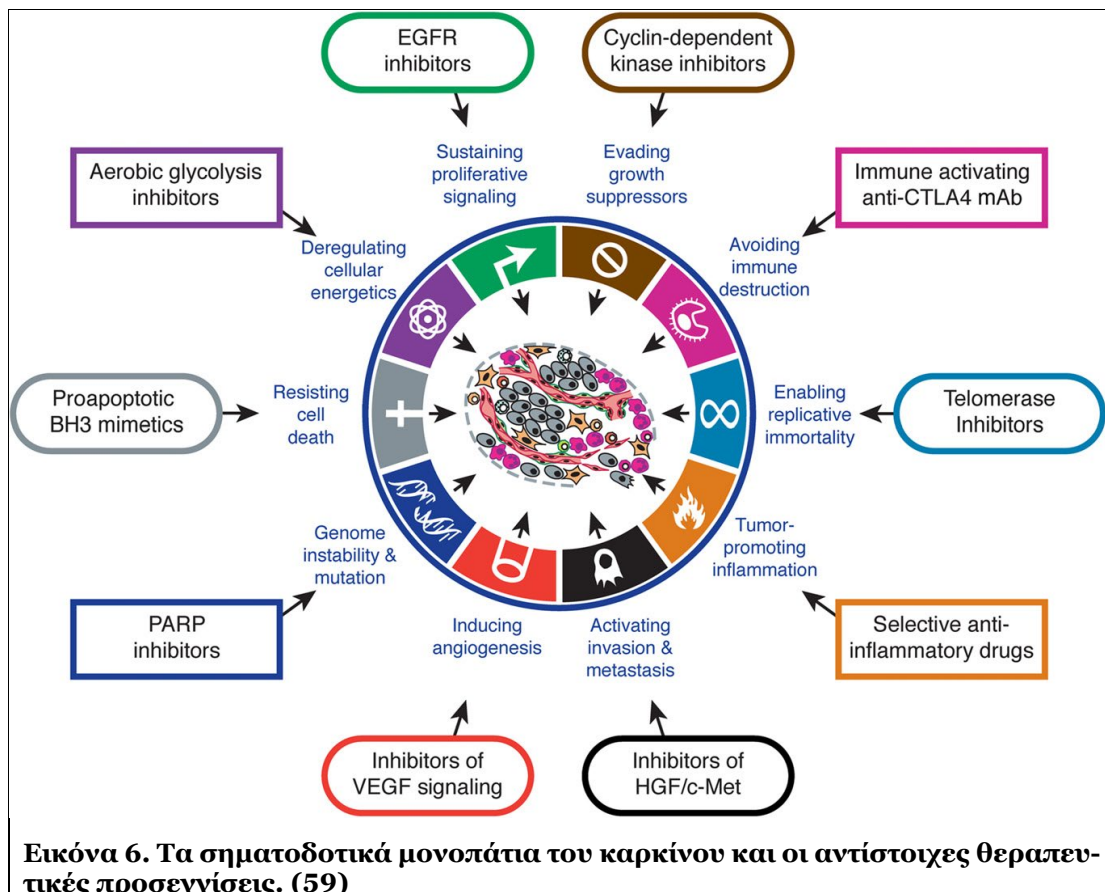
1.3.9. Ο ρόλος των miRNAs στις ανθρώπινες νόσους

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 2300 διαφορετικά miRNAs στα κύτταρα των ανθρώπων, τα οποία ρυθμίζουν πολλές μείζονες κυτταρικές λειτουργίες: την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, τον μεταβολισμό, την απόπτωση, τη μορφογένεση του εγκεφάλου, τη διαφοροποίηση των μυών κλπ.(58) Η απορρύθμιση αρκετών από αυτά (μείωση ή αύξηση των επιπέδων τους) έχει συνδεθεί με μεγάλο αριθμό κλινικά σημαντικών νοσημάτων. Ενδεικτικά αναφέρονται: τα καρδιαγγειακά νοσήματα (καρδιακή υπερτροφία, καρδιακή ανεπάρκεια, αρρυθμίες), φλεγμονώδεις νόσοι (αγγειίτιδες), νευρολογικά νοσήματα (δυσλεξίες, αυτισμός, σύνδρομο διάσπασης προσοχής – υπερκινητικότητας, επιληψία, σύνδρομο εύθραυστου X χρωμοσώματος, σύνδρομο Rett, σύνδρομο Down, νόσος Alzheimer, νόσος Huntington, σχιζοφρένια), αυτοάνοσες νόσοι (ρευματοειδής αρθρίτιδα, συστηματικός ερυθματώδης λύκος), ηπατικά νοσήματα (ιογενής ηπατίτιδες, πολυκυστική νόσος των νεφρών), μυοσκελετικές νόσοι (μυϊκή δυστροφία Duchenne, ορισμένες μυοπάθειες), δερματικά νοσήματα (ψωρίαση).(58) Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 6) αναφέρονται ενδεικτικά μερικά από τα προαναφερθέντα νοσήματα, τα miRNAs που εμπλέκονται και το είδος της απορρύθμισης.

Πίνακας 6. Τα miRNAs στις ανθρώπινες νόσους		
Είδος νόσου	miRNA	Απορρύθμιση (άνω/κάτω)
Καρδιακή υπερτροφία	miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-195, miR-199a, miR-214	↑
Σύνδρομο Down	miR-99a, let-7c, miR-125b-2, miR-155, miR-802	↑
Alzheimer	miR-9, miR-128a, miR-125b	↑
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	miR-155, miR-146	↑
Συστηματικός ερυθματώδης λύκος	miR-189, miR-61, miR-78, miR-21, miR-142-3p, miR 342, miR-299-3p, miR-198, miR-298	↑
	miR-196a, miR-17-5p, miR- 409-3p, miR-141, miR-383, miR- 112, miR-184	↓
Ψωρίαση	miR-203	↑

1.3.10. Ο ρόλος των miRNAs στην καρκινογένεση

Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που πρέπει να διαθέτουν τα κύτταρα για την επιτυχημένη ανάπτυξη μιας νεοπλασίας περιλαμβάνουν δέκα βιολογικές ικανότητες όπως έχουν περιγραφεί από τους Hanahan & Weinberg.(59) Τα γνωρίσματα αυτά αποκτώνται σταδιακά κατά τα πολλαπλά στάδια της ανάπτυξης των ανθρώπινων όγκων και αποτελούν προσπάθεια οργάνωσης και εξορθολογισμού της πολυπλοκότητας ενός καρκίνου. Επιγραμματικά αναφέρονται: i) η διατήρηση της σηματοδότησης του πολλαπλασιασμού, ii) η καταστολή των κατασταλτικών μηχανισμών, iii) η αποφυγή της ανοσοεπιτήρησης, iv) η ανάπτυξη της αθανασίας μέσω αντιγραφής, v) η πρόκληση νεοπλασματικής φλεγμονής, vi) η ενεργοποίηση μηχανισμών διήθησης και μετάστασης, vii) η πρόκληση αγγειογένεσης, viii) η πρόκληση γενομικής αστάθειας και μεταλλάξεων, ix) η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο και x) ο επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού των κυττάρων. Κάθε μία από αυτές τις ιδιότητες των νεοπλασματικών κυττάρων έχει αποτελέσει στόχο συγκεκριμένων θεραπευτικών παραγόντων, εμπλουτίζοντας συνεχώς τη θεραπευτική μας φαρέτρα στον πόλεμο ενάντια στον καρκίνο (Εικόνα 6).

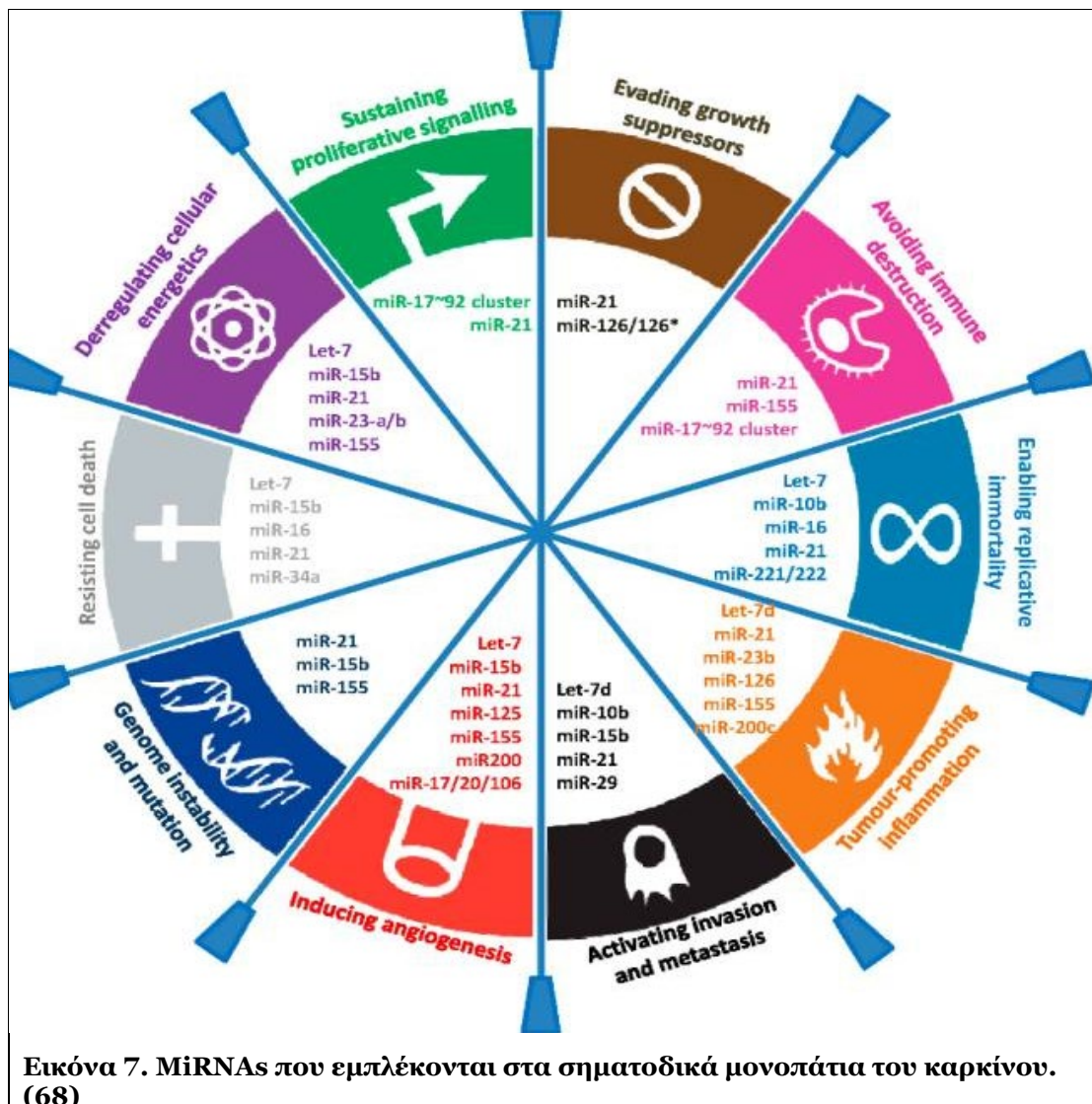


Σημαντικές διαταραχές στη ρύθμιση των miRNAs παρατηρούνται σε όλους τους τύπους νεοπλασιών. Υπάρχουν miRNAs τα οποία υπερεκφράζονται στις περισσότερες νεοπλασίες, όπως τα miR-21, miR-291 και miR-17-5p τα οποία συνήθως αναφέρονται και ως oncomirs ενώ κάποια άλλα λειτουργούν ογκοκατασταλτικά.(60, 61) Υπάρχουν όμως και miRNAs, όπως το miR-106b το οποίο παίζει διπλό ρόλο και άλλοτε συμπεριφέρεται ως oncomir και άλλοτε έχει ογκοκατασταλτική συμπεριφορά.(62) Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) αναφέρονται ενδεικτικά μερικές συνήθεις νεοπλασίες, κάποια από τα miRNAs που εμπλέκονται και το είδος της απορρύθμισης. Η πρώτη αναφορά συσχέτισης διαταραχών των επιπέδων των miRNAs με νεοπλασία έγινε το 2002, για τα miR-15 και miR-16 με τη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία και το 2005 έγινε η πρώτη συσχέτιση συγκεκριμένου miRNA και του στόχου του σε καρκίνο πνεύμονα, του ορθόλογου του *C. elegans* let-7 με το ογκογονίδιο RAS.(63)

Πίνακας 7. Τα miRNAs στις νεοπλασίες		
Νεοπλασία	miRNA	Απορρύθμιση (άνω/κάτω)
Ca παχέος εντέρου	miR-let 7g, miR-21, miR-20a, miR-17- 19 family, miR 31, miR 135, miR-181b, miR 200c	↑
	miR-34, miR-let7, miR 143, miR 145, miR-133b, miR- 126	↓
Οξεία μυελογενής λευχαιμία	Has- miR- 191, 199a, miR 155	↑
Χρόνια μυελογενής λευχαιμία	miR-17-5p, miR-173p, miR- 18a, miR-19a, miR-19b-1, miR- 20a and miR- 92a-1	↑
Χρόνια λεμφογενής λευχαιμία	miR-21, miR 150, miR-155	↑
	miR- 15a, miR16, miR-29, miR143, miR-45, miR-30d, miR- let 7a, miR-181a	↓
Ca οισοφάγου	miR-194, miR- 192, miR-200c	↑
	miR- 203	↓
Ca πνεύμονα	has-mir-21 and has-mir- 205, miR- 17-92	↑
	has-mir-126*, miR-let 7, hsa-let-7a-2, let-7f-1	↓
Ca ουροδόχου κύστης	miR-2 23, miR- 26b, miR- 221, miR- 103-1, miR-185, miR-23 b, miR- 203,miR 17-5p, miR-23, miR- 205	↑
	miR-29c, miR-26a, miR-30c, miR- 30e-5p	↓
Ca μαστού	miR-21, miR-155, miR-23, miR-191	↑
	miR-205, miR- 145, miR-10b, miR-125b	↓
Ca ωοθηκών	miR-200a, miR-200c, miR-141	↑
	miR-199a, miR-140, miR-145, miR125bl	↓
Ca ενδομητρίου	miR-205, miR155 miR 200a, 200b, 200c	↑
	miR-193a, 193b	↓

Τα απορρυθμισμένα miRNAs εμπλέκονται σε όλα τα στάδια και τις διαδικασίες δημιουργίας και εξέλιξης των νεοπλασιών (Εικόνα 7). Εκτός τη λειτουργία τους ως ογκογονίδια μπορούν να εμπλακούν στη ρύθμιση όλων των κυτταρικών

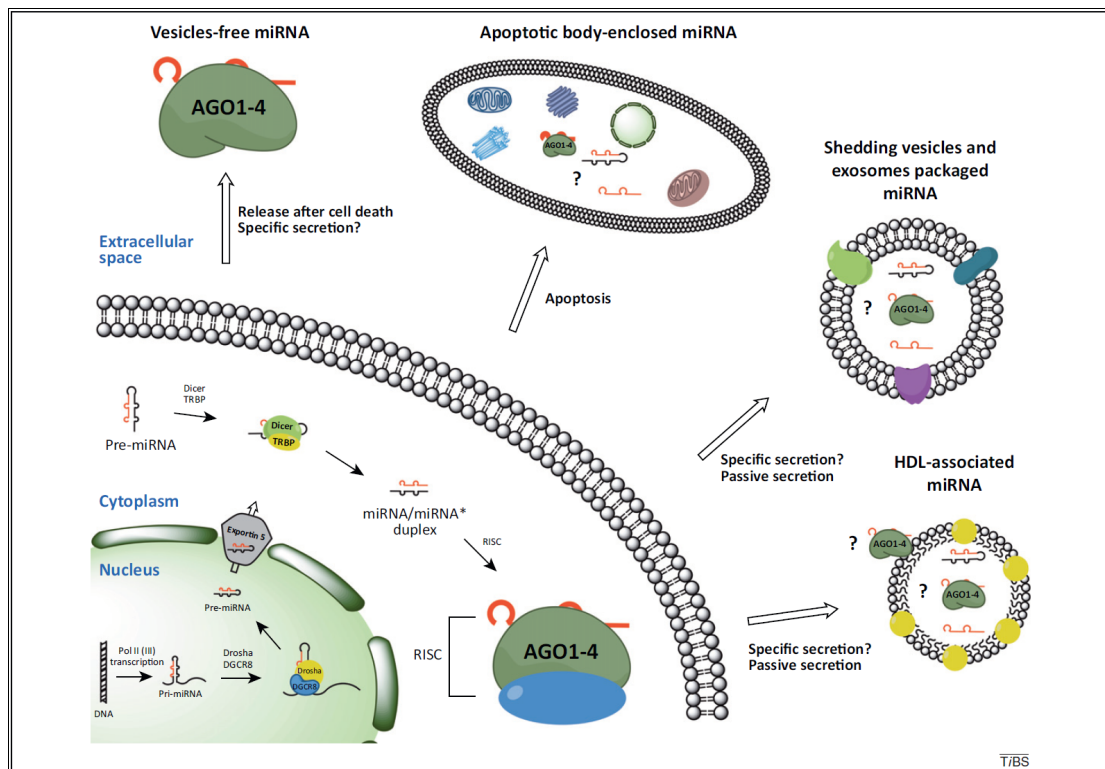
λειτουργιών, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση ή η απόπτωση, όπως θα δούμε παρακάτω. Ορισμένα από αυτά εμπλέκονται στη διαδικασίες της αγγειογένεσης, προάγοντάς την (π.χ. miR-16, miR-21, miR-29) ή καταστέλλοντάς την (π.χ. miR-221, miR-222) και συχνά αναφέρονται και ως angiomiRs.(64) Έχει επίσης αποδειχθεί η χρήση των miRNAs ως αγγειοφόρων μηνυμάτων μεταξύ των κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο τα καρκινικά κύτταρα μπορούν είτε να ανταλλάσσουν μεταξύ τους πληροφορίες, είτε να τροποποιούν τις λειτουργίες των φυσιολογικών κυττάρων, δρώντας κατά κάποιο τρόπο ως ορμόνες, μεταβάλλοντας, για παράδειγμα, τη χημειοευαισθησία των κυττάρων ή την αγγειογένεση.(65-67)



Σε αρκετούς τύπους νεοπλασιών τα miRNAs επιδεικνύουν μοναδικά πρότυπα έκφρασης και προβλέπεται ότι θα έχουν υψηλή αξία στη διάγνωση και τη θεραπεία τους. Όμως, λόγω του ότι το κάθε miRNA μπορεί να έχει ως στόχο πολλά διαφορετικά messenger RNAs ή και μόρια DNA και του ότι οι νεοπλασίες είναι πολυπαραγοντικές νόσοι, κανένα από αυτά δεν επιδεικνύει ειδικότητα σε κάποια συγκεκριμένη νεοπλασία. Έτσι, οι περισσότερες μελέτες που ασχολούνται με την εύρεση διαγνωστικών και προγνωστικών εργαλείων, ομαδοποιούν τα miRNAs για να αυξηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητά τους.

1.3.11. Κυκλοφορούντα miRNAs

Τα miRNAs μπορούν να ανιχνευτούν τόσο στους ιστούς, όσο και σε βιολογικά υγρά (πλάσμα/ορός αίματος, ούρα, σίελος, δάκρυα, αμνιακό υγρό, μητρικό γάλα, βρογχικές εκκρίσεις, περιτοναϊκό και πλευριτικό υγρό, ΕΝΥ κλπ).(69, 70) Τα κυκλοφορούντα miRNAs μπορεί να προέρχονται από τα κύτταρα του αίματος και του ενδοθηλίου των αγγείων, αλλά και από τους ιστούς και τους όγκους. Είναι σχετικά ανθεκτικά στη δράση των RNAσών και οι συγκεντρώσεις τους δεν επηρεάζονται από τις διαδικασίες κατάψυξης και απόψυξης,(71) ούτε από το βρασμό ή τις ακραίες τιμές pH (1-13). Υπάρχουν διάφορες υποθέσεις, οι περισσότερες από τις οποίες έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά, για τους τρόπους με τους οποίους τα miRNAs μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος.(72) Μπορεί να εκκρίνονται άμεσα από τα κύτταρα όπως οι κυτοκίνες και οι ορμόνες, να διασπείρονται ενεργά από τα κύτταρα συσκευασμένα σε μικροσωμάτια και εξωσωμάτια ή να διαχέονται παθητικά από διαλυμένα κύτταρα (π.χ. καταστροφή ιστών, απόπτωση).(73) Το γεγονός ότι επιδεικνύουν τα ίδια πρότυπα απορρύθμισης τόσο στις κυτταροκαλλιέργειες όσο και στους ιστούς και στο πλάσμα/ορό για τις διάφορες νόσους, υποδηλώνει ότι η προέλευσή τους είναι κατά κύριο λόγο από τα ελαττωματικά κύτταρα. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί στο αίμα πειραματοζώων η ύπαρξη κυκλοφορούντων miRNAs, τα οποία φυσιολογικά δεν εκφράζονται στο ζώο αυτό, τα οποία προέρχονται από αλλομοσχεύματα όγκων.(74)



Εικόνα 8. Η βιογένεση των miRNAs και οι τρόποι εξωκυττάριας συσκευασίας
 Τα τρία είδη μεμβρανικών κυστιδίων που περιέχουν εξωκυττάρια miRNA είναι τα αποπτωτικά σωμάτια, τα απορριπτόμενα κυστίδια (shedding vesicles) και τα εξωσωμάτια. Εκτός από αυτά, εξωκυττάρια miRNAs ανεξάρτητα από κυστίδια, κυκλοφορούν με τις πρωτεΐνες AGO, είτε μόνες τους, είτε ενσωματωμένες σε σωμάτια.(73)

1.3.12. Τα miRNAs ως βιοδείκτες

Ένας ιδανικός βιοδείκτης πρέπει να είναι εύκολα προσβάσιμος με μη επεμβατικές μεθόδους, οικονομικός στη μέτρησή του, ειδικός για τη νόσο που μας ενδιαφέρει και αξιόπιστος για την έγκαιρη διάγνωση, πριν ακόμα εκδηλωθεί η νόσος. Οι περισσότεροι σημερινοί βιοδείκτες είναι πρωτεϊνικής φύσεως και το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας για ανάδειξη νέων βιοδεικτών γίνεται στις τάξεις των πρωτεϊνών. Προβλήματα στη διαδικασία αυτή αποτελούν η πολυπλοκότητα στη σύνθεση των πρωτεϊνών, οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν σ' αυτές, οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις τους στα βιολογικά υγρά και, κυρίως, στο πλάσμα και η δυσκολία της ανάπτυξης των κατάλληλων παραγόντων υψηλής συνάφειας για την ανίχνυσή τους. Τα προβλήματα αυτά καθιστούν δύσκολη, χρονοβόρα και ακριβή την ανακάλυψη και ανάπτυξη βιοδεικτών βασισμένων στις πρωτεΐνες. Αντίθετα, η ανίχνευση ειδικών miRNAs είναι αρκετά πιο εύκολη, αν και όχι ιδιαίτερα απλή διαδικασία. Τα miRNAs είναι λιγότερο περίπλοκα, δεν υπόκεινται σε μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις

και μπορούν να ενισχυθούν με PCR ώστε ανιχνευτούν ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

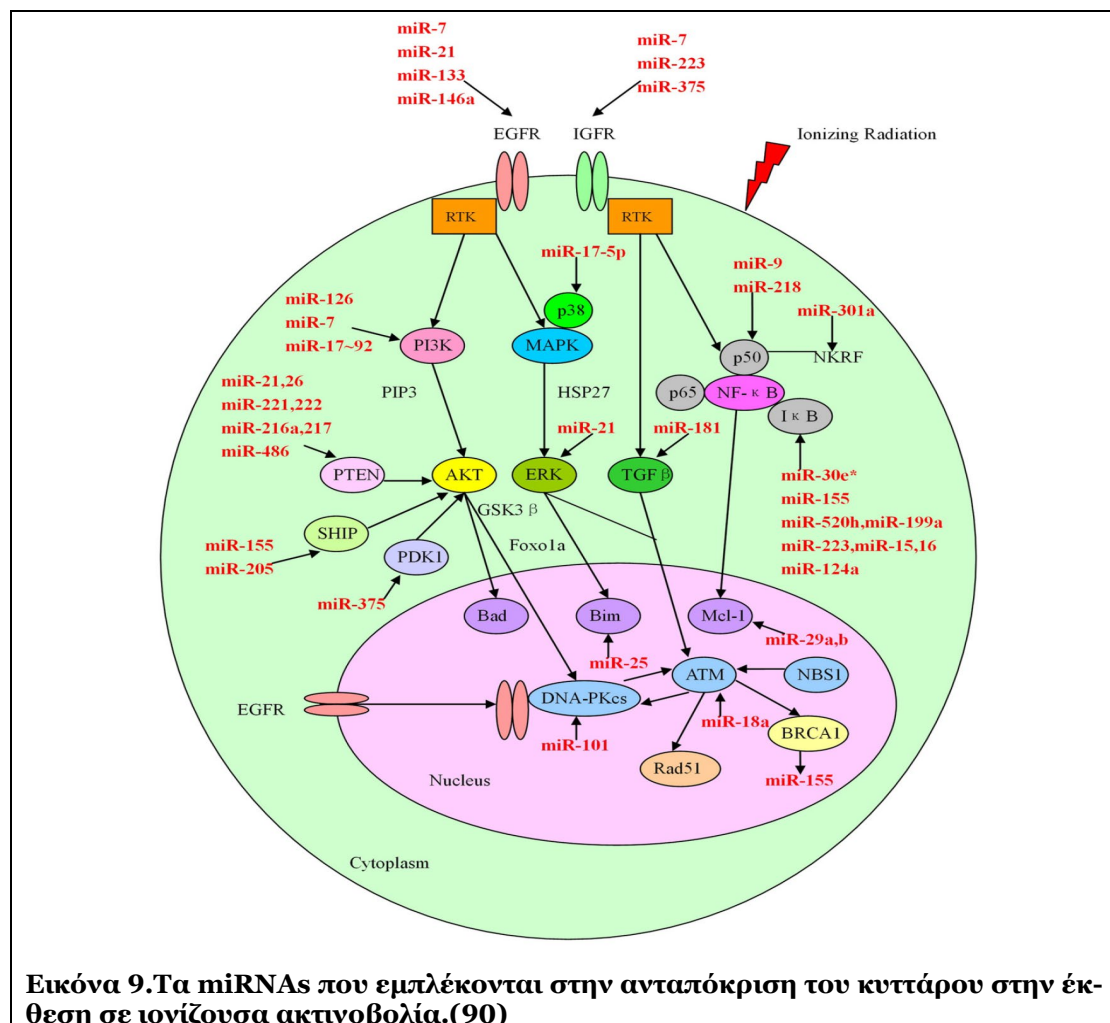
Τα miRNAs αποτελούν ένα δελεαστικό πεδίο για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών. Κάθε miRNA έχει την ικανότητα να επιδρά σε αρκετές κυτταρικές οδούς και επομένως, αλλαγές στην έκφραση αυτών μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση ενός μεγάλου φάσματος κυτταρικών διεργασιών. Επιπλέον τα miRNAs είναι σχετικά ανθεκτικά στη δράση των RNAσών λόγω του μικρού μήκους τους και έτσι έχουν μακρύτερο χρόνο ζωής στον ορό και τα δείγματα ιστών. Επίσης, τα επίπεδα έκφρασής τους είναι σταθερά και επαναλήψιμα στον ορό υγιών ενηλίκων.(75) Τα τελευταία χρόνια τα miRNAs έχουν προταθεί ως πολλά υποσχόμενοι διαγνωστικοί, προβλεπτικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες για τον καρκίνο(76) και έχουν αναγνωρισθεί ως σημαντική συνιστώσα της υγρής βιοψίας.

1.4. MicroRNAs και ακτινοθεραπεία

Αν και η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται ως αντινεοπλασματική θεραπεία πάνω από έναν αιώνα, η συνολική γονιδιακή ανταπόκριση των ακτινοβολούμενων ιστών παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Αυτό οφείλεται κυρίως στην πολυπλοκότητα της αντίδρασης στην ακτινοβολία, αφού έχει δειχθεί ότι συμβαίνουν σημαντικές αλλαγές σε τουλάχιστον 855 γονίδια, μέσα σε τέσσερις ώρες από την ακτινοβολία.(77) Παρομοίως, έχει δειχθεί η επίδραση της ακτινοβολίας στην ταχεία μεταβολή της έκφρασης σε miRNAs.(78, 79)

Η αναζήτηση τρόπων να αυξηθεί η ευαισθησία των κυττάρων ή να παρακαμφθεί η αντοχή τους αποτελεί μείζον θέμα στην ακτινοθεραπεία. Τα miRNAs, με τη δυνατότητα να ελέγχουν ταχέως πολλαπλά γονίδια, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία τάξη σημαντικών ρυθμιστών και τροποποιητών της αντίδρασης στην ακτινοβολία. Έχουν αναφερθεί τέσσερις κλασικές οδοί μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανταπόκρισης στην ακτινοβολία: PI3K/AKT, MAPK/ERK, NF-κB, TGF-β.(80-82) Οι τρεις πρώτες σχετίζονται στενά με την ένωση μη ομόλογων άκρων (non-homologous end joining - NHEJ) στη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA και η τέταρτη είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση του γονιδίου ATM που εμπλέκεται και στον μη

ομόλογο αλλά και τον ομόλογο ανασυνδυασμό ως ανταπόκριση στη βλάβη του DNA.(83, 84) Όλες αυτές οι οδοί θα επηρεάσουν τελικά την έκφραση κρίσιμων γονιδίων που θα πάρουν μέρος στη διαδικασία ανταπόκρισης στη βλάβη του DNA, τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση (ATM, DNA-PK, NBS1, RAD51, BRCA1, Chk1, Chk2, CDK2, CDC25, BAD, BIM, MCL1 κ.ο.κ.).(85-87) Αξίζει, βέβαια, να σημειωθεί παρενθετικά ότι και η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα των ανδρογόνων ενισχύει την οδό NHEJ(88) και την υπερέκφραση της ATM(89) και θα μπορούσε να προκαλέσει την ανάπτυξη ακτινοαντοχής. Τα miRNAs με το ρυθμιστικό τους ρόλο στην έκφραση των γονιδίων, θα μπορούσαν να τροποποιήσουν την ανταπόκριση των κυττάρων στην ακτινοβολία σε πολλαπλά επίπεδα: την ανίχνευση της βλάβης, τη μεταγωγή του σήματος και την αντίδραση του κυττάρου. Παρακάτω θα αναλύσουμε κάποιους από τις υποδοχείς και τις οδούς μεταγωγής του σήματος ως συνέπεια απόκρισης στην ακτινοβολία καθώς και τα miRNAs που εμπλέκονται στις διαδικασίες αυτές και απεικονίζονται στην Εικόνα 9.



1.4.1. Epidermal growth factor receptor (EGFR)

Υπάρχουν αποδείξεις ότι η υπερέκφραση ή μεταλλάξεις στον EGFR σχετίζονται με την ανάπτυξη ακτινοάντοχων και χημειοάντοχων κυττάρων. Εκφράζεται συχνά σε επιθηλιακούς όγκους και είναι καθοριστικός παράγοντας απόκρισης του όγκου στην ακτινοβολία(91) και στην ανάπτυξη ακτινοαντοχής(92), εμπλεκόμενος άμεσα ή έμμεσα σε πολλαπλές διαδικασίες επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA.(93-96) Μια σειρά από miRNAs φαίνεται ότι σχετίζονται με αυτόν, όπως τα miR-7 (μείωση έκφρασης),(97) miR-133 (μείωση έκφρασης),(98) miR-146a (αναστολή έκφρασης MMP2 που ενεργοποιείται από τον EGFR)(99) και miR-21 (ενεργοποίηση της οδού του EGFR)(100) και θα μπορούσαν να αποτελούν στόχους για την αύξηση της ακτινοευαισθησίας των κυττάρων.

1.4.2. Insulin-like growth factor receptor type 1

Το σύστημα σηματοδότησης του IGF θεωρείται ότι έχει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση πολλών νεοπλασιών. Ο IGF-1R, πέρα από την άμεση επίδραση στην ανάπτυξη των όγκων, τροποποιεί την επιδιόρθωση των βλαβών διπλής αλύσου του DNA επεμβαίνοντας στη διαδικασία του ομόλογου ανασυνδυασμού.(101) Αναστολή της δράσης του με διάφορους τρόπους (μονοκλωνικά αντισώματα, ολιγονουκλεοτίδια, πεπτίδια κλπ) έχει δείξει ότι αυξάνεται η ανταπόκριση και η ακτινοευαισθησία των όγκων.(102, 103) Ο IGFR αποτελεί στόχο των miR-7 (υπορρύθμιση έκφρασης)(104, 105), miR-223 (στοχεύει υπομονάδες του IGFR)(106) και miR-375 (αρνητική συσχέτιση έκφρασης IGFR και miR-375).(107)

1.4.3. Οδός PI3K/ATK

Η οδός αυτή έχει συνδεθεί με την ενδογενή ακτινοευαισθησία των κυττάρων, την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους και την υποξία, που και οι τρεις αποτελούν παράγοντες αποτυχίας της ακτινοθεραπείας.(108) Αναστολή αυτής της οδού (π.χ. με ραπαμυκίνη) οδηγεί σε διατήρηση των βλαβών που προκάλεσε η ακτινοβολία στο DNA και καθυστέρηση του κυττάρου στη G2 φάση του κύκλου.(109) Τα miR-7,(110) miR-126(111) και αυτά της συστοιχίας miR-17-92(112) στοχεύουν αρκετά μόρια αυτής της οδού δρώντας ογκοκατασταλτικά

(π.χ.PIK3CD, mTOR, PHLPP2 και p70S6K). Τα miR-221, miR-222 και miR-486 στοχεύουν απευθείας την PTEN.(113, 114)

1.4.4. Οδός MAPK/ERK

Η οδός αυτή είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε πληθώρα κυτταρικών γεγονότων, όπως η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η γήρανση και η διαφοροποίηση.(115) Μέσω αυτής της οδού μπορεί η ακτινοβολία να ενεργοποιήσει τους υποδοχείς για τον κυτταρικό θάνατο και σήματα βλάβης του DNA.(116) Τα miR-7-3, miR-34a, miR-181d, miR-21, miR-17-5p και miR-193b σχετίζονται στενά με τη δραστηριότητα της MAPK.(117-119)

1.4.5. Οδός NF-κB

Η οδός αυτή είναι συχνά ενεργοποιημένη σε νεοπλασματικά κύτταρα και συνεισφέρει στην επιθετική ανάπτυξη των όγκων, την απόπτωση και την αντίσταση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία.(120) Αναστολή αυτής της οδού αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία και σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, αυξάνοντας την απόπτωση.(121) Τα miR-30e*(122) και miR-31(123) δρουν κατασταλτικά σ' αυτή την οδό και η παύση τους οδηγεί σε πιο επιθετικούς φαινότυπους όγκων. Το miR-301a αναστέλλει τον NKRF, κατασταλτικό παράγοντα του NF-κB, οδηγώντας σε περισσότερο ακτινοάντοχους όγκους.(124) Άλλοι ερευνητές έχουν βρει ότι υπερέκφραση των miR-9 και let-7g μειώνουν τα επίπεδα του NF-κB1 σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα, με συνέπεια την αύξηση της ακτινοευαισθησίας τους. (125)

1.4.6. Οδός TGF-β

Ο TGF-β είναι ένας επιπλέον παράγοντας με σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την κινητικότητα, την αγγειογένεση, τη διήθηση, την EMT, την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας και την ανοσολογική απόκριση.(126) Ο παράγοντας αυτός επιδεικνύει παράδοξη συμπεριφορά, άλλοτε καταστέλλοντας και άλλοτε προωθώντας τους όγκους.(127) Εκτός των άλλων, παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από τις βλάβες της ακτινοβολίας, οδηγώντας σε μειωμένη κατάτμηση του DNA και μειωμένη απόπτωση.(128) Τα miR-520c,(129) miR-21(130) και miR-181(131) φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση αυτού του παράγοντα.

1.4.7. Γονίδια απόκρισης στη βλάβη του DNA και ρύθμισης κυτταρικού κύκλου

Οι οδοί που περιγράφηκαν παραπάνω αφορούν την ανίχνευση και μετάδοση του σήματος της βλάβης από την ακτινοβολία. Από εδώ και κάτω, αναλαμβάνουν δράση τα γονίδια ανταπόκρισης στη βλάβη του DNA (ATM, DNA-PK, BRCA1, NBS1, RAD51 κ.ο.κ.)(132-134) και τα γονίδια ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης (Chk1, Chk2, CDK2, CDC25, Cyclin E, BAD, BIM, MCL1 κ.ο.κ.)(135, 136). Πλήθος από miRNAs εμπλέκονται στη ρύθμιση αυτών των γονιδίων (π.χ. miR-18a, miR-101, miR-155, miR-25, miR-29b, miR-29a, miR-193b)(137-143), το καθένα με το δικό του τρόπο, όπως αποτυπώνεται στην Εικόνα 9.

1.4.8. Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και miRNAs

Υπάρχει πληθώρα *in vitro* και *in vivo* μελετών που αποδεικνύουν τη μεταβολή των επιπέδων κάποιων από τα miRNAs μετά από ακτινοβολία, καθιστώντας τα δυνητικούς υποψήφιους βιοδείκτες ή και θεραπευτικούς στόχους. Οι Weidhaas και συν.(77) ακτινοβόλησαν καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων πνεύμονα και έδειξαν ότι, μετά την ακτινοβολία, άλλαξαν σημαντικά τα επίπεδα 87 miRNAs. Για τα περισσότερα από αυτά, η μεταβολή αυτή έγινε μέσα σε δύο ώρες από την ακτινοβολία και επανήλθαν στις πρότερες τιμές μέσα σε 24 ώρες. Υπήρχαν επίσης διαφορές συγκρίνοντας αυτές τις μεταβολές με αντίστοιχες από ακτινοβολία φυσιολογικών κυττάρων του πνεύμονα.

Οι Yan και συν.(138) έδειξαν *in vitro* και *in vivo* σε πειραματόζωα ότι μπορούσαν να αυξήσουν την ακτινοευσθησία όγκων με την υπερρύθμιση του miR-101, το οποίο στοχεύει την DNA-PKcs, έναν σημαντικό παράγοντα για την επιδιόρθωση της διάσπασης διπλής αλυσού του DNA με μη-ομόλογο ένωση.

Οι Leung και συν.(144) ακτινοβόλησαν καρκινικά κύτταρα προστάτη και μελέτησαν τις μεταβολές στην έκφραση των miRNAs. Έξι από αυτά είχαν αυξημένη έκφραση και 16 είχαν μειωμένη. Σύμφωνα με τους ερευνητές, αυτά θα μπορούσαν να ελεγχθούν περαιτέρω για τη συμβολή τους στην ακτινοευσθησία των κυττάρων και ως πιθανοί βιοδείκτες για την ακτινοθεραπεία.

Οι Li και συν.(145) ακτινοβόλησαν καρκινικά κύτταρα προστάτη και βρήκαν μείωση έκφρασης σε αυτά των miR-106b και miR-199a και αύξηση της

έκφρασης των miR-29b, miR-191, miR-22, miR-200c, miR-141, miR-24, miR-30a5p και miR-9-1. Προχώρησαν στη χορήγηση στα κύτταρα προδρόμου miR-106b και βρήκαν ότι τα κύτταρα μπορούσαν να παρακάμψουν την ακινητοποίηση από την G2 στην M φάση του κυτταρικού κύκλου. Είναι γνωστό ότι το miR-106b στοχεύει το mRNA της p-21 πρωτεΐνης που ακινητοποιεί τα κύτταρα στα σημεία ελέγχου μετά από ακτινοθεραπεία για την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Έτσι, αυξημένα επίπεδα miR-106b προσδίδουν στα κύτταρα αυξημένη ακτινοευαισθησία και θα μπορούσε το miRNA αυτό να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο σε ακτινοάντοχα κύτταρα.

Οι Josson και συν.(146) ακτινοβόλησαν καρκινικά κύτταρα προστάτη (σειρές LNCaP και C4-2) και βρήκαν μια πληθώρα miRNAs να υπέρ- ή υποεκφράζονται μετά από ακτινοβόληση. Ξεχώρισαν το miR-521 το οποίο στοχεύει το mRNA της πρωτεΐνης CSA, η οποία εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA. Το miR-521 όταν υποεκφραζόταν στα κύτταρα, οδηγούσε σε αύξηση των επιπέδων της CSA και αύξηση της ακτινοαντοχής τους.

Το miR-148b αύξησε την ακτινοευαισθησία μέσω προαγωγής της απόπτωσης τόσο σε κύτταρα non-Hodgkin Λεμφώματος(147) όσο και σε κύτταρα Β-λεμφώματος.(148)

1.4.9. MiRNAs και ακτινοθεραπεία στον άνθρωπο

Τα miRNAs δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς όσον αφορά τη μεταβολή τους σε σχέση με την ακτινοθεραπεία. Τα περισσότερα δεδομένα αφορούν ακτινοβόληση καρκινικών κυττάρων *in vitro*. Δεν υπάρχει μέχρι σήμερα μεγάλος όγκος δεδομένων για την εκτίμηση της μεταβολής της συγκέντρωσης των miRNAs σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία και τη χρησιμότητά τους ως προβλεπτικοί ή προγνωστικοί παράγοντες.

Οι Tempelin και συν.(79) μέτρησαν τις αλλαγές που συμβαίνουν στην έκφραση των miRNAs σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, οι οποίοι ήταν υποψήφιοι για μεταμόσχευση μυελού και υποβλήθηκαν σε ολοσωματική ακτινοθεραπεία. Αναγνώρισαν 45 miRNAs με διαφορετική έκφραση μετά την ακτινοθεραπεία. Και για τα 45 βρέθηκε υπερέκφραση. Από αυτά, 27 έδειξαν στατιστικά σημαντική υπερέκφραση μετά την ακτινοθεραπεία σε όλους τους ασθενείς. Οι πιθανοί στόχοι αυτών των miRNAs είναι γονίδια που αφορούν την

αιμοποίηση, την ανοσολογική απόκριση, τη μεταγωγή του σήματος, την ανταπόκριση στο stress, τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση.

Οι Wang και συν.(149) μελέτησαν ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο οισοφάγου. Βρήκαν ότι η αυξημένη έκφραση στον καρκινικό ιστό του miR-22 σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε προεγχειρητική ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση, υποδηλώνοντας μειωμένη επιδιόρθωση των διασπάσεων διπλής αλύσου του DNA και άρα αυξημένη ακτινοευαισθησία.

Οι Li και συν.(150) βρήκαν σε ασθενείς πάσχοντες από ορθοκολικό καρκίνο και καρκίνο κεφαλής-τραχήλου ότι υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των miR-374-5p, miR-342-5p και miR-519d-3p στο πλάσμα που ελήφθη πριν από την ακτινοθεραπεία ανάμεσα σ' αυτούς που παρουσίασαν καλή ή κακή ανταπόκριση. Επίσης παρατήρησαν αύξηση του miR-494-3p μετά την ακτινοθεραπεία, καθώς και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης αυτού στους ασθενείς με καλή ανταπόκριση. Τέλος, συσχέτισαν τη χαμηλότερη έκφραση των miR-342-5p και miR-519d-3p με σημαντικά χαμηλότερη 5ετή επιβίωση.

Ο Liu και συν.,(151) μελέτησαν λαπαροσκοπικά δείγματα από ασθενείς πάσχοντες από καρκίνο στομάχου και οι οποίοι στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε χημειο-ακτινοθεραπεία. Βρήκαν ότι οι ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης για τα miR-142-3p, miR-142-5p, miR-338-3p, miR-340-5p και miR-582-5p, ενώ είχαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-16-2-3p.

Σε άλλη μελέτη σε ασθενείς του έπασχαν από καρκίνο του πνεύμονα με εγκεφαλικές μεταστάσεις,(152) βρήκαν ότι το miR-let-7a παρουσίαζε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στον ορό των ασθενών που είχαν χειρότερη πρόγνωση και χειρότερη ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία εγκεφάλου.

Οι Bahtiyar και συν.(153) δεν βρήκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των miR-223 και miR-126 στην αρχή και το πέρας της ακτινοθεραπείας στο πλάσμα ασθενών που έπασχαν από καρκίνο του προστάτη, μελετώντας την επίδραση της ακτινοβολίας στον αριθμό και τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων.

Οι Zedan και συν. (154) βρήκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης για το miR-93 και το miR-221 σε ασθενείς με καρκίνο προστάτη που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία ή προστατεκτομή, σε σχέση με την ομάδα παρακολούθησης. Η μείωση του miR-93 ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα των ασθενών που έλαβε ακτινοθεραπεία σε σχέση με την ομάδα που υποβλήθηκε σε προστατεκτομή, ενώ το αντίθετο ισχύει για το miR-221, του οποίου η μείωση ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα του χειρουργείου.

Τέλος, πλήρες αίμα από υγιείς εθελοντές ακτινοβολήθηκε και βρέθηκαν μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης 58 διαφορετικών εξωσωμιακών miRNAs ως ανταπόκριση στην ακτινοβολήση.(155)

1.5. Τα microRNAs στον καρκίνο του προστάτη

1.5.1. Λειτουργικός ρόλος της απορρύθμισης των miRNA στον καρκίνο του προστάτη

Τα κυτταρικά χαρακτηριστικά που απαιτούνται για την έναρξη και την πρόοδο του καρκίνου έχουν περιγραφεί και αφορούν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών οδών που περιλαμβάνουν και αυτές που έχουν να κάνουν με τον πολλαπλασιασμό και την αναστολή του θανάτου των κυττάρων, την προαγωγή της αγγειογένεσης και τη μετάσταση.(59) Δοθέντος του πλήθους των miRNAs, είναι σίγουρο ότι κάποια θα εμπλέκονται στις διεργασίες αυτές και είναι πιθανό αυτά τα miRNAs να αλλάζουν κατά τη διάρκεια της προόδου της νόσου, αφού οι απαιτήσεις των κυττάρων αλλάζουν. Έτσι, αν κατανοήσουμε το ρόλο τους στα διαφορετικά στάδια εξέλιξης του καρκίνου του προστάτη, όπως επίσης και τις αλλαγές της έκφρασής τους κατά τη διάρκεια αυτών των σταδίων, μπορούμε να τα χρησιμοποιήσουμε ως προγνωστικούς παράγοντες (biomarkers) και να αποτελέσουν ακόμα και δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους. Ειδικά για τον καρκίνο του προστάτη, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα miRNAs που συμμετέχουν στην οδό σηματοδότησης των ανδρογόνων αλλά και άλλες καίριες οδούς σηματοδότησης, όπως η PTEN/AKT.

1.5.2. Απόπτωση και miRNAs

Υπάρχουν μερικά miRNAs που αλληλεπιδρούν με την αποπτωτική οδό στα κύτταρα του προστάτη και η απορρύθμισή τους μπορεί να προάγει την αποφυγή της απόπτωσης μέσω κάποιων μηχανισμών, μεταξύ των οποίων κυριότερος η ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και των γονιδίων του μεταγραφικού παράγοντα E2F1-3.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 προάγει την απόπτωση με την υπερρύθμιση (upregulation) των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Noxa και Puma.(59) Το miR-125b στοχεύει την εξαρτώμενη από το p53 απόπτωση με την παρεμβολή του στο p53 και στα γονίδια στόχους του, p21 και Puma. Το miR-125b μπορεί επίσης να διεγείρει την απόπτωση που είναι ανεξάρτητη από το p-53 σε κύτταρα που έχουν ανεπάρκεια του p-53 μέσω παραγωγής πρωτεΐνης p14(ARF).(156) Αυτό προτείνει ένα δυνητικό ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου του προστάτη και πράγματι, εξαναγκασμένη έκφραση του miR-125b έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, τόσο σε άθικτα όσο και σε ευνοχισμένα ποντίκια.(157) Η συστάδα miR-15-16 επηρεάζει την επιβίωση των κυττάρων, αναστέλλοντας την μετάφραση την ογκοπρωτεΐνης Bcl2. Η Bcl2 ασκεί αντιαποπτωτική δράση, αναστέλλοντας τις Noxa και Puma. Η υπορρύθμιση αυτών των miRNAs έχει αποδειχθεί στο 80% των καρκίνων του προστάτη και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας της Bcl2, ευνοώντας την επιβίωση των κυττάρων.(158) Απώλεια των miR-15-16 έχει επιπρόσθετες επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με την υπερρύθμιση της cyclin D1, η οποία διευκολύνει τη μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Η απώλεια αυτής της συστάδας των miRNAs μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την προκαρκινική οδό Wnt.(157) Η σημασία των miR-15-16 στην ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη έχει περαιτέρω τονιστεί από την παρατήρηση ότι αποκατάσταση αυτών των miRNAs μπορεί να οδηγήσει στην υποστροφή αλλομοσχευμάτων καρκίνου του προστάτη σε ποντίκια.

Οι παράγοντες μετάφρασης E2F1-3 παίζουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης.(159) Έχει δειχθεί ότι οι E2F1-3 συνδέονται σε θέσεις προαγωγών για τη συστάδα miR-17-92 και, ακολούθως, υπερρυθμίζουν τη μετάφραση αυτής της ομάδας των miRNAs. Η συστάδα αυτή

εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13 και περιέχει έξι miRNAs, τα οποία προκύπτουν από ένα κοινό μεταγράφημα από τη Drosha: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 και miR-92a-1.(160) Αυτά με τη σειρά τους, ειδικά το miR-20a, υπορρυθμίζουν την έκφραση της ομάδας των E2F1-3. Ως εκ τούτου, παράγουν μία αρνητική ανατροφοδότηση η οποία συντηρεί τα επίπεδα έκφρασης της E2F1-3 σε ένα σχετικά σταθερό επίπεδο. Όμως, στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη η έκφραση των miR-17-92 μπορεί να υπερρυθμιστεί, έχοντας ως αποτέλεσμα την καταστολή των E2F1-3 που συνεπάγεται την αποφυγή της απόπτωσης.(161) Τα επίπεδα έκφρασης του miR-20a προοδευτικά αυξάνονται στους ιστούς του προστάτη από την καλοήθεια, στις χαμηλού βαθμού κακοήθειες και στις υψηλού βαθμού κακοήθειες αντίστοιχα, προτείνοντας ένα πιθανό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου.(162) Άλλα miRNAs έχει, επίσης, δειχθεί ότι υπορρυθμίζουν την έκφραση των E2F1-3, συμπεριλαμβανομένων των miR-25 (163) και miR-205.(164)

Η έκφραση των miRNA έχει επίσης δειχθεί ότι ελέγχει άλλα προ-αποπτωτικά γονίδια. Ο παράγοντας FAF1, ένα συστατικό του συμπλέγματος που σηματοδοτεί την πρόκληση θανάτου, συχνά υπορρυθμίζεται ή χάνεται σε έναν αριθμό από ανθρώπινους όγκους.(165) Ο FAF1 έχει φανεί ότι υπορρυθμίζεται από το miR-24, με αποτέλεσμα τη μείωση της απόπτωσης στα ορμονοάντοχα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 in vitro.(166) Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη TNFSF10 αντιθέτως υπερρυθμίζεται από το miR-145.(167) Η TNFSF10 (επίσης γνωστή ως TNF-related apoptosis inducing ligand ή TRAIL) είναι μέλος της υπερικογένειας των παραγόντων νέκρωσης όγκου (TNF) και συμβάλλει στην έμφυτη ανοσοεπιτήρηση εναντίον των όγκων.(168)

Το miR-21 είναι ίσως το μοναδικό miRNA το οποίο έχει δειχθεί ότι υπερεκφράζεται σε όλους τους τύπους των ανθρώπινων νεοπλασιών. Στοχεύει γονίδια τα οποία εμπλέκονται και στις 10 διαδικασίες/ιδιότητες που πρέπει να έχει ένα επιτυχημένο καρκινικό κύτταρο (Εικόνα 20).(169) Η κυριότερη ογκολογική του λειτουργία θεωρείται η αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης. Έχει δειχθεί ότι στοχεύει στην πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 4 (PDCD4)(170) και στο ομόλογο της φωσφατάσης και τενσίνης (phosphatase and tensin homologue) (PTEN)(171) που και οι δύο διεγείρουν την απόπτωση

μέσω της οδού του p53, με αποτέλεσμα την αναστολή της πυροδότησης της απόπτωσης.

1.5.3. Τα miRNAs και η κυτταρική διήθηση και μετανάστευση

Η καρκινογένεση απαιτεί από τα κύτταρα, πέρα από τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, να αναπτύξουν την ικανότητα διήθησης της βασικής μεμβράνης και να μεθίστανται σε απομακρυσμένες περιοχές. Για να το επιτύχουν αυτό, τα κύτταρα πρέπει να αποκολληθούν, να καταστούν ευκίνητα και να αποφύγουν τον τύπο της απόπτωσης που συμβαίνει όταν ένα κύτταρο αποκολλάται από το υπόστρωμά του.(172) Η πρωτεΐνη Γκρανουλίνη (Granulin) έχει δειχθεί ότι διευκολύνει την κυτταρική κινητικότητα και την αποφυγή αυτού του είδους της απόπτωσης σε ορισμένους τύπους όγκων όπως επίσης ότι έχει άλλες προκαρκινικές επιδράσεις (π.χ. ενίσχυση της διαίρεσης των επιθηλιακών κυττάρων).(157) Στα κύτταρα του προστάτη, η Γκρανουλίνη έχει δειχθεί ότι διευκολύνει τη μετανάστευση και την ανάπτυξη που είναι ανεξάρτητη από την αγκυροβόληση (anchorage-independent growth), τόσο σε ορμονοεξαρτώμενες όσο και σε ορμονοανεξάρτητες κυτταρικές σειρές, αν και η επίδραση είναι περισσότερο φανερή στα κύτταρα που δεν εξαρτώνται από τα ανδρογόνα.(173) Η έκφραση της Γκρανουλίνης ρυθμίζεται από μέλη της ομάδας miR-15 - miR-107. Ιδίως το miR-107 έχει δειχθεί ότι υπορρυθμίζει την έκφραση της Γκρανουλίνης σε καρκινικά κύτταρα προστάτη *in vitro*.(174)

Η υπορρύθμιση του miR-145 έχει επίσης προταθεί ότι οδηγεί σε ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και διήθησης στον καρκίνο του προστάτη. Ο Fuse και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η δυναμική των καρκινικών κυττάρων προστάτη PC3 and DU145 να πολλαπλασιάζονται, να μεταναστεύουν και να διηθούν επηρεάστηκε από την επιμόλυνση με miR-145.(175)

Το miR-143 είναι υπορρυθμισμένο στον καρκίνο του προστάτη και έχει δειχθεί *in vitro* ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, καταστέλλοντας την έκφραση του ομολόγου του ιικού ογκογονιδίου V-Ki-ras2 Kirsten του σαρκώματος αρουραίων (KRAS), και, ως εκ τούτου, αναστέλλοντας την οδό EGFR/RAS/ MAPK.(157) Αυτό επίσης είχε ως αποτέλεσμα της αύξηση της ευαισθησίας των κυττάρων στην

δοσεταξέλη. Το miR-133(98) και το miR-146a(157) έχουν επίσης δειχθεί ότι στοχεύουν τον EGFR και ότι έχουν παρόμοιες αντι-πολλαπλασιαστικές και αντι-μεταναστευτικές επιδράσεις σε κυτταρικές σειρές ορμονοάντοχων καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη *in vitro*.

Η επιθηλιακή-μεσεγγυματική μετάβαση (Epithelial-mesenchymal transition - EMT) είναι ένα εξελικτικό πρόγραμμα, κατά το οποίο σε ένα επιθηλιακό κύτταρο συμβαίνει ένας αριθμός μεταβολών που του επιτρέπουν να αποκτήσει μεσεγγυματικό φαινότυπο. Αυτές περιλαμβάνουν την απώλεια της φυσιολογικής πολικότητας και προσκόλλησης, αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης και διήθησης, αντίσταση στην απόπτωση και αυξημένη παραγωγή εξωκυττάριου υλικού.(176) Η EMT έχει φυσιολογικό ρόλο στην εμβρυονική ανάπτυξη και την επούλωση τραυμάτων αλλά επίσης εμπλέκεται και ως μία κύρια οδός κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ιδιότητες διήθησης και μετάστασης.(59) Το miR-205 είναι υπορρυθμισμένο στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη και αυτό σχετίζεται με τη διέγερση της EMT. Καρκινικά κύτταρα προστάτη τα οποία έχουν επιμολυνθεί με miR-205 επιδεικνύουν αυξημένη έκφραση μορίων επιθηλιακής συγκόλλησης, όπως η E-cadherin, και επιδεικνύουν άλλα χαρακτηριστικά περισσότερο επιθηλιακού φαινότυπου, προτείνοντας ότι η υπορρύθμιση του miR-205 μπορεί να είναι εν μέρει υπεύθυνη για τη διέγερση της EMT.(164)

Τα miR-143 και miR-145 έχουν αναγνωρισθεί ως δυνητικοί ρυθμιστές της EMT. Και τα δύο είναι υπορρυθμισμένα στις οστικές μεταστάσεις που προέρχονται από καρκίνο του προστάτη και η επιμόλυνση σε κύτταρα PC3 οδηγεί σε περισσότερο επιθηλιακό φαινότυπο *in vitro*, με αυξημένη E-cadherin και μειωμένη έκφραση Φιμπρονεκτίνης (fibronectin).(177) Η ίδια ομάδα επέδειξε ότι κύτταρα που υπερεκφράζουν τα miR-143 και miR-145 είχαν μειωμένη τάση για προσβολή οστών. Σε μία ομάδα 22 ασθενών, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των miR-143 και miR-145 συσχετίστηκαν με υψηλότερη τιμή Gleason, PSA και οστικών μεταστάσεων.

Η υπερέκφραση του miR-141 συμβαίνει σε διάφορους τύπους ανθρώπινων επιθηλιακών νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του προστάτη. Το miR-141 παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάβαση από επιθηλιακή σε

μεσεγγυματική φάση,(178) στην οποία τα κύτταρα μειώνουν τις μεταξύ τους επαφές και διευκολύνονται οι μεταστάσεις.

1.5.4. Τα miRNAs και η σηματοδότηση των ανδρογόνων

Φαίνεται ότι υπάρχει μία περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της σηματοδότησης των ανδρογόνων στον καρκίνο του προστάτη, της έκφρασης των miRNAs και διαφόρων οδών-κλειδιών στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη. Συγκεκριμένα miRNAs έχουνδειχθεί ότι ρυθμίζονται από τη σηματοδότηση που γίνεται με τη μεσολάβηση του υποδοχέα ανδρογόνων (androgen-receptor, AR), ενώ άλλα εμπλέκονται στη ρύθμιση της λειτουργίας της οδού σηματοδότησης του AR.

1.5.4.1. mir-125b

Το miR-125b δρα στην περιοχή του promoter του γονιδίου των ανδρογόνων. Η υπερρύθμιση του miR-125b έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ορμονοάντοχων όγκων σε αλλομοσχεύματα σε ευνουχισμένα ποντίκια.(157) Επίσης, σε σειρές καρκινικών κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει την έκφραση της πρωτεΐνης Bak1, μιας προαποπτωτικής πρωτεΐνης της οικογένειας των Bcl-2. Με αυτόν τον τρόπο συμπεριφέρεται ως ογκογονίδιο. Επίσης προάγει τον ανεξάρτητο από τα ανδρογόνα πολλαπλασιασμό των κυττάρων.(179)

1.5.4.2. miR-21

Η επιμόλυνση κυττάρων LnCaP με ένα ρετροϊό που εκφράζει miR-21 έχει δείξει *in vitro* ότι όχι μόνο διεγείρει την ανάπτυξη ορμονοάντοχων κυττάρων αλλά επίσης διασώζει κύτταρα από αναστολή ανάπτυξης λόγω ανεπάρκειας ανδρογόνων.(180) Αυτό υποδεικνύει ότι το miR-21 μπορεί επίσης να προάγει την ανάπτυξη ανθεκτικού στον ευνουχισμό καρκίνου του προστάτη (castrate-resistant prostate cancer - CRPC). Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 βρέθηκαν όχι μόνο σε ασθενείς με ορμονοανθεκτικό καρκίνο προστάτη αλλά και σε αυτούς που δεν ανταποκρίνονταν στη θεραπεία με Δοσεταξέλη.(181) Άλλη μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-21 στους ιστούς μπορεί να έχουν κλινική σημασία. (182) Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 σε μία ομάδα 169 δειγμάτων ιστών από ριζική προστατεκτομή συσχετιζόνταν

με το παθολογοανατομικό στάδιο, την κατάσταση των λεμφαδένων, την εξωκαψική επέκταση και τη βιοχημική υποτροπή. Στην ίδια μελέτη, θεραπεία με έναν αναστολέα του miR-21 in vivo σε ένα μοντέλο ποντικών πέτυχε μείωση του όγκου. Εργασία σε κυτταρικές σειρές καρκίνων του προστάτη ανέδειξε το ρόλο του miR-21 στην απόπτωση και τη μετάσταση, όπως επίσης και ότι θεραπεία με anti-miR-21 μπορεί να μειώσει την κινητικότητα των κυττάρων και να αυξήσει την ευαισθησία τους στην απόπτωση.(183) Οι Reis και συν.(184) ανέδειξαν την RECK, έναν ρυθμιστή των μεταλλοπρωτεϊνών, ως πιθανό στόχο του miR-21. Η μείωση των επιπέδων της RECK αυξάνει τη διηθητικότητα των καρκινικών κυττάρων.

1.5.4.3. *miR-32*

Το miR-32 είναι ένα επιπλέον παράδειγμα miRNA που ρυθμίζεται από τα ανδρογόνα το οποίο υπερρυθμίζεται στον CRPC. Η υπερρύθμιση του miR-32 συνοδεύεται από υπορύθμιση της πρωτεΐνης BTG2 και η μειωμένη χρώση της πρωτεΐνης BTG2 σε δείγματα ριζικών προστατεκτομών έχει δειχθεί ότι προβλέπει την πρόοδο νόσου.(185)

1.5.4.4. *miR-27a*

Η υπερρύθμιση του miR-27a έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης prohibitin.(185, 186) Η prohibitin κωδικοποιείται από ένα γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο και συγκαταστολέα του υποδοχέα ανδρογόνων. Η μειωμένη παραγωγή της πρωτεΐνης αυτής που προκαλείται από το miR-27a έχει ως αποτέλεσμα της αυξημένη έκφραση των γονιδίων του ανδρογονικού υποδοχέα και αυξημένη ανάπτυξη προστατικών καρκινικών κυττάρων.

1.5.5. Τα miRNAs και η οδός PTEN/AKT

Η οδός PTEN/AKT παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη και ειδικά στην εξέλιξη σε ορμονοανθεκτική νόσο.(187) Ενισχυμένη σηματοδότηση της AKT έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, την ενίσχυση της επιβίωσης, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την αγγειογένεση.(188) Η PTEN ρυθμίζει αρνητικά την AKT και γι' αυτό λειτουργεί ως ογκοκαταστολέας. Η απώλεια της PTEN συνήθως συμβαίνει μέσω σωματικών γενετικών αλλαγών. Υπάρχουν όμως και miRNAs τα οποία μπορούν να υπορρυθμίσουν την PTEN. Οι Tian και συν. αναγνώρισαν τέσσερα

miRNAs (miR-19b, miR-23b, miR-26a και miR-92a) τα οποία υπορρυθμίζουν την έκφραση της PTEN και ενισχύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro*.(189)

Οι Wang και συν. αναγνώρισαν ότι η απώλεια του γονιδίου Zbtb7a επιταχύνει την ογκογένεση σε καρκίνους του προστάτη που προέρχονται από απώλεια της PTEN (PTEN loss-driven prostate cancers), μέσω μίας οδού εξαρτώμενης από το μεταγραφικό παράγοντα SRY box 9 (SOX9) για την παράκαμψη της κυτταρική γήρανσης και τη διηθητική ανάπτυξη.(190) Τόσο το αντίγραφο του γονιδίου του PTEN όσο και αυτό του Zbtb7a στοχεύονται από τη συστάδα mir106b-25, παρέχοντας επιπλέον αποδείξεις για τη σπουδαιότητα της αλληλεπίδρασης των miRNA με την οδό της PTEN στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη.

1.5.6. MiRNAs και συντήξεις γονιδίων TMPRSS2:ETS

Η σύντηξη γονιδίων TMPRSS2:ETS είναι παρούσα περίπου στο 50% των καρκίνων του προστάτη.(191) Μία χρωμοσωμική αναδιάταξη έχει ως αποτέλεσμα τη σύντηξη του γονιδίου TMPRSS2 με ένα γονίδιο από την οικογένεια ETS, πιο συχνά το ERG. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξαρτώμενη από τα ανδρογόνα υπερέκφραση του ERG, η οποία έχει μια σειρά επακόλουθων αποτελεσμάτων, που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της EMT.(192) Οι Kim και συνεργάτες βρήκαν ότι αυτό συμβαίνει μέσω της υπορρύθμισης της έκφρασης του miR-200c που εξαρτάται από την ERG και ότι η επιμόλυνση με miR-200c θα μπορούσε να αναστείλει την EMT που ελάγεται από την ERG *in vitro*.(193) Η οδός του Επιδερμικού αυξητικού παράγοντα - Src τυροσινικής κινάσης (EGF/Src tyrosine kinase pathway) συμβάλλει επίσης στην επαγωγή της EMT στους καρκίνους που είναι θετικοί για TMPRSS2:ERG. Οι Kao και συν. έδειξαν ότι για αυτή την αλληλεπίδραση μπορεί να μεσολαβήσει η υπορρύθμιση του miR-30, το οποίο φυσιολογικά καταστέλλει την έκφραση της ERG.(194)

Οι Gordanpouir και συν. βρήκαν ότι η υπορρύθμιση του miR-221 αποτελεί, επίσης, χαρακτηριστικό των θετικών στη σύντηξη TMPRSS:ERG καρκίνων του προστάτη.(195) Η υπορρύθμιση του miR-221 έχει δειχθεί ότι ευνοεί την ανάπτυξη όγκων ανεξάρτητων από τα ανδρογόνα και συσχετίζεται με πιο επιθετικούς φαινότυπους καρκίνου του προστάτη.(196)

1.5.7. Τα miRNAs και οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA που εξαρτώνται από την EZH2

Ο ενισχυτής του ομόλογου γονιδίου *zeste 2* (EZH2) είναι ένα ένζυμο που παίρνει μέρος στη μεθυλίωση των ιστονών. Υπερεκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη και αλληλεπιδρά με τις μεθυλτρασφεράσες του DNA επηρεάζοντας τη μεθυλίωση του DNA.(197) Το EZH2 είναι ένας στόχος του ERG και γι' αυτό υπερεκφράζεται στους θετικούς για TMPRSS2:ERG καρκίνους του προστάτη.(198) Υπάρχει όμως και ένας ανεξάρτητος μηχανισμός για υπερέκφραση της EZH2 από τα miRNA σε αρνητικούς για TMPRSS2:ERG όγκους.(199) Αυτό συμβαίνει μέσω υπερμεθυλίωσης του τόπου του miR-26a, έχοντας ως αποτέλεσμα την υπορρύθμισή του. Βρέθηκε ότι απώλεια του miR-26a οδήγησε σε υπερρύθμιση της EZH2 σε TMPRSS2:ERG αρνητικούς όγκους. Επίσης, το miR-101 έχει αναγνωριστεί ως ένας υπορρυθμιστής της EZH2.(200)

1.5.8. Κυκλοφορούντα miRNAs στον καρκίνο του προστάτη

Η κατανόηση του λειτουργικού ρόλου της απορρύθμισης των miRNAs στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη έχει οδηγήσει σε απόπειρες καθορισμού των επιπέδων των κυκλοφορούντων miRNAs σε δείγμα πλάσματος ή ορού. Απώτερος στόχος είναι η χρήση τους ως βιοδείκτες για να βοηθήσουν τη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη ή να βελτιώσουν την πρόβλεψη της συμπεριφοράς του όγκου, όπως ήδη ερευνάται και σε άλλους καρκίνους.(201)

Οι Mitchell και συν.(74) απέδειξαν την παρουσία ώριμων miRNAs σε σταθερή μορφή στο ανθρώπινο πλάσμα. Στην ίδια μελέτη, οι συγγραφείς απέδειξαν την έκκριση miRNAs που σχετίζονται με όγκους στην κυκλοφορία, αναλύοντας τα πλάσματα ποντικών που έφεραν αλλομοσχεύματα καρκίνου του προστάτη. Έδειξαν αύξηση σε δύο miRNAs (miR-629 και miR-660), τα οποία αναγνώρισαν ότι υπερρυθμίζονται στον καρκίνο του προστάτη πριν από την εμφύτευση, αλλά καμία αύξηση σε miRNAs που δε σχετιζόταν με τον καρκίνο. Στη συνέχεια προχώρησαν συγκρίνοντας πλάσματα 25 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη με 25 υγιείς ανθρώπους. Επέλεξαν 6 υποψήφια miRNAs (miR-100, miR-125b, miR-141, miR-143, miR-205, και miR-296) τα οποία είχαν επιδείξει διαφορετική έκφραση στον καρκίνο του προστάτη σε προηγούμενες μελέτες, αλλά τα οποία δεν αναγνωρίστηκαν στα πλάσματα υγιών εθελοντών.

Βρήκαν αυξημένα επίπεδα όλων των miRNAs εκτός του miR-205, το οποίο δεν ανιχνεύτηκε σε μετρήσιμα επίπεδα ούτε στους ασθενείς ούτε στους υγιείς. Το miR-141 ήταν αυτό που αυξήθηκε σημαντικότερα, με 46-πλάσια υπερέκφραση στον καρκίνο από τους υγιείς. Τα επίπεδα του miR-141 θα μπορούσαν να προβλέψουν την παρουσία καρκίνου του προστάτη με ευαισθησία 60% και ειδικότητα 100%, αν και θα πρέπει να σημειωθεί ότι όλοι οι ασθενείς είχαν μεταστατική νόσο. Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι το miR-141 όχι μόνο σχετίζεται με τη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη αλλά θα μπορούσε να έχει και προγνωστική αξία, αφού συσχετίστηκε και με το Gleason score.(202)

Οι Lodes και συνεργάτες (203) ανέλυσαν πλάσμα από ασθενείς με διάφορες νεοπλασίες και αναγνώρισαν 15 miRNAs τα οποία ήταν αυξημένα στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη σε σχέση με υγιείς ανθρώπους (miR-16, -92a, -103, -107, -197, -34b, -328, -485-3p, -486-5p, -92b, -574-3p, -636, -640, -766, -885-5p). Αυτή η μελέτη δεν επιβεβαίωσε το εύρημα της προηγούμενης, για την αύξηση της έκφρασης του miR-141. Όμως η ομάδα των ασθενών με καρκίνο του προστάτη ήταν μικρή (n = 6), με αρκετούς ασθενείς να έχουν προ-θεραπευτεί με χημειοθεραπεία.

Οι Moltzahn και συν. μελέτησαν μία ομάδα 36 ασθενών με καρκίνο του προστάτη, οι οποίοι χωρίστηκαν σε 3 ομάδες των 12 βάσει του CAPRA score (ένας προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του προστάτη) και τους συνέκριναν με μία ομάδα 12 υγιών ασθενών.(204) Αναγνώρισαν σημαντική ανακρίβεια σε σχέση με προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα. Επέδειξαν μία ομάδα από 10 miRNAs τα οποία έδειξαν διαφορική ποσοτικοποίηση. Τα miR-223, -26b, -30c και miR-24 ήταν υπορρυθμισμένα στην ομάδα του καρκίνου και τα miR-874, -1274a, -1207-5p, -93 και miR-106a ήταν υπερρυθμισμένα. Ανάμεσα σ' αυτά τα 10, μπορούσαν να αναγνωρίσουν μερικά miRNAs των οποίων η έκφραση μεταβάλλονταν σημαντικά ανάμεσα στις ομάδες κινδύνου, όπως π.χ. το miR-24 σταθερά μειωνόταν αντίστοιχα με τον κίνδυνο, ενώ το miR-106a σταθερά αυξανόταν.

Οι Agalogu και συν.(205) ανέλυσαν τα επίπεδα τριών miRNAs στο πλάσμα 51 ασθενών με καρκίνο του προστάτη (υποδιαιρεμένοι σε ασθενείς με εντοπισμένη, τοπικά προχωρημένη και μεταστατική νόσο) και 20 υγιών εθελοντών. Βρήκαν αυξημένα επίπεδα των miR-21 και miR-221 στην ομάδα του καρκίνου

ως σύνολο, συγκρινόμενη με τους υγιείς. Το miR-141 δε βρέθηκε σημαντικά αυξημένο στο σύνολο των ασθενών, αλλά όταν απομονώνονταν η ομάδα των μεταστατικών περιστατικών, και τα τρία miRNAs ήταν σημαντικά αυξημένα, με το miR-141 να είναι το περισσότερο αυξημένο από τα υπόλοιπα.

Οι Gonzales και συν.(206) ερεύνησαν το ρόλο του miR-141 ως βιοδείκτη στον προχωρημένο καρκίνο του προστάτη μελετώντας αναδρομικά μια ομάδα 21 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Ανέλυσαν τα επίπεδα του miR-141 χρησιμοποιώντας qRT-PCR σε συνδυασμό με γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH), προστατικό ειδικό αντιγόνο (PSA) και αριθμό κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTC) σε αποθηκευμένα δείγματα αίματος, ληφθέντα σε διάφορα διαστήματα της κλινικής πορείας των ασθενών. Τα αυξημένα επίπεδα του miR-141 έδειξαν σημαντική ικανότητα να προβλέπουν την κλινική πρόοδο της νόσου. Τα επίπεδα του miR-141 επίσης συσχετίστηκαν με αλλαγές σε άλλους μελετώμενους βιοδείκτες. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι το miR-141 μπορεί να είναι ένας κατάλληλος βιοδείκτης για την πρόοδο της μεταστατικής νόσου του καρκίνου του προστάτη αλλά δέχτηκαν ότι αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί σε μεγάλες προοπτικές μελέτες.

Οι Zhang και συν.(181) ανέλυσαν τα επίπεδα πλάσματος για το miR-21 σε 20 ασθενείς με εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη, 20 με μεταστατικό καρκίνο προστάτη οι οποίοι ήταν ορμονοευαίσθητοι, 10 με ορμονοανθεκτική νόσο και 6 με καλοήγη υπερπλασία μόνο. Έδειξαν αυξημένα επίπεδα miR-21 σε ασθενείς με ορμονοανθεκτικό καρκίνο προστάτη και σε εκείνους με ορμονοευαίσθητο μεταστατικό καρκίνο των οποίων το PSA ήταν υψηλότερο από 4 ng/ml. Δεν υπήρχε διαφορά στην έκφραση του miR-21 μεταξύ εκείνων με εντοπισμένη νόσο και της ομάδας ελέγχου. Επιπρόσθετα, βρήκαν ότι, ανάμεσα στην ορμονοάντοχη ομάδα, τα επίπεδα του miR-21 ήταν υψηλότερα σε εκείνους τους ασθενείς οι οποίοι δεν έδειξαν ανταπόκριση σε θεραπεία με δοσεταξέλη.

Οι Brase και συν.(207) έλεγξαν πλάσματα από μία μικρή ομάδα ασθενών με μεταστατικό και τοπικά προχωρημένο καρκίνο προστάτη χρησιμοποιώντας τεχνική βασισμένη σε micro-array για να ποσοτικοποιήσουν 667 miRNAs και αναγνώρισαν πέντε τα οποία ήταν υπερρυθμισμένα στη μεταστατική ομάδα (miR-375, miR-9*, miR-141, miR-200b και miR-516a-3p). Προχώρησαν στο να αναλύσουν τα πιο πολλά υποσχόμενα υποψήφια miRNAs από την αρχική

μελέτη τους (miR-141, miR-375, και miR-200b) σε μία μεγαλύτερη ομάδα ασθενών (n = 45) και βρήκαν ότι τα επίπεδα των miR-375 και miR-141 θα μπορούσαν να ξεχωρίσουν τους καρκίνους υψηλού κινδύνου (Gleason \geq 8 ή με μεταστάσεις) από Gleason 7 καρκίνους με μεγαλύτερη ακρίβεια από το PSA. Στη συνέχεια πραγματοποίησαν την ίδια ανάλυση σε μία ακόμα μεγαλύτερη ομάδα (n = 71) ασθενών περιλαμβάνοντας ένα μεγαλύτερο αριθμό από υψηλού κινδύνου ή μεταστατικούς ασθενείς. Έδειξαν ότι τόσο τα επίπεδα του miR-141 όσο και του miR-375 ήταν προβλεπτικά για θετική λεμφαδενική νόσο και ότι το miR-141 θα μπορούσε να διακρίνει νόσο Gleason \geq 8 από Gleason 7. Επιπρόσθετα, έδειξαν αυξημένη έκφραση αυτών των δεικτών στους ιστούς σε δείγματα καρκίνου σε σχέση με δείγματα ιστών με καλοήγη υπερπλασία.

Οι Selth και συν. χρησιμοποίησαν ένα μοντέλο καρκίνου του προστάτη σε ποντίκια για να αναγνωρίσουν υποψήφια miRNAs τα οποία υπερεκφράζονται σε σχέση με υγιή ποντίκια. Αναγνώρισαν υπερρύθμιση των miR-141, miR-298, miR-346 και miR-375 τόσο στο μοντέλο των ποντικιών όσο και σε ορό ανδρών με ορμονοανθεκτικό καρκίνο προστάτη σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου.(208) Η ίδια ομάδα πιο πρόσφατα αναγνώρισε 3 miRs (miR-141, miR-146b-3p και miR-194) τα οποία προέβλεψαν βιοχημική υποτροπή σε άνδρες μετά από χειρουργείο για ενδιάμεσου κινδύνου καρκίνο.(209)

Οι Bryant και συνεργάτες (210) μελέτησαν ειδικά εάν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τα κυκλοφορούντα miRNAs μέσα σε μικροκυστίδια ή εξωσωμάτια ως βιοδείκτες στον καρκίνο του προστάτη. Ανέλυσαν πλάσμα από μία ομάδα 78 ασθενών με καρκίνο του προστάτη και 28 υγιείς, οι οποίοι ήταν άνδρες με επίπεδα PSA <10 ng/ml και αρνητικές βιοψίες προστάτη. Ανέλυσαν 742 miRNAs, βρίσκοντας ένα σύνολο από 11 miRNAs να είναι υπερρυθμισμένα στον καρκίνο σε αντίθεση με τους υγιείς (miR-107, -130b, -141, -2110, -301a, -326, -331-3p, -432, -484, -574-3p, και -625) και ένα να είναι υπορρυθμισμένο (miR-181a-2). Όταν συγκρίθηκαν αποκλειστικά μη μεταστατικοί ασθενείς με τους υγιείς, μία μικρότερη υποομάδα από αυτά τα miRNAs διατήρησαν τη διαφορική τους έκφραση. Όταν οι μεταστατικοί ασθενείς συγκρίθηκαν με τους μη μεταστατικούς, μία διαφορετική ομάδα από 16 miRNAs βρέθηκαν να έχουν διαφορική έκφραση περιλαμβάνοντας το miR-375, το οποίο επίσης αναγνωρίστηκε ως υποψήφιος βιοδείκτης της προχωρημένης νόσου από τους Brase και

συν.(207) Επίσης, έδειξαν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων miR-375 και miR-141 σε μία χωριστή ομάδα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο προστάτη (n = 47) συγκρινόμενοι με μία ομάδα ασθενών χωρίς υποτροπή της νόσου μετά από ριζική προστατεκτομή (n = 72). Σ' αυτήν την ακόλουθη ομάδα, ανέλυσαν το περιεχόμενο των miRNA σε μεγαλύτερα μικροκυτίδια και μικρότερα εξωσωμάτια χωριστά και βρήκαν αυξημένα επίπεδα miR-375 και miR-141 και στα δύο κλάσματα. Στη ίδια μελέτη(210) μέτρησαν τα επίπεδα πέντε miRNAs (miR-107, miR-574-3p, miR-375, miR-200b, miR-141) σε δείγματα ούρων μετά από δακτυλική εξέταση. Έδειξαν ότι τα επίπεδα των miR-107 και miR-574-3p ήταν σημαντικά υψηλότερα σε περιστατικά με καρκίνο του προστάτη όταν συγκρίθηκαν με υγιείς, υποδεικνύοντας ότι αυτό θα μπορούσε να είναι ένας έγκυρος τύπος δείγματος για ανάλυση miRNA.

Οι Nguyen και συν. (178) έλεγξαν ένα ευρύ προφίλ miRNA από 84 ασθενείς με διάφορα στάδια καρκίνου του προστάτη και αναγνώρισαν για ακόμα μία φορά ότι τα miR-141 και miR-375 ήταν υπερρυθμισμένα στους ορμονοανθεκτικούς ασθενείς σε σχέση με αυτούς με εντοπισμένη νόσο. Το miR-378 επίσης ήταν υπερρυθμισμένο σ' αυτούς τους ασθενείς ενώ το miR-409-3p ήταν υπορυθμισμένο.

Οι Shen και συν.(211) εκτίμησαν τέσσερα miRNAs σε δείγματα πλάσματος 82 ασθενών με καρκίνο προστάτη και βρήκαν ότι ο συνδυασμός των miR-20a, miR-21, miR-145 και miR-221 θα μπορούσε να ξεχωρίσει τον εντοπισμένο καρκίνο σε ομάδες ασθενών διαφορετικού κινδύνου. Αυτές οι δύο τελευταίες μελέτες δείχνουν τη δυνητική αξία του συνδυασμού αναλύσεων διαφόρων συνδυασμών miRNA με σκοπό να βελτιώσουν τη διαγνωστική ή την προγνωστική ακρίβεια. Ομοίως, οι Mahn και συν.(212) βρήκαν ότι με το miR-26a θα μπορούσαν να διακρίνουν ασθενείς πάσχοντες από καρκίνο σε σχέση με ασθενείς με καλοήγη υπερτροφία προστάτη με ειδικότητα 89,2% και ευαισθησία 55.6%. Στην ίδια μελέτη, τα αυξημένα επίπεδα των miR-16, miR-195 και miR-26a είχαν αντίστροφη συσχέτιση με τα θετικά χειρουργικά όρια μετά από ριζική προστατεκτομή, όπως επίσης και ότι τα επίπεδα αυτών των miRNAs έπεσαν μετά τη χειρουργική επέμβαση.

Τέλος, οι Foj και συν.(213) μελέτησαν τα επίπεδα έκφρασης πέντε miRNAs στα ούρα ασθενών με καρκίνο προστάτη και υγιών εθελοντών. Βρήκαν ότι τα

miR-21, miR-141, και miR-375 είχαν αυξημένη έκφραση, ενώ αντίθετα, το miR-214 είχε μειωμένη έκφραση στους ασθενείς, συγκρινόμενοι με τους υγιείς εθελοντές. Με τα miR-21 και miR-375 θα μπορούσαν να διαχωρίσουν τους υγιείς από τους ασθενείς. Επίσης, τα επίπεδα του miR-141 σχετίζονταν με το Gleason score.

1.5.9. Τα miRNAs ως βιοδείκτες στον καρκίνο του προστάτη

Παρόλη τη συνεχή πρόοδο, υπάρχουν ακόμα αρκετές προκλήσεις που πρέπει να ξεπεραστούν στη διαχείριση ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του προστάτη. Όπως είδαμε, η χρήση του PSA έχει επιτύχει την πρώιμη ανίχνευση της νόσου, συνήθως σε θεραπεύσιμο στάδιο, όμως παραμένει το πρόβλημα της διευκρίνισης του ποιοι ασθενείς πραγματικά χρειάζονται θεραπεία και ποιοι θα μπορούσαν απλώς να παρακολουθούνται με ασφάλεια. Η χρήση νομογραμμάτων παρέχει κάποια βοήθεια, όμως η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών είναι απαραίτητη ώστε να γίνει λεπτομερέστερη εκτίμηση του κινδύνου αυτών των ασθενών. Επίσης, δεν υπάρχει προβλεπτικός ή προγνωστικός βιοδείκτης, ο οποίος θα παρέχει κάποια ασφαλή εκτίμηση για την ανταπόκριση των ασθενών στην ακτινοθεραπεία.

Τα τελευταία χρόνια συντελείται σημαντική πρόοδος στον τομέα των βιοδεικτών για τον καρκίνο του προστάτη. Οι νεότεροι από αυτούς, όπως PCA3 score και ο Prostate Health Index,(214) βελτιώνουν την ειδικότητα του PSA και παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά την επιθετικότητα της νόσου.(215) Δεν υπάρχουν όμως βιοδείκτες οι οποίοι μπορούν να προβλέψουν το αποτέλεσμα της ακτινοθεραπείας (ριζική, συμπληρωματική, διάσωσης) σε ασθενείς με εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη και την αποτυχία ελέγχου της νόσου, είτε είναι τοπική είτε συστηματική.

Ο στόχος είναι να δημιουργηθεί τελικά ένα πάνελ από miRNAs που θα μετρούνται στον ορό ή στους ιστούς και θα αποκαλύπτουν τους ασθενείς με περιορισμένο καρκίνο οι οποίοι πρόκειται να εμφανίσουν πρόοδο νόσου και χρειάζονται επιθετική αντιμετώπιση ή τους ασθενείς με προχωρημένη νόσο οι οποίοι είναι πιθανό να ωφεληθούν από συγκεκριμένες θεραπείες όπως νεότερους παράγοντες που δρουν στην οδό των ανδρογόνων. Και αυτό φαίνεται αρκετά συναρπαστικό, αφού μπορεί να γίνει με μη επεμβατικό τρόπο και να

μειώσει την ανάγκη για βιοψίες σε ασθενείς με αυξημένο PSA, μερικοί από τους οποίους δεν θα έχουν καν καρκίνο. Αυτό βέβαια δεν είναι μια εύκολη διαδικασία. Σε μία ανασκόπηση αναφέρονται ότι πάνω από 180 miRNAs είχαν βρεθεί να είναι απορρυθμισμένα στον καρκίνο του προστάτη.(216) Πολλές φορές παρουσιάζονται αντικρουόμενα αποτελέσματα, που οφείλονται στις διαφορετικές τεχνικές εκτίμησης των επιπέδων των miRNAs, στη λήψη τους από διαφορετικές πηγές (φρέσκοι ή κατεψυγμένοι ιστοί, κύβοι παραφίνης, πλάσμα, ούρα, κυτταρικές σειρές κλπ) ή στην ανομοιογένεια των ασθενών όσον αφορά το στάδιο της νόσου, την ηλικία κλπ. Παρόλο που έχουμε πολύ δρόμο ακόμα να διανύσουμε, το μέλλον προβλέπεται συναρπαστικό σ' αυτόν τον τομέα.

Η υπερέκφραση ή η υποέκφραση ορισμένων miRNAs έχει συσχετιστεί με τον κίνδυνο βιοχημικής υποτροπής μετά από ριζική προστατεκτομή. Η υπερέκφραση του miR-200a έχει συσχετιστεί με μειωμένη ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων προστάτη. Οι Barron και συν.(217) έδειξαν ότι ασθενείς που εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή μετά από προστατεκτομή είχαν χαμηλότερα επίπεδα του miR-200a σε δείγματα ιστών σε σύγκριση με αντίστοιχου σταδίου ασθενείς οι οποίοι δεν εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή.

Η υποέκφραση των miR-145,(218) και miR-221,(196, 219) συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών, είτε αυτή αναφέρεται στην ολική επιβίωση είτε στην εμφάνιση υποτροπής ή μεταστάσεων.

Οι μεταβολές της έκφρασης του miR-141 συσχετίζονται, επίσης, με την κλινική πορεία της νόσου και το συγκεκριμένο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης τόσο για την πορεία της νόσου όσο και για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.(206)

Οι Ambis και συν.(163) βρήκαν ότι το miR-101 υπερεκφραζόταν συστηματικά σε όγκους που εμφάνιζαν εξωκαψική επέκταση.

Στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 8) συνοψίζονται τα miRNAs που σχετίζονται με την πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη.

Πίνακας 8. miRNAs που εμπλέκονται στην πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη.

miRNA	Έκφραση	Προγνωστική παράμετρος	Στόχος
miR-21	Up-regulated	CR	MARCKS
miR-331-3p	Down-regulated	CR	ERBB-2
miR-141	Up-regulated	CR, Gleason score	Clock
miR-146	Down-regulated	CR, μετάσταση	CXCR4, ROCK1
miR-125b	Up-regulated	CR, μετάσταση, στάδιο νόσου, PNI	BAK1
miR-96	Up-regulated	Βιοχημική υλοτροπή, υλοτροπή νόσου	FOXO1, hZIPs
miR-1	Down-regulated	Gleason score, pT, υλοτροπή	XPO6, PTK9, PNP
miR-143	Down-regulated	Μετάσταση	MYO6
miR-145	Down-regulated	Μετάσταση	MYO6, MYC
miR-16	Down-regulated	Μετάσταση	Bcl-2
miR-34a	Down-regulated	Μετάσταση	CD44
miR-126*	Down-regulated	Μετάσταση	Prostein
miR-301	Down-regulated	Μετάσταση	FOXF2, BBC3, PTEN, COL2A1
miR-200 family	Down-regulated	Μετάσταση, Gleason score, στάδιο νόσου	ZEB2, Bmi, survivin, Runx2, ErbB3, E2F1, E2F5, PKCe
miR-221	Down-regulated	Μετάσταση	TMPRSS2:ERG presence p27kip
miR-10	Up-regulated	PNI	HOXA1
miR-100	Up-regulated	PNI	RAS, c-myc, Laminin 5 b3, THAP2, SMARCA5, BAZ2A
miR-30c	Up-regulated	PNI	BCL-9, MTA1
miR-224	Up-regulated	PNI	KLK1, API-5

CR (Castration Resistance): ευνουχοάντοχή, PNI: περινευριδιακές διηθήσεις(220)

2. Ειδικό μέρος

Όπως αναφέρθηκε στο πρώτο μέρος, υπάρχουν αδιάσειστα στοιχεία για την επίδραση της ακτινοβολίας στην έκφραση των miRNAs, τα οποία με τη σειρά τους εμπλέκονται σε πλήθος κυτταρικών λειτουργιών, όπως η επιδιόρθωση της βλάβης του DNA.(221) Τα εργαστηριακά δεδομένα, αν και αυξάνονται διαρκώς, δεν είναι ακόμα επαρκή ώστε να φωτίσουν όλες τις πτυχές των αλληλεπιδράσεων ακτινοβολίας, miRNAs και μοριακών μηχανισμών. Αφορούν κυρίως ακτινοβόληση κυτταροκαλλιιεργειών και πειραματόζωων, σε συνθήκες που απέχουν πολύ από αυτές που συναντώνται στην κλινική πράξη. Όπως είναι αναμενόμενο, τα ευρήματα σε κλινικό επίπεδο είναι σαφώς λιγότερα. Το μεγαλύτερο βάρος της έρευνας έχει δοθεί στον τομέα της βελτίωσης της ακρίβειας και του χρόνου της διάγνωσης, αναζητώντας συνδυασμούς miRNAs που θα είναι ικανοί να διαγιγνώσκουν πρώιμους καρκίνους και να τους διαχωρίζουν από καλοήθεις καταστάσεις.

Λίγες είναι οι κλινικές μελέτες για τη χρήση των miRNAs ως προβλεπτικών ή προγνωστικών δεικτών για το αποτέλεσμα των αντινεοπλασματικών θεραπειών και αφορούν κυρίως ανάλυση αναδρομικών δεδομένων.(222, 223) Σε πρόσφατη ανασκόπηση μελετών για ασθενείς πάσχοντες από καρκίνο του προστάτη βρέθηκαν περισσότερα από 65 miRNAs επηρεασμένα και περίπου 20 από αυτά φαίνονται ότι εμπλέκονται στην πρόγνωση της νόσου.(224) Ελάχιστα είναι οι μελέτες οι οποίες έχουν γίνει σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία και το κλινικό αποτέλεσμα σχετίστηκε με τη μεταβολή κάποιων miRNAs, όπως για παράδειγμα μία σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (συσχέτιση miRNAs με την ακτινοευαισθησία του όγκου)(225) και μία σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη.(226)

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει μελέτη στη βιβλιογραφία, η οποία να συσχετίζει την έκφραση των miRNAs με την έκβαση ασθενών με καρκίνο του προστάτη που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία. Υπάρχει μόνο μία, η οποία έδειξε την επίδραση της κλασματοποιημένης ακτινοβόλησης καλλιέργειας κυττάρων καρκίνου προστάτη. Στη μελέτη αυτή βρέθηκαν περισσότερες μεταβολές στην έκφραση γονιδίων και miRNAs από την κλασματοποιημένη ακτινοβόληση σε

σύγκριση με την εφάπαξ χορήγηση της ακτινοβολίας.(227) Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι η συγκέντρωση κάποιων miRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο του προστάτη θα μεταβληθεί λόγω της επίδρασης της ακτινοθεραπείας στη νόσο. Η αλλαγή αυτή θα μπορεί να ανιχνευτεί στον ορό των ασθενών και ίσως θα μπορούσε να συσχετιστεί με την ανταπόκριση των ασθενών στην ακτινοθεραπεία και την πορεία της νόσου τους.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος των μεταβολών της έκφρασης – συγκέντρωσης τεσσάρων miRNAs (miR-21, miR-106b, miR141 και miR-375) στον ορό ασθενών πασχόντων από πρώιμο καρκίνο προστάτη που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίστηκαν με κλινικοεργαστηρικά δεδομένα των ασθενών, ώστε να διερευνηθεί η πιθανή χρήση αυτών των miRNAs ως προβλεπτικών και προγνωστικών δεικτών για το αποτέλεσμα της θεραπείας και την εξέλιξη της νόσου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση για την ανεύρεση των mRNA-στόχων αυτών των miRNAs καθώς και τις μοριακές οδούς που επηρεάζονται από αυτά.

2.1. Υλικό και μέθοδος

2.1.1. Επιλογή των miRNAs

Η επιλογή των miRNAs που αναλύθηκαν έγινε μετά από ενδελεχή ανάλυση της βιβλιογραφίας την εποχή που συντάχθηκε το πρωτόκολλο της διδακτορικής διατριβής (2013). Χρησιμοποιήθηκαν λέξεις – κλειδιά, όπως: καρκίνος του προστάτη, miRNA, ακτινοθεραπεία, ακτινοβολία, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς. Η τελική επιλογή δεν ήταν εύκολη, καθώς ακόμα και σήμερα υπάρχουν αρκετές μελέτες με αντικρουόμενα αποτελέσματα και οι in vivo μελέτες σε ασθενείς παραμένουν περιορισμένες.(228) Έως τη στιγμή του συντάχθηκε η παρούσα διατριβή στην οριστική της μορφή (αρχές 2022), ελάχιστες είναι οι μελέτες που αφορούν το ρόλο των miRNAs στην πρόβλεψη του αποτελέσματος της ακτινοθεραπείας(228) ή της ανάπτυξης απομακρυσμένων μεταστάσεων.(229)

Τα miR-21, miR-106b, miR-141 και miR-375 κρίθηκαν ως καταλληλότερα, καθώς φαίνεται να συσχετίζονται με την παθογένεση και την πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη συχνότερα από άλλα.(206, 230-232) Ο συνδυασμός των mir-141, mir-21 και mir-375 μελετήθηκε από τους Porzycki και συν. (202)

ως διαγνωστικό εργαλείο για την αναγνώριση του καρκίνου του προστάτη. Βρήκαν ότι το miR-375 έδωσε την υψηλότερη AUC στην ROC ανάλυση και ο συνδυασμός και των τριών miRNAs έδωσε την υψηλότερη θετική προγνωστική αξία. Επιπλέον, η έκφρασή τους επηρεάζονταν από την ακτινοβόληση κυτταρικών σειρών καρκίνου του προστάτη.(222) Το miR-21 δε θα μπορούσε βέβαια να λείπει από μια τέτοια μελέτη, καθώς είναι το μοναδικό ίσως oncomir που σχετίζεται με όλες τις νεοπλασίες και πληρεί τα παραπάνω κριτήρια. Σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη είχε συσχετισθεί με πρόκληση ακτινοαντοχής (233) ενώ η υπερέκφρασή του σε υποξικές συνθήκες είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη επιθετικότητα των κυττάρων.(234) Τα miR-141 και miR-106b, συν τοις άλλοις, προτεινόταν ως δυνητικοί προγνωστικοί βιοδείκτες, καθώς επεδείκνυαν διαφορετική έκφραση σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη με διαφορετική ακτινοευαισθησία. (235)

2.1.2. Ασθενείς

Στη μελέτη συμμετείχαν ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο και εντοπισμένο αδενοκαρκίνωμα του προστάτη. Ένας ασθενής που έπασχε από μικροκυτταρικό καρκίνωμα προστάτη δε περιλήφθηκε στη μελέτη λόγω σπανιότητας αυτού του ιστολογικού τύπου και εντελώς διαφορετικής κλινικής συμπεριφοράς αυτού του νεοπλασματος. Η συλλογή των κλινικών και των μοριακών δεδομένων κάθε ασθενή ήταν προοπτική. Δημιουργήθηκε βάση δεδομένων με το λογισμικό Microsoft Access®, στην οποία καταχωρήθηκαν προοπτικά όλα τα δεδομένα των ασθενών: κλινική εξέταση, πλήρες ιατρικό ιστορικό, φαρμακευτική αγωγή (σχετική ή άσχετη με τον καρκίνο του προστάτη), ιστολογικά δεδομένα (Gleason score, στάδιο και έκταση νόσου, παρουσία περινευριδιακών διηθήσεων, διήθηση κάψας, διήθηση σπερματοδόχων κύστεων, διήθηση λεμφαδένων) πλήρης αιματολογικός έλεγχος, πριν από, κατά τη διάρκεια και μετά το πέρας της ακτινοθεραπείας (γενική εξέταση αίματος, πλήρης βιοχημικός έλεγχος και τιμές PSA), λεπτομέρειες ακτινοθεραπευτικής αγωγής (έναρξη – λήξη ακτινοθεραπείας, συνολική δόση). Με αυτόν τον τρόπο ήταν εύκολη η δημιουργία πινάκων με κάθε είδους δεδομένα και συνδυασμούς αυτών, ώστε να είναι εύκολη η εισαγωγή τους στο λογισμικό της στατιστικής ανάλυσης.

Η μελέτη αυτή διεξήχθη σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού

Νοσοκομείου Ηρακλείου (αριθμός απόφασης: 16363). Όλοι οι ασθενείς αρχικά ενημερώθηκαν αναλυτικά για το πρωτόκολλο, το οποίο τους δόθηκε σε αντίγραφο ώστε αυτοί ή κάποιος συγγενής τους να το μελετήσει και υπέγραψαν γραπτή συγκατάθεση. Τους εξηγήθηκε με σαφήνεια ότι δεν ήταν απαραίτητη η συμμετοχή τους στο πρωτόκολλο προκειμένου να υποβληθούν στην κατάλληλη θεραπεία, καθώς και ότι ανά πάσα ώρα θα μπορούσαν να αποσύρουν τη συγκατάθεσή τους.

Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε εξωτερική ακτινοθεραπεία στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο του Ηρακλείου Κρήτης από τον Ιανουάριο του 2013 έως και τον Ιούλιο του 2016. Χρησιμοποιήθηκε τρισδιάστατη σύμμορφος τεχνική (3-D CRT), η οποία ήταν η καθιερωμένη τεχνική στο τμήμα μας εκείνο το χρονικό διάστημα, καθώς δεν είχαν ακόμα εγκατασταθεί οι νέοι γραμμικοί επιταχυντές με δυνατότητες τεχνικών IMRT και VMAT. Η θεραπεία δόθηκε ως ριζική (μονοθεραπεία), συμπληρωματικά μετά από χειρουργική επέμβαση (π.χ. όταν υπήρχαν θετικά χειρουργικά όρια) ή τέλος ως θεραπεία διάσωσης, μετά από χειρουργική επέμβαση και εμφάνιση βιοχημικής υποτροπής. Τόσο το πλάνο θεραπείας όσο και η δόση ήταν εξατομικευμένη για κάθε ασθενή, με την τελευταία να κυμαίνεται από 64,8Gy έως 71Gy.

Η βιοχημική υποτροπή μετά από ριζική προστατεκτομή ορίστηκε ως δύο συνεχόμενες τιμές του PSA ≥ 0.2 ng/ml.(236) Η βιοχημική υποτροπή μετά από ριζική ακτινοθεραπεία ορίστηκε ως η αύξηση της τιμής του PSA > 2 ng/ml συγκρινόμενη με την κατώτερη τιμή της.(237) Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν, επιπρόσθετα, ανάλογα με τον κίνδυνο υποτροπής για εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη σε ομάδες χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ESMO(7) και με τους D'Amico και συν.(8) (Πίνακας 2).

2.1.3. Λήψη δειγμάτων

Από κάθε ασθενή ελήφθησαν δύο δείγματα περιφερικού αίματος από 3ml το καθένα. Η διαδικασία της αιμοληψίας πραγματοποιήθηκε από έμπειρες νοσηλεύτριες με όλες τις προφυλάξεις για να αποφευχθεί η αιμόλυση, καθώς θα υπήρχε ο κίνδυνος επιμόλυνσης από miRNAs που απελευθερώνονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια.(238) Το πρώτο δείγμα ελήφθη την πρώτη ημέρα της

ακτινοθεραπείας, πριν από την πρώτη συνεδρία και το δεύτερο δείγμα την τελευταία ημέρα της ακτινοθεραπείας, αμέσως μετά την τελευταία συνεδρία. Χρησιμοποιήθηκαν σωλήνες χωρίς αντιπηκτικό ώστε τα δείγματα να πήξουν. Τα πηγμένα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και ο ορός συλλέχθηκε με προσοχή σε σωλήνες 1,5ml, οι οποίοι ήταν ελεύθεροι RNAσών και αποθηκεύτηκε αμέσως στους -80°C μέχρι να υποστούν περαιτέρω επεξεργασία.

2.1.4. Απομόνωση του RNA

Οι αποψυγμένοι οροί φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στα 11.000g ώστε να απομακρυνθούν υπολειμματικά κύτταρα και συντρίμμια. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σ' αυτούς γνωστή ποσότητα ενός microRNA του *Caenorhabditis elegans*, το cel-mir-39 (miRNeasy Serum/Plasma spike-in control, Qiagen) ώστε να γίνει έλεγχος των διαδικασιών εξαγωγής και ενίσχυσης. Ειδικότερα, τοποθετήθηκαν $8,8 \times 10^8$ αντίγραφα του cel-mir-39 σε 300μl ορού και τα μικρά RNAs απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας το NucleoSpin® miRNA Plasma Kit (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.1.5. Quantitative real-time PCR και έκφραση των miRNAs

Για την αντίστροφη μεταγραφή και την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time Polymerase Chain Reaction - RT-qPCR) χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία TaqMan (Applied Biosystems) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, χρησιμοποιήθηκαν 2μl διαλύματος RNA για τη σύνθεση του cDNA σε αντιδράσεις 10μl, οι οποίες περιελάμβαναν 2μl από ειδικό εκκινητή (primer) του προγονικού βρόγχου του κάθε miRNA, 0,1μl dNTPs, 0,75μl αντίστροφη τρανσκριπτάση (reverse transcriptase), 1μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδραση, 0,13μl αναστολέας της RNάσης και 4,02μl ddH₂O. Στη συνέχεια τα cDNAs αραιώθηκαν 3 φορές και 2μl από το αραιωμένο διάλυμα του cDNA χρησιμοποιήθηκαν σε μία αντίδραση RT-qPCR. Τα 10μl της αντίδρασης στην οποία χρησιμοποιήθηκε το TaqMan Universal Master mix II.no UNG περιελάμβαναν ακόμα 0,5μl εκκινητή, 5μl μείγμα αντίδρασης 2x και 2,5μl ddH₂O. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν από τρεις φορές. Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα αρνητικά δείγματα τόσο στις αντιδράσεις για την σύνθεση του cDNA όσο και σ' αυτές της RT-qPCR, όπου αντί για RNA χρησιμοποιήθηκε H₂O and no template control αντίστοιχα. Οι κωδικοί

των TaqMan™ Assay των miRNAs αναφέρονται σε ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 9).

Οι σχετικές αλλαγές της ποσότητας των miRNAs στα δείγματα μετά την ακτινοθεραπεία υπολογίστηκαν με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$ χρησιμοποιώντας ως αναφορά το cel-mir-39, σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Σχετική αλλαγή} = 2^{-[(Ct_{\text{miR}\#} - Ct_{\text{cel-mir-39}})_{\text{before}} - (Ct_{\text{miR}\#} - Ct_{\text{cel-mir-39}})_{\text{after}}]} (239)$$

Πίνακας 9. Κωδικοί των TaqMan Assays για κάθε εξεταζόμενο miRNA					
miRNA	cel-miR-39	miR106-5p	hsa-miR-21	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-375
Assay Id	#00200	#00442	#00397	#00463	#00564

Για την ανάλυση των δεδομένων οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: (i) ασθενείς με τιμές σχετικής αλλαγής ≥ 1 , οι οποίοι χαρακτηρίζονταν από υψηλότερη έκφραση του εν λόγω miRNA πριν από την ακτινοθεραπεία και (ii) ασθενείς με τιμές σχετικής αλλαγής < 1 , οι οποίοι χαρακτηρίζονταν από υψηλότερη έκφραση του εν λόγω miRNA μετά την ακτινοθεραπεία.

2.1.6. Στατιστική ανάλυση

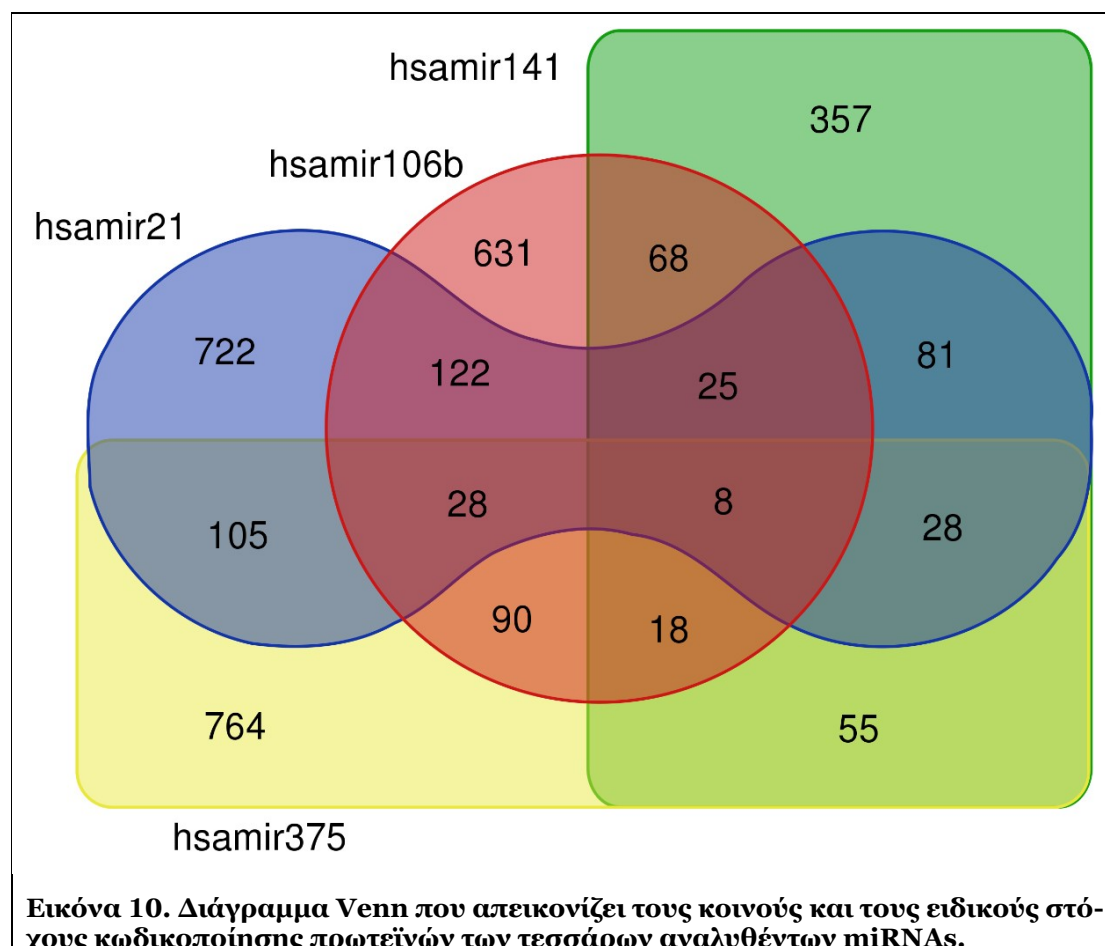
Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού SPSS έκδοση 22.0 (SPSS Inc. Chicago IL). Εφαρμόστηκε περιγραφική στατιστική για τον καθορισμό και την περιγραφή των ονομαστικών και των κατηγορικών τιμών. Οι συσχετισμοί έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών miRNAs πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμή Spearman's (Spearman's' test). Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman's εφαρμόστηκε, επίσης, για να εξεταστεί τυχόν συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs πριν από την ακτινοθεραπεία με τα επίπεδα PSA πριν από την ακτινοθεραπεία. Η δοκιμή χ^2 (chi-square test) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών. Η δοκιμασία Mann-Whitney U εφαρμόστηκε για να εξεταστούν τα επίπεδα του miRNA ως συνεχείς μεταβλητές με τα ποσοστά βιοχημικής υποτροπής μετά από την ακτινοθεραπεία και με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Οι συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs και της επιβίωσης χωρίς υποτροπή (RFS) και της ολικής επιβίωσης (OS) αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο

Kaplan Meier, τη δοκιμή λογαρίθμου-βαθμού (log-rank test, Mantel-Cox) και τα μοντέλα αναλογικής παλινδρόμησης κινδύνου Cox (Cox proportional hazard regression models). Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ομάδες υψηλής και χαμηλής έκφρασης σύμφωνα με τη μέση τιμή για κάθε έκφραση miRNA. Οι ασθενείς με τιμές έκφρασης miRNA ίσες ή μεγαλύτερες από τις μέσες τιμές χαρακτηρίστηκαν ως έχοντες υψηλή έκφραση, ενώ ασθενείς με έκφραση miRNA μικρότερη από τη διάμεση τιμή ως έχοντες χαμηλή έκφραση. Η στατιστική σημασία ορίστηκε στο $p \leq 0.05$.

2.1.7. Γονίδια - στόχοι των miRNAs και ανάλυση εμπλουτισμού οδών (pathway enrichment analysis)

Η βάση δεδομένων TarBase χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση των γονιδιακών στόχων κωδικοποίησης πρωτεΐνης για καθένα από τα ερευνηθέντα miRNAs.(240) Για κάθε miRNA αποκτήθηκε το πλήρες σύνολο ανθρώπινων πρωτεϊνικών κωδικοποιητικών γονιδίων που βρέθηκαν να συσχετίζονται με καρκινικούς ιστούς. Και για τα τέσσερα miRNAs έγινε δυνατός ο εντοπισμός περισσότερων των 1000 στόχων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Πολύ μικρότερος αριθμός στόχων κωδικοποίησης πρωτεϊνών βρέθηκε να σχετίζεται με ιστούς καρκίνου του προστάτη (181 στόχοι για το hsa-miR-106b-5p, 0 στόχοι για το hsa-miR-141-3p, 1 στόχος για το hsa-miR-21-3p και 1 στόχος για το hsa-miR-375). Αυτό πιθανώς σχετίζεται με έλλειψη δεδομένων από βιοψίες καρκίνου του προστάτη. Ως εκ τούτου, επιλέχθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός γονιδίων που σχετίζονται με το σύνολο των καρκινικών ιστών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Οι περισσότεροι από τους στόχους ήταν ειδικοί για τα miRNAs. Ωστόσο, 628 από τους 3048 στόχους (περίπου 20%) μοιράζονταν τουλάχιστον δύο miRNAs (Εικόνα 10). Οι επικαλύψεις γονιδίων και στόχων γονιδίων αξιολογήθηκαν με τη χρήση του συντελεστή ομοιότητας Jaccard, ο οποίος δίνεται από την αναλογία της τομής των δύο συνόλων προς στην ένωσή τους. Στη συνέχεια, αναλύσαμε το υποσύνολο των 628 γονιδίων για συγκεκριμένους λειτουργικούς εμπλουτισμούς. Το gProfiler(241) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της σημαντικότητας του εμπλουτισμού για τη Γονιδιακή Οντολογία (Gene Ontology - GO) και για τις Βιολογικές Οδούς (Biological Pathways - BP) όπως καταρτίστηκε από την Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Η ανάλυση αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Protein-Protein

Interaction - PPI) πραγματοποιήθηκε με τη βάση δεδομένων STRING (STRING-DB; <https://string-db.org/>).⁽²⁴²⁾ Η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε με το σύμπλεγμα Markov (Markov cluster - MCL) όπως υλοποιήθηκε από το STRING-DB.



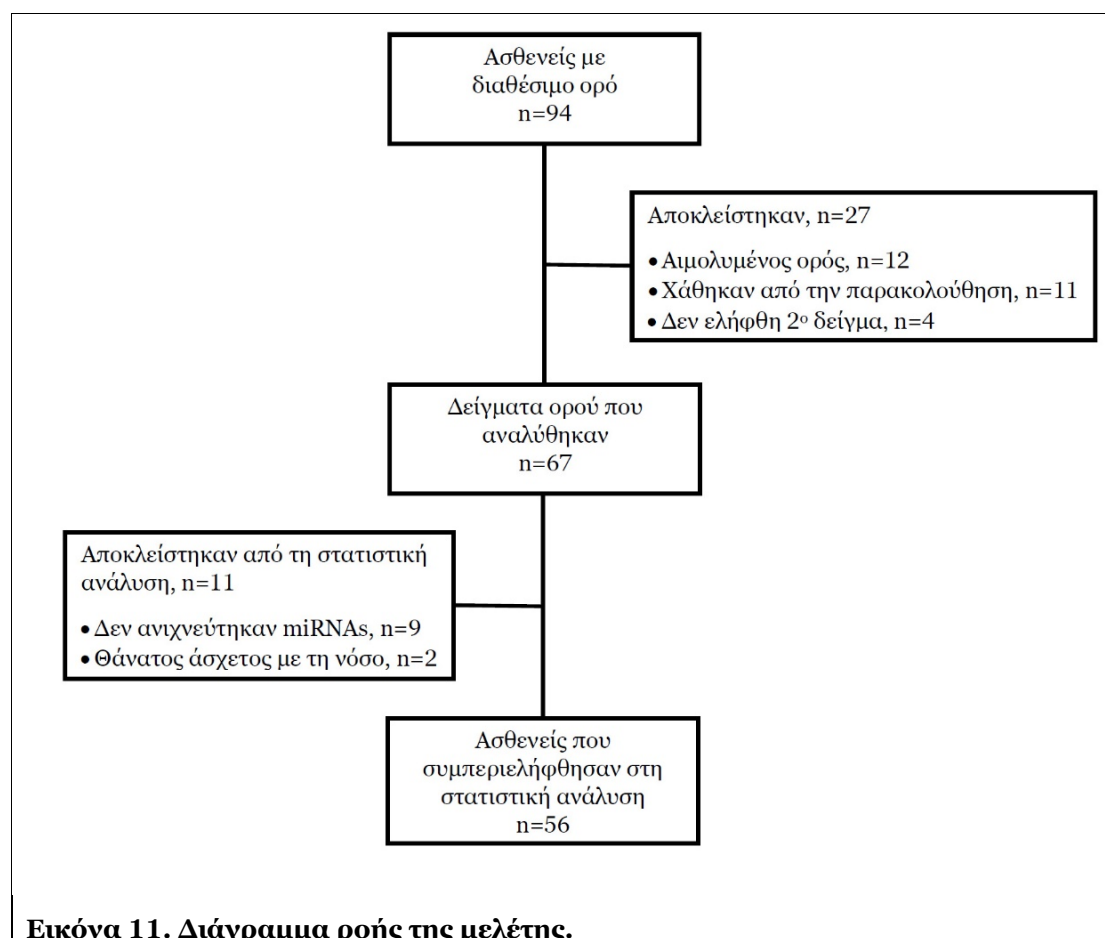
2.2. Αποτελέσματα

2.2.1. Σχεδιασμός μελέτης και χαρακτηριστικά των ασθενών

Το διάγραμμα ροής της μελέτης φαίνονται στην Εικόνα 11 και ο Πίνακας 10 απεικονίζει τα χαρακτηριστικά των ασθενών. Αρχικά 94 ασθενείς εντάχθηκαν στη μελέτη. Από αυτούς αποκλείστηκαν 27 (12 λόγω αιμολυμένου ορού, 11 οι οποίοι χάθηκαν στην παρακολούθηση και σε 4 ασθενείς δεν υπήρξε 2^ο δείγμα αίματος. Έτσι, αναλύθηκαν δείγματα από 67 ασθενείς. Στους 9 από αυτούς δεν ανιχνεύθηκε κάποιο από τα 4 miRNAs ενώ 2 ασθενείς απεβίωσαν λίγο μετά το πέρας της ακτινοθεραπείας από αιτία άσχετη με τη νόσο. Οι 11 αυτοί ασθενείς αποκλείστηκαν από τη στατιστική ανάλυση.

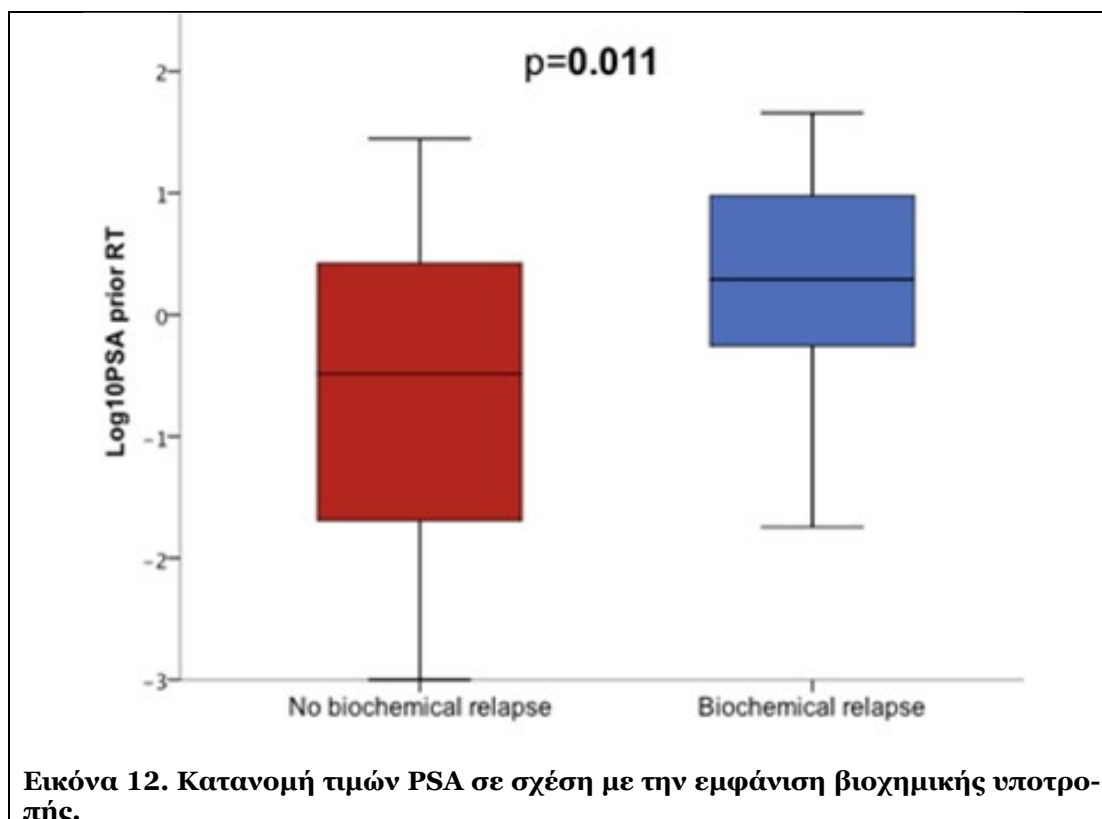
Πίνακας 10. Χαρακτηριστικά των ασθενών		
Χαρακτηριστικά	Σύνολο ασθενών	
	N	%
Αριθμός ασθενών	56	
Ηλικία (έτη)		
Διάμεση τιμή (εύρος)	71 (51-86)	
PSA πριν από την ακτινοθεραπεία		
Διάμεση τιμή (εύρος)	0.5 (0-45,56)	
Gleason score		
6	2	3,6
7	27	48,2
8-10	27	48,2
Δόση ακτινοθεραπείας (Gy)		
Διάμεση τιμή (εύρος)	69 (63-72)	
Ομάδες κινδύνου		
Χαμηλή	0	0
Ενδιάμεση	9	16,1
Υψηλή	47	83,9
Ριζική προστατεκτομή		
Όχι	17	30,4
Ναι	39	69,6
Είδος εκτομής		
R0	18	46,1
R1	21	53,8
R2	0	0
Βιοχημική υλοτροπή μετά την προστατεκτομή		
Όχι	19	48,7
Ναι	20	51,3
Λόγος χορήγησης ακτινοθεραπείας		
Συμπληρωματικά μετά από R1 εκτομή	19	33,9
Ριζική θεραπεία (μονοθεραπεία)	17	30,4
Θεραπεία διάσωσης λόγω αύξησης PSA μετά την επέμβαση	20	35,7
Λήψη ορμονοθεραπείας κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας		
Ναι	37	66,1
Όχι	19	33,9
Εξωπροστατική επέκταση		
Ναι	31	55,3
Όχι	13	23,2
Ανυπαρξία δεδομένων	12	21,4
Περινευριδιακή διήθηση		
Ναι	24	42,8
Όχι	15	26,7
Ανυπαρξία δεδομένων	17	30,3
Διήθηση σπερματοδόχων κύστεων		
Ναι	18	32,2
Όχι	25	44,6
Ανυπαρξία δεδομένων	13	23,2
Διήθηση λεμφαδένων		
Ναι	6	10,7
Όχι	36	64,3
Ανυπαρξία δεδομένων	14	25,0
Βιοχημική υλοτροπή μετά την ακτινοθεραπεία		
Ναι	15	26,8
Όχι	41	73,2
Θάνατος		
Ναι	9	16,1
Όχι	47	83,9

Η διάμεση ηλικία των 56 ασθενών που απέμειναν στην ανάλυση ήταν τα 71 έτη με εύρος από 51 έως και 86 έτη. Η διάμεση τιμή του PSA πριν από την έναρξη της ακτινοθεραπείας ήταν 0,5ng/dl (εύρος: 0-45,56ng/dl) για το σύνολο των ασθενών. Στους χειρουργημένους ασθενείς η διάμεση τιμή του PSA ήταν 0,165ng/dl (εύρος: 0-15,796ng/dl), ενώ στους ανεγχείρητους αντίστοιχα ήταν 4,617ng/dl (εύρος: 0,268-45,557ng/dl). Το Gleason score ήταν 6 σε 2 ασθενείς (3,6%), 7 σε 27 ασθενείς (48,1%) και 8-10 επίσης σε 27 ασθενείς (48,1%). Όταν έγινε η στατιστική ανάλυση η διάμεση τιμή της επιβίωσης ελεύθερης υποτροπής (RFS) και της ολικής επιβίωσης (OS) δεν είχε ακόμα επιτευχθεί. Μετά από διάστημα παρακολούθησης με διάμεση τιμή τα 4,8 έτη, 15 ασθενείς (26,8%) εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή (BR) και 9 (16,1%) απεβίωσαν.



Η τιμή του PSA πριν από την ακτινοθεραπεία ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς που εμφάνισαν τελικά βιοχημική υποτροπή σε σχέση με αυτούς που δεν εμφάνισαν (Εικόνα 12, Mann Whitney U test, $p=0,011$). Η επιβίωση ελεύθερη υποτροπής (RFS) ορίστηκε ως το χρονικό διάστημα από την έναρξη της

ακτινοθεραπείας μέχρι την εμφάνιση βιοχημικής υποτροπής ή το θάνατο. Η ολική επιβίωση (OS) ορίστηκε ως το χρονικό διάστημα από την έναρξη της ακτινοθεραπείας ως το θάνατο. Για τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν πρόοδο νόσου ή ήταν εν ζωή, τα δεδομένα για την RFS και την OS περικόπηκαν στον χρόνο της τελευταίας παρακολούθησης αντίστοιχα.

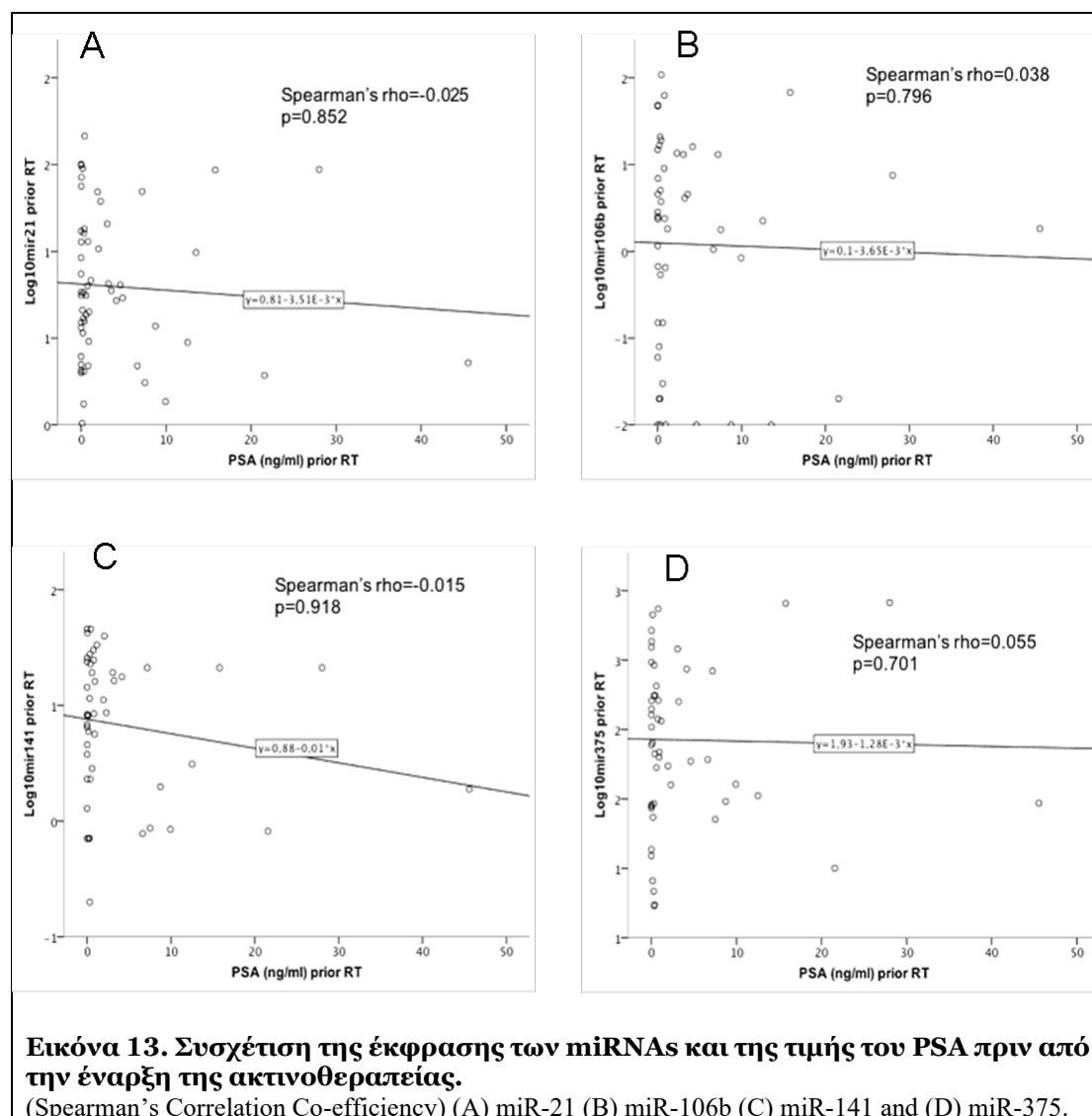


Εικόνα 12. Κατανομή τιμών PSA σε σχέση με την εμφάνιση βιοχημικής υποτροπής.

2.2.2. Στατιστικές συσχετίσεις της έκφρασης των miRNAs

Δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις ανάμεσα στην έκφραση των miRNAs και των επιπέδων του PSA πριν από την έναρξη της ακτινοθεραπείας (Εικόνα 13). Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-106b πριν από την έναρξη της ακτινοθεραπείας συσχετίστηκαν με την ύπαρξη εξωκαψικής επέκτασης της νόσου και τη διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων (Mann Whitney U test, $p=0,031$ και $p=0,044$, αντίστοιχα, Εικόνα 14 και Πίνακας 11). Δεν παρατηρήθηκαν άλλες σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των miRNAs πριν από την έναρξη της ακτινοθεραπείας και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά (Mann-Whitney U test, $p>0,05$). Δεν παρατηρήθηκαν, επίσης, σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των miRNAs πριν και μετά την ακτινοθεραπεία με το Wilcoxon test (Εικόνα 15). Όμως παρατηρήθηκαν σημαντικές

συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης διαφορετικών miRNAs πριν από και μετά την ακτινοθεραπεία (Πίνακας 12). Ισχυρή συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στην έκφραση του miR-21 με την έκφραση των miR-141 και miR-375 τόσο πριν από την ακτινοθεραπεία (Spearman's Rho 0,764, $p < 0.001$ και



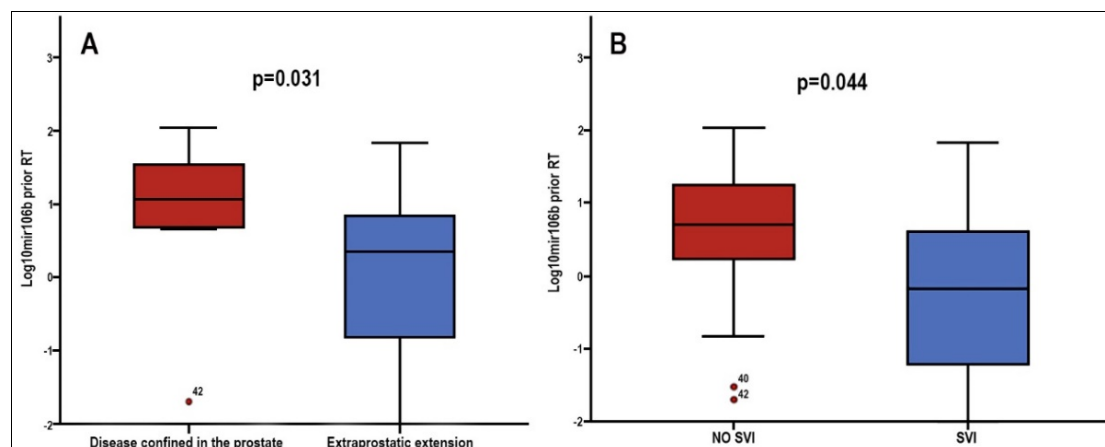
Πίνακας 11. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs με κλινικές παραμέτρους.

Αλεικονίζονται οι τιμές p

	miR-21	miR-106b	miR-141	miR-375
Εξωπροστατική επέκταση	0,969	0,031*	0,122	0,837
PNI	0,194	0,484	0,899	0,470
SVI	0,228	0,044*	0,558	0,318
Διήθηση LN	0,746	0,175	0,983	0,834
BR πριν την ΑΚΘ	0,182	0,848	0,960	0,279
BR μετά την ΑΚΘ	0,554	0,937	0,816	0,449

SVI: διήθηση σπερματοδόχων κύστεων, PNI: περινευριδιακές διηθήσεις, LN: λεμφαδένας, BR: βιοχημική υποτροπή, ΑΚΘ: ακτινοθεραπεία. Mann-Whitney U test, * $p \leq 0,05$

Spearman's Rho 0,699; $p < 0,001$, αντίστοιχα) όσο και μετά την ακτινοθεραπεία (Spearman's Rho 0,752, $p < 0,001$ και Spearman's Rho 0,690, $p < 0,001$, αντίστοιχα). Επιπλέον, ισχυρή συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στην έκφραση των miR-141 και miR-375 επίσης τόσο πριν από την ακτινοθεραπεία (Spearman's Rho 0,807, $p < 0,001$) όσο και μετά την ακτινοθεραπεία (Spearman's Rho 0,844, $p < 0,001$) (Πίνακας 12).

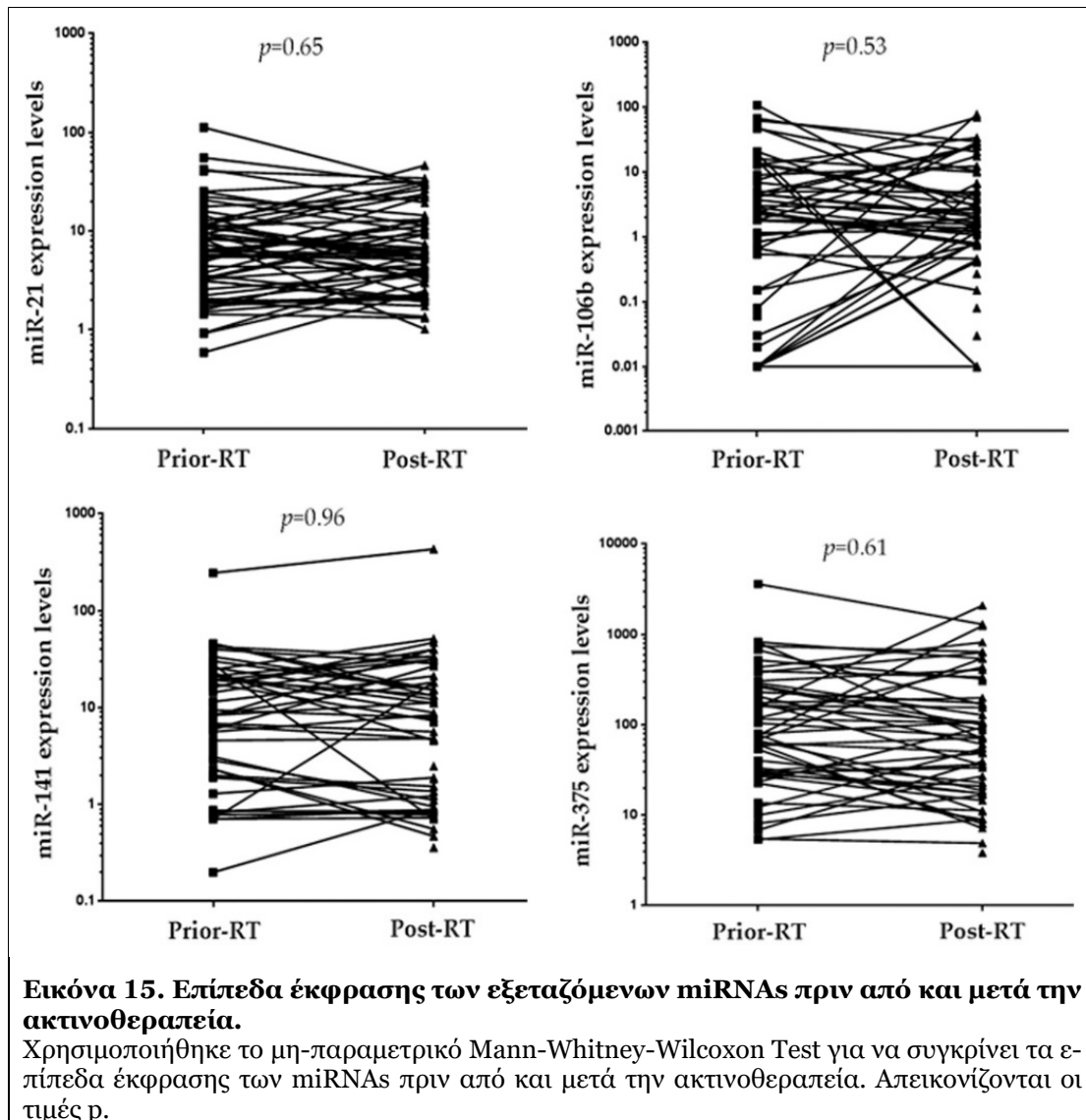


Εικόνα 14. Έκφραση του miR-106b πριν από την ακτινοθεραπεία σε σχέση με (A) την εξωπροστατική επέκταση και (B) τη διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων.

Χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney Test για να προσδιορίσει στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στα Box Plots η οριζόντια γραμμή απεικονίζει τη διάμεση τιμή και το μήκος των Boxes αναπαριστά το διατημηματικό εύρος των ποσοστών 25%-75%. Επιδεικνύονται και οι τιμές p.

Πίνακας 12. Συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των τεσσάρων miRNAs

Πριν από την ακτινοθεραπεία				
	miR-21	miR-106	miR-141	miR-375
miR-21	1			
miR-106	0,414*	1		
miR-141	0,764**	0,518**	1	
miR-375	0,699**	0,404*	0,807**	1
Μετά την ακτινοθεραπεία				
miR-21	1			
miR-106	0,373*	1		
miR-141	0,752**	0,414*	1	
miR-375	0,690**	0,397*	0,844**	1
p<0,01*, p<0,001**				



Εικόνα 15. Επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων miRNAs πριν από και μετά την ακτινοθεραπεία.

Χρησιμοποιήθηκε το μη-παραμετρικό Mann-Whitney-Wilcoxon Test για να συγκρίνει τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs πριν από και μετά την ακτινοθεραπεία. Απεικονίζονται οι τιμές p.

2.2.3. Έκφραση των miRNAs και κλινική έκβαση νόσου

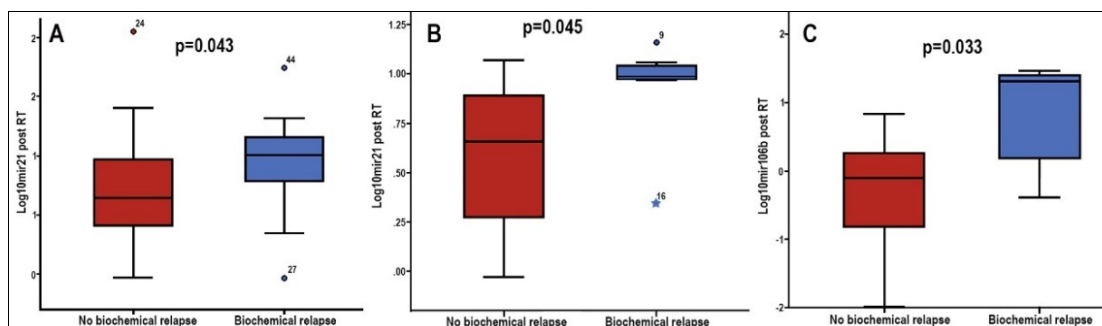
Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του εξετασθέντων miRNAs πριν από και μετά την ακτινοθεραπεία και τη βιοχημική υποτροπή σε ολόκληρη την ομάδα των ασθενών. Στην υποομάδα των ασθενών υψηλού κινδύνου όμως (n=47), οι ασθενείς που εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή μετά την ακτινοθεραπεία είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-21 μετά την ακτινοθεραπεία σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν υποτροπή (p=0,043) (Πίνακας 13 και Εικόνα 16A). Επίσης, στην υποομάδα ασθενών που έλαβαν ακτινοθεραπεία διάσωσης (n=20) υψηλότερα επίπεδα έκφρασης μετά την ακτινοθεραπεία των miR-21 και miR-106 παρατηρήθηκαν σε ασθενείς που εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή συγκρινόμενοι με

αυτούς που δεν εμφάνισαν υποτροπή ($p=0,043$ και $p=0,032$, αντίστοιχα) (Πίνακας 13 και Εικόνα 16B και C). Δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των miRNAs και του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (RFS). Όμως, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 πριν από την ακτινοθεραπεία και του miR-106b μετά την ακτινοθεραπεία συσχετίστηκαν με σημαντικά μειωμένη ολική επιβίωση (OS) ($p=0,049$ και $p=0,050$, αντίστοιχα, Εικόνα 17). Δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις ανάμεσα στα άλλα δύο miRNAs και την ολική επιβίωση.

Πίνακας 13. Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης των miRNAs με την βιοχημική υποτροπή μετά την ΑΚΘ στις ομάδες υψηλού κινδύνου και ΑΚΘ διάσωσης.

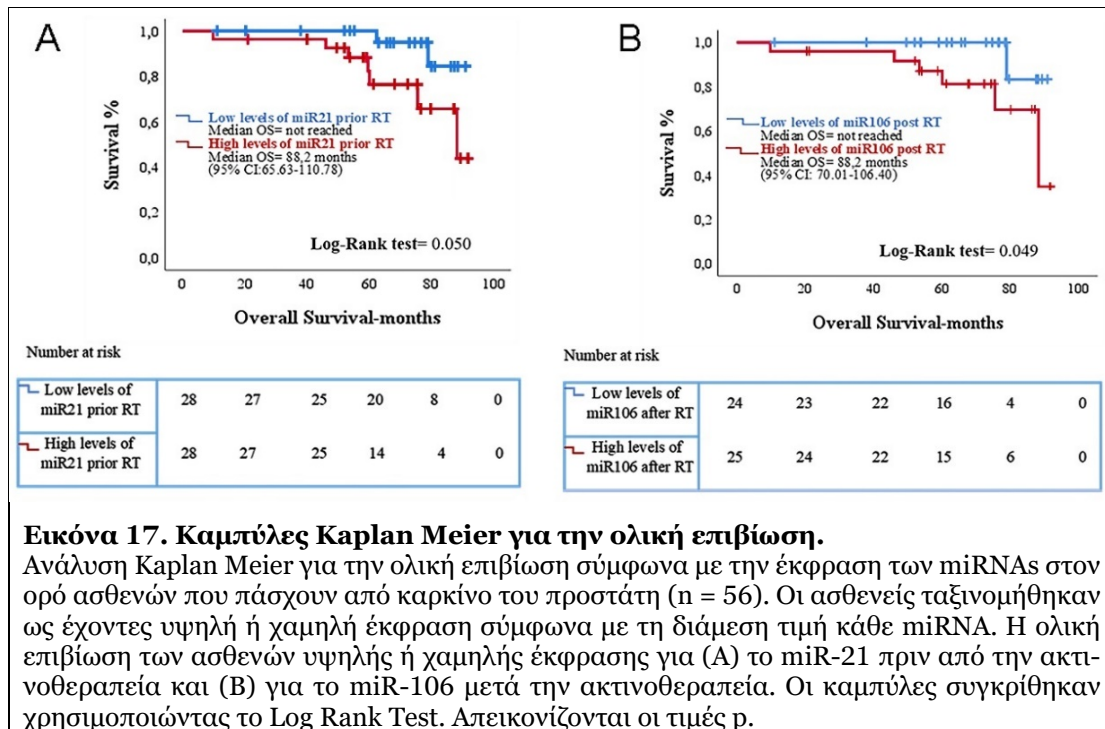
miR-21		miR-106b		miR-141		miR-375	
Προ ΑΚΘ	Μετά ΑΚΘ	Προ ΑΚΘ	Μετά ΑΚΘ	Προ ΑΚΘ	Μετά ΑΚΘ	Προ ΑΚΘ	Μετά ΑΚΘ
Ομάδα υψηλού κινδύνου (n=47)							
0,334	0,043*	0,841	0,444	0,678	0,119	0,279	0,147
Ομάδα ακτινοθεραπείας διάσωσης (n=20)							
0,866	0,045*	0,526	0,033*	0,928	0,190	0,499	0,128

ΑΚΘ: ακτινοθεραπεία, Mann-Whitney U test, * $p<0.05$



Εικόνα 16. Διαφορική έκφραση των miR-21 και miR-106b σε υποομάδες ασθενών.

Mann-Whitney Test που απεικονίζει τις διαφορές έκφρασης (A) του miR-21 μετά την ακτινοθεραπεία στην υποομάδα ασθενών υψηλού κινδύνου ανάμεσα σε εκείνους που εμφάνισαν ή όχι βιοχημική υποτροπή, (B) του miR21 και (C) του miR-106b μετά την ακτινοθεραπεία, στην υποομάδα ασθενών που έλαβαν ακτινοθεραπεία διάσωσης ανάμεσα σε εκείνους που εμφάνισαν ή όχι βιοχημική υποτροπή.



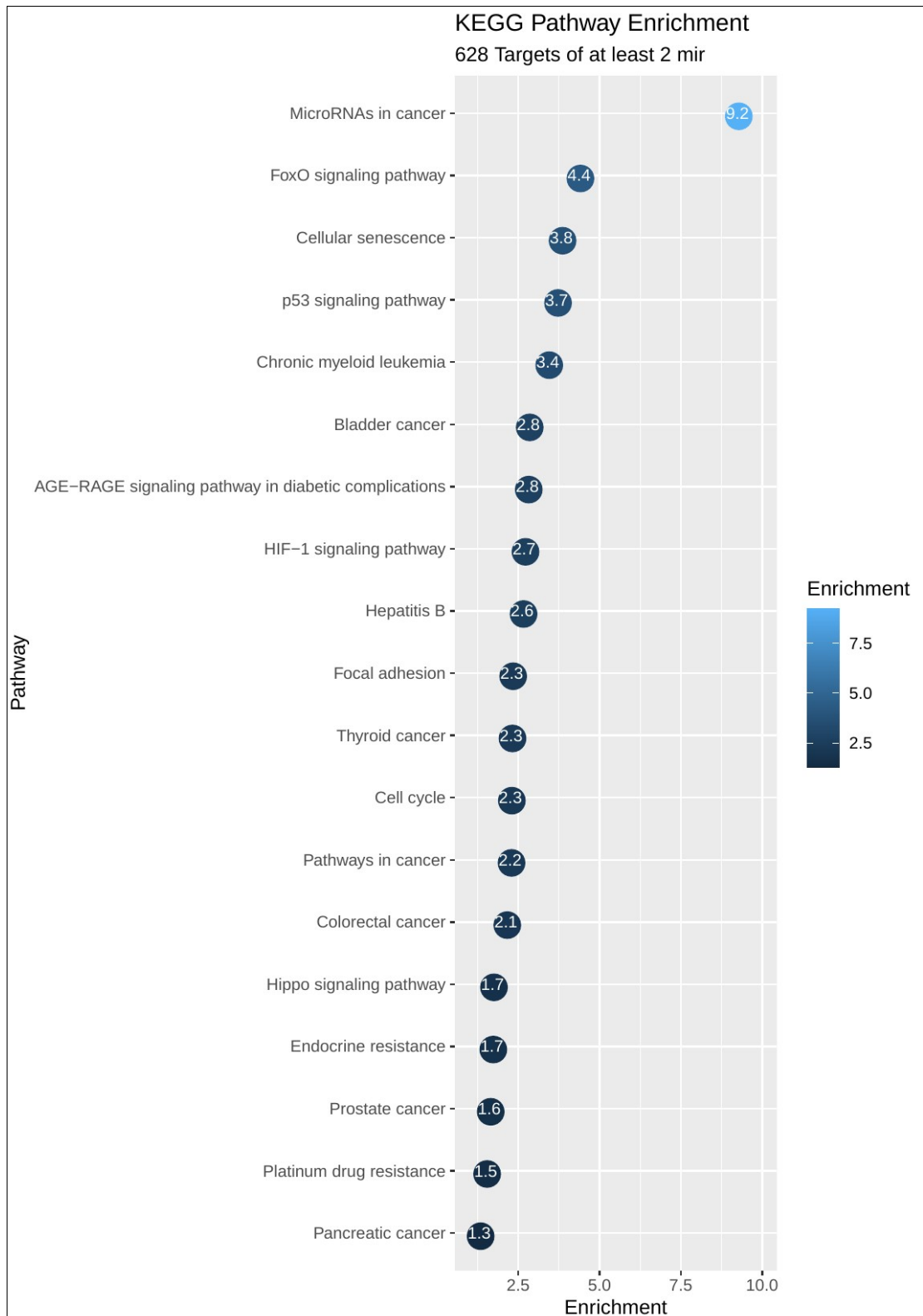
2.2.4. Ανάλυση στόχων και οδών εμπλουτισμού των mRNAs

Η ανάλυση σύμφωνα με την KEGG των οδών από 628 γονίδια τα οποία είναι κοινοί στόχοι για τουλάχιστον δύο miRNAs αποκάλυψε ισχυρή λειτουργική συσχέτιση με έναν αριθμό από καρκίνους, ανάμεσά τους και ο καρκίνος του προστάτη, όπως επίσης και με γενική απορρύθμιση των miRNAs στους καρκίνους. Ο Πίνακας 14 και η Εικόνα 18 παρουσιάζουν τις κορυφαίες 19 πιο εμπλουτισμένες, μη περιττές βιολογικές διεργασίες που ταξινομούνται σύμφωνα με μια προσαρμοσμένη τιμή p. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι οδοί που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA, όπως η σηματοδότηση FoxO, p53 και Hippo, οι οποίες εμπλουτίστηκαν σημαντικά (Εικόνα 18 και Πίνακας 14). Σε μια προσπάθεια να απεικονίσουμε τις σχέσεις μεταξύ των γονιδίων κωδικοποίησης πρωτεΐνης που στοχεύουν τα διαφορετικά miRNAs, βρήκαμε το υποσύνολο γονιδίων που εμπλουτίστηκαν σε τουλάχιστον μία διαδρομή KEGG (Πίνακας 14) και δημιουργήσαμε το δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με τη χρήση της βάσης δεδομένων STRING-DB. Το δίκτυο αποτελούμενο από 90 γονίδια φαίνεται στην Εικόνα 19. Μια μικρή τάση για κοινή εμφάνιση στόχων των hsa-miR-21 και hsa-miR-106b είναι ορατή στο δίκτυο (μπλε-πορτοκαλί συνδετικές άκρες, αντίστοιχα, Εικόνα 19) και επίσης ποσοτικοποιήθηκε σε αυξημένη ομοιότητα Jaccard για τον συγκεκριμένο συνδυασμό (Πίνακας 15).

Πίνακας 14. Ανάλυση οδών εμπλουτισμού σύμφωνα με την KEGG

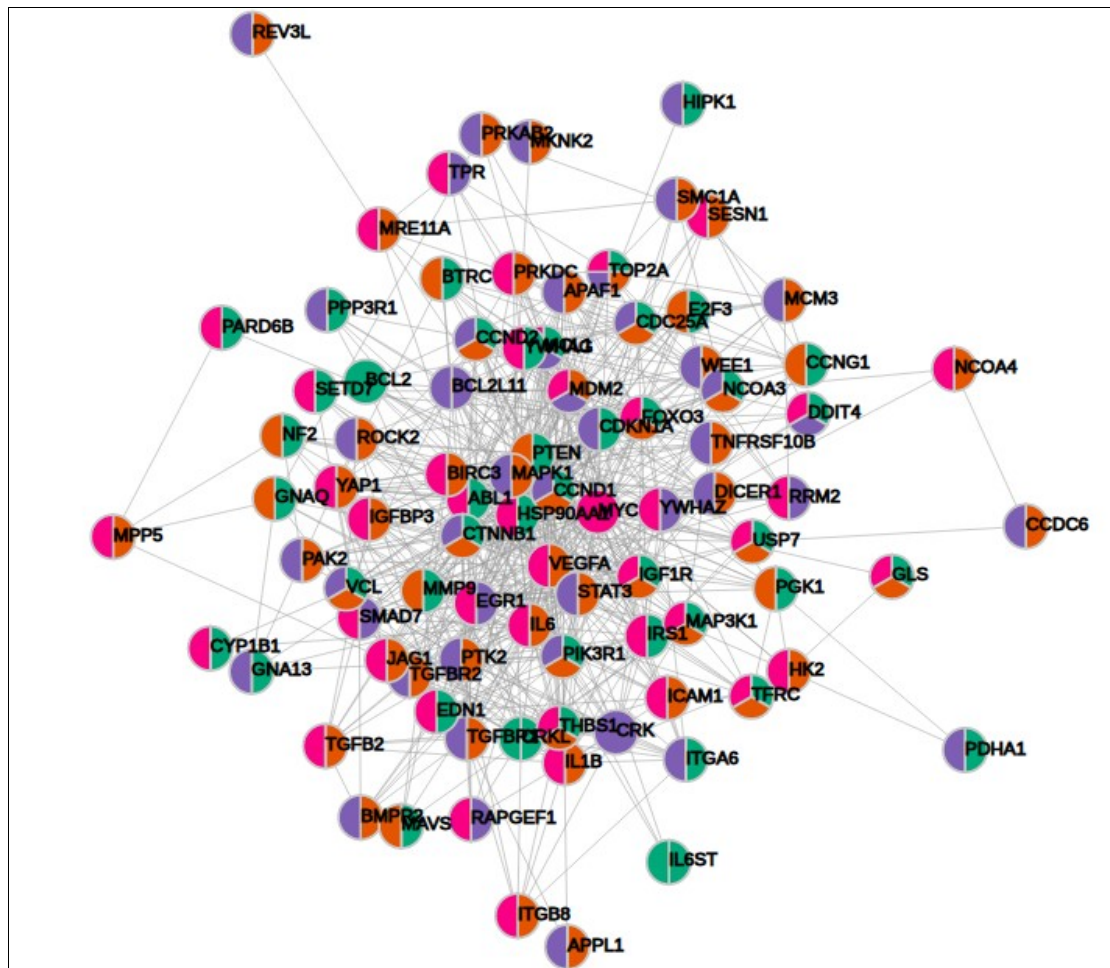
Ανάλυση σύμφωνα με την KEGG των οδών εμπλουτισμού για την ομάδα των 628 γονιδιακών στόχων που προέρχονται από τουλάχιστον δύο miRNAs

Pathway	Enrichment p-value	Genes
MicroRNAs in cancer	5.75e-10	TGFB2, ABL1, CRKL, MAPK1, DICER1, MMP9, CCND1, E2F3, VEGFA, CCNG1, GLS, CCND2, CDKN1A, MDM2, MYC, THBS1, CYP1B1, MCL1, BCL2L11, CDC25A, CRK, DDIT4, STAT3, IRS1, BCL2, PTEN, BMPR2
FoxO signaling pathway	4.24e-05	TGFB2, MAPK1, TGFBR1, CCND1, FOXO3, CCND2, CDKN1A, PRKAB2, MDM2, IL6, IGF1R, SETD7, PIK3R1, BCL2L11, TGFBR2, STAT3, IRS1, PTEN, USP7
Cellular senescence	0.000151	MRE11A, TGFB2, MAPK1, TGFBR1, CCND1, E2F3, FOXO3, CCND2, CDKN1A, MDM2, IL6, MYC, PIK3R1, IGFBP3, HIPK1, TGFBR2, CDC25A, BTRC, PTEN, PPP3R1
p53 signaling pathway	0.000208	SESN1, CCND1, CCNG1, CCND2, APAF1, TNFRSF10B, CDKN1A, MDM2, THBS1, IGFBP3, BCL2, RRM2, PTEN
Chronic myeloid leukemia	0.000393	TGFB2, ABL1, CRKL, MAPK1, TGFBR1, CCND1, E2F3, CDKN1A, MDM2, MYC, PIK3R1, TGFBR2, CRK
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0.00166	EDN1, ICAM1, TGFB2, MAPK1, TGFBR1, CCND1, VEGFA, EGR1, IL1B, IL6, PIK3R1, TGFBR2, STAT3, BCL2
Bladder cancer	0.00156	MAPK1, MMP9, CCND1, E2F3, VEGFA, CDKN1A, MDM2, MYC, THBS1
HIF-1 signaling pathway	0.00209	TFRC, EDN1, MKNK2, MAPK1, PGK1, VEGFA, CDKN1A, PDHA1, IL6, IGF1R, PIK3R1, HK2, STAT3, BCL2
Hepatitis B	0.0024	MAVS, TGFB2, MAP3K1, MAPK1, MMP9, TGFBR1, CCND1, E2F3, APAF1, CDKN1A, IL6, MYC, PIK3R1, YWHAZ, STAT3, BCL2, PTEN
Focal adhesion	0.00499	BIRC3, VCL, ITGA6, CRKL, MAPK1, ITGB8, RAPGEF1, CCND1, VEGFA, CCND2, ROCK2, THBS1, IGF1R, PIK3R1, CRK, CTNNB1, PTK2, BCL2, PTEN, PAK2
Thyroid cancer	0.00527	TPR, MAPK1, CCDC6, CCND1, CDKN1A, MYC, CTNNB1, NCOA4
Cell cycle	0.00548	SMC1A, TGFB2, ABL1, CCND1, MCM3, E2F3, CCND2, CDKN1A, MDM2, MYC, CDC25A, YWHAZ, WEE1, YWHAG, PRKDC
Pathways in cancer	0.00559	BIRC3, TPR, HSP90AA1, ITGA6, TGFB2, ABL1, CRKL, MAPK1, MMP9, JAG1, TGFBR1, CCDC6, CCND1, E2F3, VEGFA, CCND2, GNA13, APAF1, NCOA3, CDKN1A, ROCK2, IL6ST, MDM2, IL6, MYC, IGF1R, PIK3R1, BCL2L11, GNAQ, APPL1, TGFBR2, CRK, CTNNB1, STAT3, PTK2, BCL2, PTEN, NCOA4
Colorectal cancer	0.00768	TGFB2, MAPK1, TGFBR1, CCND1, CDKN1A, MYC, PIK3R1, BCL2L11, APPL1, TGFBR2, CTNNB1, BCL2
Hippo signaling pathway	0.0195	MPP5, TGFB2, SMAD7, TGFBR1, CCND1, CCND2, PARD6B, MYC, YAP1, TGFBR2, YWHAZ, BTRC, CTNNB1, YWHAG, NF2, BMPR2
Endocrine resistance	0.0203	MAPK1, MMP9, JAG1, CCND1, E2F3, NCOA3, CDKN1A, MDM2, IGF1R, PIK3R1, PTK2, BCL2
Prostate cancer	0.0248	HSP90AA1, MAPK1, MMP9, CCND1, E2F3, CDKN1A, MDM2, IGF1R, PIK3R1, CTNNB1, BCL2, PTEN
Platinum drug resistance	0.0318	REV3L, BIRC3, MAPK1, APAF1, CDKN1A, TOP2A, MDM2, SLC31A1, PIK3R1, BCL2
Pancreatic cancer	0.0496	TGFB2, MAPK1, TGFBR1, CCND1, E2F3, VEGFA, CDKN1A, PIK3R1, TGFBR2, STAT3



Εικόνα 18. Σχέδιο λειτουργικού εμπλουτισμού για την ομάδα των 628 γονιδίων που στοχεύονται από τουλάχιστον δύο miRNAs.

Επιδεικνύονται οδοί που είναι σημαντικά εμπλουτισμένες και σχετίζονται με τον καρκίνο του προστάτη, κυτταρικές λειτουργίες, απορρύθμιση των miRNAs και επιδιόρθωση του DNA. Κάθε φυσαλίδα στο σχέδιο αναπαριστά έναν όρο και περιλαμβάνει τη σημαντικότητα του εμπλουτισμού ως $-\log_{10}(p\text{-value})$.



Εικόνα 19. Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης 90 γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και στοχεύονται από τουλάχιστον δύο miRNAs σε σημαντικό εμπλουτισμό KEGG. Τα χρώματα αντιστοιχούν στα miRNAs (Μπλε: hsa-miR-21, Πορτοκαλί: hsa-miR-106b, Πράσινο: hsa-miR-141 και Ματζέντα: hsa-miR-375)

Πίνακας 15. Jaccard Index

Κοινοί στόχοι γονιδίων-πρωτεΐνης με εμπλουτισμό οδού μεταξύ miRNAs υπολογισμένοι ως δείκτης Jaccard (2*τομή/ένωση)

miR (total genes)	hsa-miR-141 (45)	hsa-miR-21 (62)	hsa-miR-106b (47)	hsa-miR-375 (43)
hsa-miR-141		0,633	0,479	0,529
hsa-miR-21			0,717	0,633
hsa-miR-106b				0,286

2.3. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης τεσσάρων miRNAs στον ορό ασθενών πασχόντων από καρκίνο προστάτη πριν από και μετά την ακτινοθεραπεία και εκτιμήσαμε την προγνωστική τους αξία. Βρήκαμε ότι χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-106b πριν από την ακτινοθεραπεία σχετίζονταν με τοπικά προχωρημένη νόσο, δηλαδή με εξωπροστατική επέκταση και διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων. Επίσης, ασθενείς της ομάδας υψηλού κινδύνου οι οποίοι εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-21 μετά την ακτινοθεραπεία. Επιπλέον, στην υποομάδα ασθενών που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία διάσωσης, όσοι εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των miR21 και miR106b σε σύγκριση με όσους δεν εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή. Όμως περισσότερο σημαντική ήταν η συσχέτιση των υψηλών επιπέδων έκφρασης του miR-21 πριν από την ακτινοθεραπεία και του miR-106b μετά την ακτινοθεραπεία με τη μείωση της ολικής επιβίωσης στο σύνολο των ασθενών. Τέλος, η βιοπληροφορική ανάλυση των mRNA-στόχων αποκάλυψε ενδιαφέρουσες συσχετίσεις συνδεόμενες και με οδούς επιδιόρθωσης του DNA με τα εξεταζόμενα miRNAs.

Το miR-21 είναι ένα γνωστό oncomir με ρυθμιστικούς ρόλους που αφορούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση, την επιθηλιακή – μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) και τη χημειοαντοχή.(243) Το miR-21 προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που προκαλείται από τα ανδρογόνα. Ορμονοευαίσθητοι όγκοι του προστάτη μπορούν να ξεφύγουν από την αναστολή ανάπτυξης που έχει προκαλέσει η ορμονοθεραπεία και να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται.(180, 244) Επίσης, το miR-21 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη στοχεύοντας την PTEN(245) ενώ, ρυθμίζοντας την MARCKS προάγει την αντίσταση στην απόπτωση και τη διήθηση.(183)

Το miR-21 ανευρίσκεται συχνά υπερρυθμισμένο σε αρκετές νεοπλασίες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη,(246) για τον οποίο έχει προταθεί και ως δυνητικός βιοδείκτης.(243) Πιο συγκεκριμένα, η απορρύθμιση του κυκλοφορούντος miR-21 μπορεί να διακρίνει ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του προστάτη από φυσιολογικούς ενήλικες, όπως και την τοπική από τη

μεταστατική νόσο.(205) Επίσης, έχει προταθεί ως προβλεπτικός δείκτης της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας στον μεταστατικό ορμονοανθεκτικό καρκίνο.(181) Επιπλέον, η υπερρύθμιση της έκφρασης του miR-21 στους ιστούς είναι ένας ανεξάρτητος προβλεπτικός δείκτης της βιοχημικής υποτροπής στην 5ετία.(182) Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, ότι, δηλαδή, υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντος miR-21 πριν από την ακτινοθεραπεία σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά βιοχημικών υποτροπών στην υποομάδα υψηλού κινδύνου και σε εκείνους τους ασθενείς που έλαβαν ακτινοθεραπεία διάσωσης. Επίσης, δείξαμε για πρώτη φορά ότι υψηλά επίπεδα έκφρασης του κυκλοφορούντος miR-21 πριν από την ακτινοθεραπεία συνδέονται με μειωμένη ολική επιβίωση. Στη μοναδική ίσως μελέτη με δείγματα αίματος πριν από και μετά την ακτινοθεραπεία ασθενών για καρκίνο προστάτη, το miR-21 είχε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης μετά την ακτινοθεραπεία στην ομάδα ασθενών υψηλού κινδύνου σε σχέση με την ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου χωρίς να γίνεται αναφορά για την κλινική έκβαση των ασθενών.(226)

Το miR-106b είναι μέλος της συστάδας miR-106b-25, μέλη της οποίας είναι επίσης τα miR-25 και miR-93. Τα miRNAs αυτά συχνά απορρυθμίζονται σε αρκετές νεοπλασίες. Το miR-106b φαίνεται να παίζει διπλό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου, άλλοτε διεγείροντας -λειτουργώντας ως oncomiR- και άλλοτε καταστέλλοντας τους όγκους.(62) Η υπερέκφρασή του έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη διήθηση και μετανάστευση κυττάρων καρκίνου του θυρεοειδή,(247) ενώ έχει το αντίθετο αποτέλεσμα σε κύτταρα γαστρικού καρκίνου.(248) Έχει συνδεθεί με την πρόοδο νόσου και την πρόγνωση με όλες τις μείζονες νεοπλασίες, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού,(249) του λάρυγγα,(250) του πνεύμονα,(251) και του στομάχου.(252) Αντίθετα, στον ορθοκολικό καρκίνο πιθανώς να έχει κατασταλτικό ρόλο.(253)

Λόγω της υπερέκφρασής του στον καρκίνο του προστάτη, το miR-106b έχει προταθεί ως δυνητικός βιοδείκτης.(254-256) Έχει επίσης προταθεί και ως δυνητικά θεραπευτικός στόχος από μία ερευνητική ομάδα, η οποία βρήκε ότι η αντινεοπλασματική δράση της ουσίας προκυανιδίνης, που προέρχεται από τους πυρήνες (κουκούτσια) των σταφυλιών σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα, συντελείται μέσω της υπορρύθμισης του miR-106b.(257) Άλλοι ερευνητές πρόσθεσαν σε καλλιέργειες κυττάρων καρκίνου του προστάτη

εντερολακτόνη, μία λιγνάνη (είδος φυτοοιστρογόνου) των θηλαστικών με αντινεοπλασματικές ιδιότητες μεταξύ άλλων.(258) Παρατήρησαν ότι ολόκληρη η συστάδα του miR-106b υπορρυθμίστηκε, με αποτέλεσμα τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η μετφορμίνη επίσης, ένα αντιδιαβητικό φάρμακο με γνωστή αντινεοπλασματική δράση, προστιθέμενη σε καλλιέργειες κυττάρων PC-3 έχει παρατηρηθεί ότι υπορρυθμίζει αρκετά miRNAs, μεταξύ αυτών και το miR-106b.(259) Τα ευρήματα αυτά εγείρουν ερωτήματα αλλά ίσως και να προσφέρονται για απαντήσεις για το ρόλο των διαιτητικών παραγόντων και των βακτηρίων του εντέρου, το λεγόμενο μικροβίωμα, στην ανάπτυξη του καρκίνου.(260)

Στον καρκίνο του προστάτη, η πρόοδος και η έκβαση της νόσου έχει συσχετιστεί με την επίδραση του miR-106b στις οδούς της απόπτωσης και της προσκόλλησης των κυττάρων στους ιστούς, αν και οι ακριβείς υποκείμενοι μηχανισμοί δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι.(261, 262) Επίσης, προάγει των κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διήθηση των ιστών μειώνοντας τα επίπεδα της CIC.(263) Σε συνθήκες υποξίας αυξάνεται η έκφρασή του, η οποία έχει ως αποτέλεσμα έναν πιο επιθετικό φαινότυπο μέσω της υπορρύθμισης της REST.(261) Το miR-106b έχει επίσης δείχθει ότι υπερεκφράζεται σε μεταστατικούς ιστούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς, όπως και ότι συσχετίζεται με τις οστικές μεταστάσεις, μάλλον μέσω της επίδρασης στη σύνδεση στην εξωκυττάρια ουσία και ιδιαίτερα στο κολλαγόνο τύπου 4.

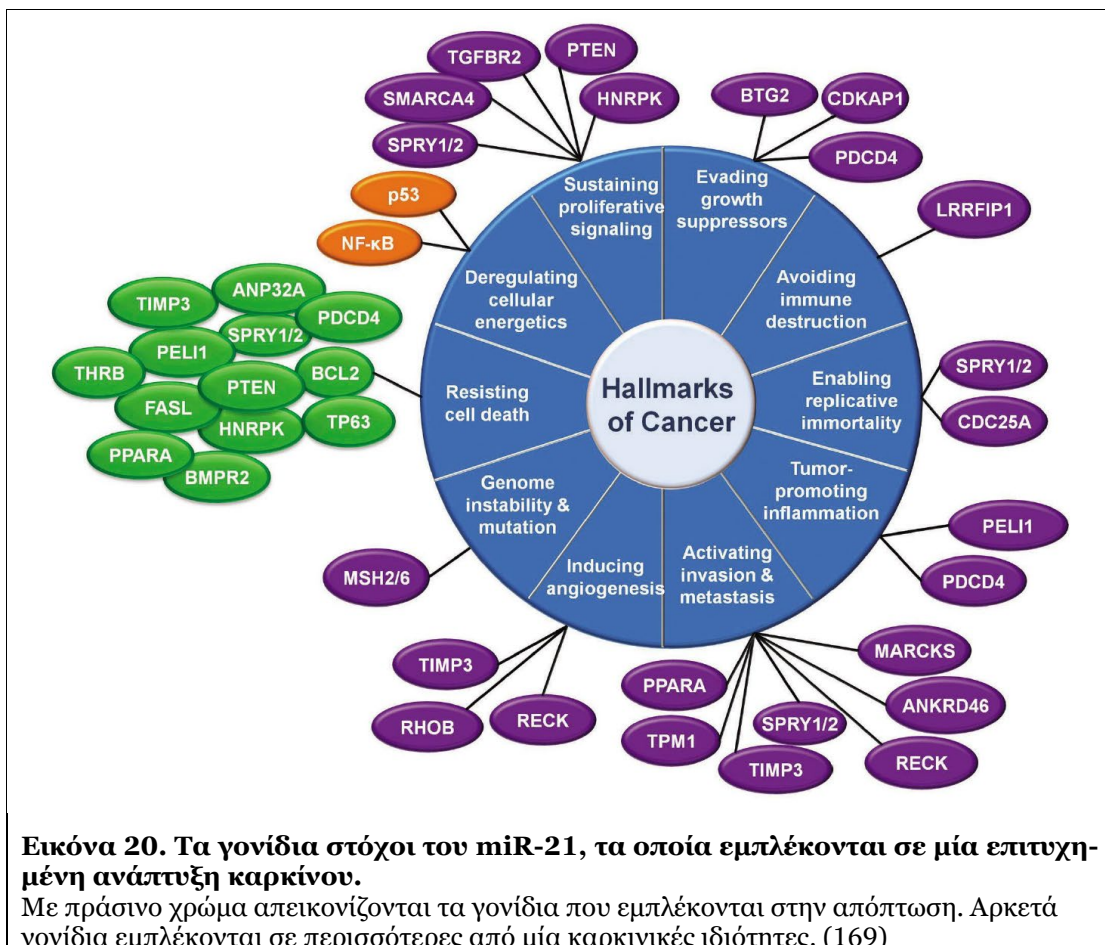
Σε ακτινοβολημένα κύτταρα καρκίνου του προστάτη το miR-106b αυξάνει την ακτινοαντοχή παρακάμπτοντας την αναστολή του κυτταρικού κύκλου που προκαλείται από την p21.(145) Παρόμοια αποτελέσματα έχουν επιβεβαιωθεί στον ορθοκολικό(264) και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.(265) Υπερέκφραση του miR-106b συνδέεται, επίσης, με αυξημένο κίνδυνο πρώιμης υποτροπής. (232) Συμφωνώντας με τα προηγούμενα ευρήματα, παρατηρήσαμε ότι υψηλότερα επίπεδα του miR-106b μετά την ακτινοθεραπεία συσχετίστηκαν με αυξημένα ποσοστά βιοχημικών υποτροπών στην υποομάδα ασθενών που έλαβαν ακτινοθεραπεία διάσωσης. Επιπλέον, βρήκαμε ότι υψηλότερα επίπεδα αυτού του miRNA μετά την ακτινοθεραπεία συσχετίστηκαν με μικρότερη ολική επιβίωση. Η συσχέτιση στη μελέτη μας των χαμηλών επιπέδων έκφρασης του miR-106b πριν από την ακτινοθεραπεία με την τοπικά προχωρημένη νόσο

πιθανώς να εξηγείται από το λιγότερο επιθετικό φαινότυπο αυτών των κυττάρων, με χαμηλότερο μεταστατικό δυναμικό, οπότε έχουν τον χρόνο και αναπτύσσονται περισσότερο τοπικά μέχρι να γίνει η διάγνωση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα όσον αφορά το ρόλο του miR-106b στα κλινικά δείγματα και γι' αυτό η προγνωστική του σημασία, η οποία για πρώτη φορά φάνηκε στη μελέτη μας, χρειάζεται επιπλέον εκτίμηση στον καρκίνο του προστάτη.

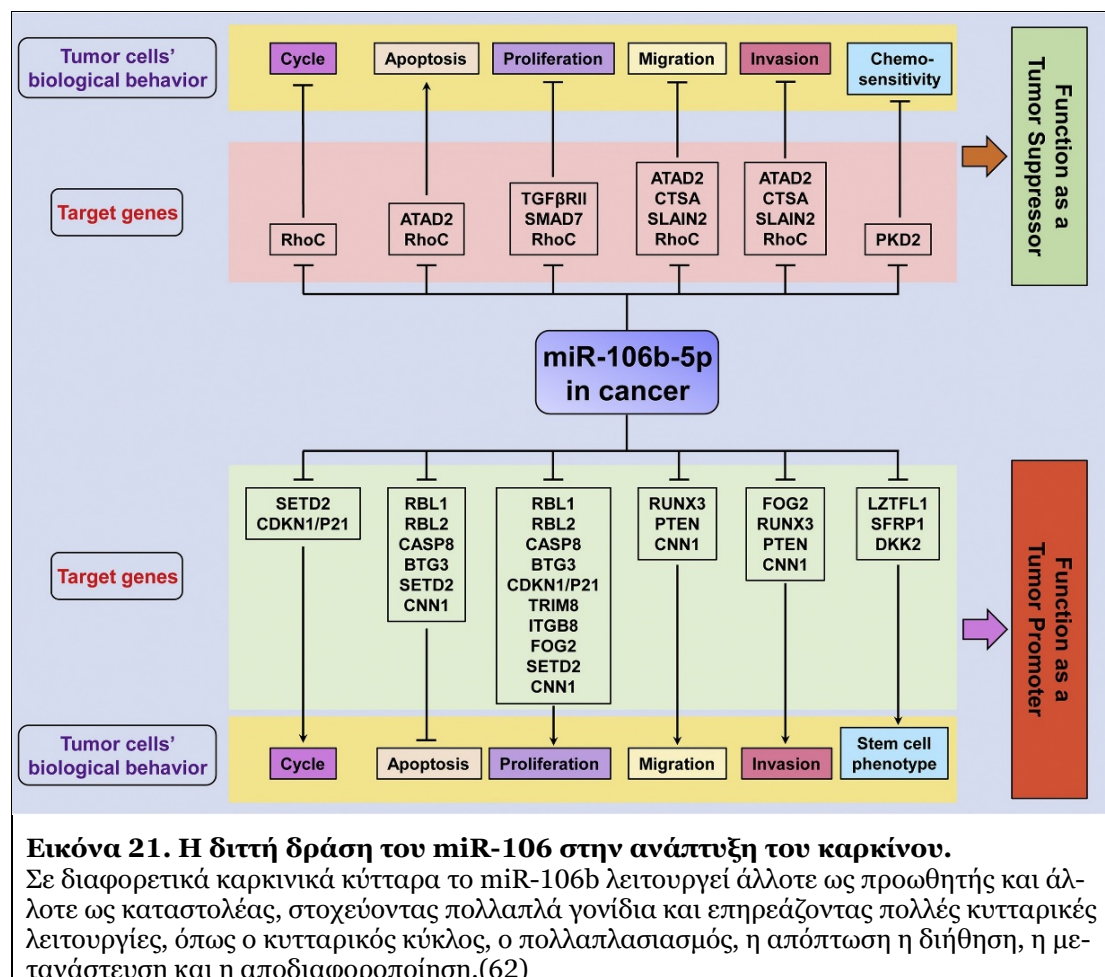
Το miR-141 επίσης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του προστάτη, στοχεύοντας γονίδια που ρυθμίζουν την απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιθηλιακή – μεσεγχυματική μετάβαση. (266) Ήταν ένα από τα πρώτα κυκλοφορούντα miRNAs που συνδέθηκε με την παθογένεση και τη φτωχή πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη. (267) Επιπλέον, και το miR-375 σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιθηλιακή – μεσεγχυματική μετάβαση στον καρκίνο του προστάτη. (267) Επίσης, διεγείρει την ανάπτυξη του όγκου, τη διήθηση των ιστών και παρεμποδίζει την απόπτωση. (267) Υψηλότερη έκφραση των miR-375 και miR-141 συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση, υψηλό Gleason score, θετικούς πυελικούς λεμφαδένες, αντοχή στην ορμονοθεραπεία και μεταστατική νόσο. (207) Στην παρούσα μελέτη υπήρχε ισχυρή συσχέτιση της έκφρασης αυτών των δύο miRNAs με αυτήν του miR-21, πιθανώς λόγω υποκείμενων κοινών μηχανισμών ρύθμισης. Παρόλα αυτά, και ενώ η υψηλή έκφραση του miR-141 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο βιοχημικής υποτροπής, (268) δε βρήκαμε σημαντική συσχέτιση αυτών με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ή την έκβαση της νόσου των ασθενών.

Η ανάλυση KEGG των οδών εμπλουτισμού αποκάλυψε 19 σημαντικά εμπλουτισμένες οδούς, οι οποίες κυρίως σχετίζονται με τον καρκίνο. Ανάμεσα σ' αυτές, οι σηματοδοτήσεις p53, FoxO και Hippo θεωρούνται ευρέως ότι συσχετίζονται με την επιδιόρθωση της βλάβης του DNA. (269-271) Είναι, επίσης, ενδιαφέρον ότι μείζονα ρυθμιστικά στοιχεία των ανωτέρω οδών, όπως τα MDM2, FOXO3 και YAP1 περιλαμβάνονται στα 90 γονίδια που ήταν εμπλουτισμένα σε τουλάχιστον μία οδό KEGG. Επιπλέον, η αυξημένη ομοιότητα Jaccard για κοινή εμφάνιση στόχων των miR-21 και miR-106b υποδηλώνει μία λειτουργική σύνδεση μεταξύ των δύο που σχετίζεται με την επιδιόρθωση της βλάβης του DNA.

Τα ευρήματα αυτά αποτελούν μία αλυσίδα από λογικούς συνδετικούς κρίκους ανάμεσα στην ακτινοβόληση των ασθενών και το τελικό ογκολογικό αποτέλεσμα. Η ακτινοθεραπεία προκαλεί βλάβες στο DNA των κυττάρων, με αποτέλεσμα να ενεργοποιηθούν οι ενδοκυττάριοι μηχανισμοί αποκατάστασης. Αν η κινητοποίηση των επιδιορθωτικών μηχανισμών είναι μεγαλύτερη, αποτελεσματικότερη ή το αποτέλεσμα της επιδιόρθωσης δεν ελέγχεται τόσο αυστηρά και παρακάμπτονται οι δικλείδες ασφαλείας, τότε τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, πιθανώς και με περισσότερο επιθετικά χαρακτηριστικά. Τελικό αποτέλεσμα είναι η αποτυχία της θεραπείας, εκφραζόμενη ως πρόοδος νόσου και μειωμένη ολική επιβίωση. Η έκφραση των miR-21 και miR-106b αποτυπώνει αυτή τη γονιδιακή κινητοποίηση, η οποία έπειτα μεταφράζεται σε κλινικό αποτέλεσμα. Ειδικά το πολυμελετημένο miR-21 έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται σε όλες τις ιδιότητες που είναι σηματοδοτικά μονοπάτια του καρκίνου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 20. Να σημειωθεί η ιδιαίτερη συσχέτισή του με τα γονίδια που εμπλέκονται στην απόπτωση και την πιθανή αύξηση της αντίστασης στον κυτταρικό θάνατο.



Αντίθετα, όπως έχει ήδη αναφερθεί για το miR-106b, ο ρόλος του δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Ο διπλός ρόλος που έχει στην ανάπτυξη των όγκων αποτυπώνεται στην Εικόνα 21 και ιδιαίτερα για τον καρκίνο του προστάτη τα δεδομένα είναι λίγα για να εξαγάγουμε ασφαλή συμπεράσματα.



Το μεγαλύτερο μέρος της γνώσης μας για το ρόλο των miRNAs στην απόκριση στην ακτινοβολία προέρχεται από μελέτες in vitro, με ελάχιστες μελέτες σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία. Μία από αυτές αφορά τον καρκίνο του μαστού, στην οποία μελετήθηκαν διάφορα miRNAs τόσο σε κυτταροκαλλιέργειες όσο και ως κυκλοφορούντα σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία. Μεταξύ άλλων, το miR-21 υπερρυθμίστηκε κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας ασθενών για καρκίνο του μαστού και συσχετίστηκε με αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες, όπως το ki-67 και τριπλά αρνητικό φαινότυπο.(272) Σε κύτταρα μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, το

mir-21 αυξάνει την ακτινοαντοχή είτε υπερρυθμίζοντας τον Hypoxia-Inducible Factor 1a,(273) είτε υπορυθμίζοντας την έκφραση των PTEN, SNX1, και SGPP1 και αυξάνοντας τη φωσφορυλίωση της AKT(274) ή ακόμα και αναστέλλοντας στην προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.(275) Αναστολή του mir-21 μείωσε την ακτινοαντοχή σε κύτταρα καρκίνου του οισοφάγου μέσω της ενεργοποίησης της PTEN(276). Το ίδιο αποτέλεσμα υπήρξε και σε κύτταρα κακοήθους γλοιώματος μέσω της αναστολής της οδού PI3K/AKT(277) ή της αύξησης της έκφρασης των PDCD4 and hMSH2.(278) Το miR-21 επίσης συνδέεται με την ακτινοαντοχή μέσω της επιδιόρθωσης των διασπάσεων διπλής αλύσου του DNA.(233, 279) Υπερέκφραση του mir-106b σε κύτταρα καρκίνου τραχήλου μήτρας είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη ακτινοευαισθησία ρυθμίζοντας αρνητικά το γονίδιο IER3.(265) Στην ίδια μελέτη, το μη κωδικοποιούν RNA GAS5 «εκκαθάρισε» το mir-106b, με αποτέλεσμα την αυξημένη ακτινοευαισθησία.

Απ' όσο γνωρίζουμε, αυτή η μελέτη είναι η πρώτη που συσχέτισε τα κυκλοφορούντα miRNAs με την κλινική έκβαση ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του προστάτη και υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία. Περιορισμοί της μελέτης είναι ο σχετικά μικρός αριθμός ασθενών που εντάχθηκαν, ο οποίος περιορίζει τη στατιστική ισχύ της και η έλλειψη επικύρωσης των αποτελεσμάτων σε μία ανεξάρτητη ομάδα ασθενών. Επίσης, εξαιτίας του μικρού αριθμού των συμβάντων μετά την ακτινοθεραπεία, οι συσχετίσεις των υψηλών επιπέδων έκφρασης των miR-21 και miR-106b με τη μικρότερη ολική επιβίωση δεν επικυρώθηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Από την άλλη όμως, υπάρχουν σημαντικά πλεονεκτήματα που ενδυναμώνουν την ισχύ των αποτελεσμάτων. Όλες οι παράμετροι (προ-αναλυτικοί και αναλυτικοί) ελέγχθηκαν λεπτομερώς ώστε να αποφευχθεί τυχόν μεροληψία (bias) στην ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των miRNAs.(280) Τα δείγματα αίματος και οι κλινικές πληροφορίες συλλέχθηκαν προοπτικά. Τέλος, το χρονικό διάστημα παρακολούθησης ήταν επαρκές για την ομάδα των ασθενών μας.

Δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι πήραμε δύο «στιγμιότυπα» μιας δυναμικής και διαρκώς μεταβαλλόμενης εικόνας της έκφρασης των miRNAs, το πρώτο στην αρχή και το δεύτερο στο τέλος της ακτινοθεραπείας. Το χρονικό διάστημα ανάμεσά τους ήταν σχεδόν δύο μήνες. Δεν υπάρχουν μέχρι τώρα μελέτες που να

εξετάζουν τις διακυμάνσεις της έκφρασης των miRNAs κατά τη διάρκεια της κλασματοποιημένης ακτινοθεραπείας, οι οποίες μπορεί να συμβαίνουν σε διάστημα λεπτών, ωρών ή ημερών, οι οποίες μπορεί να είναι εξίσου ή και περισσότερο σημαντικές. Επίσης, δεν γνωρίζουμε τη συνεισφορά της ακτινοβολήσης των φυσιολογικών οργάνων στα επίπεδα των κυκλοφορούντων miRNAs. Στην προκειμένη περίπτωση, σημαντικά ποσά ακτινοβολίας έλαβαν το έντερο -κυρίως το ορθό-, η ουροδόχος κύστη, τα οστά, οι μύες και το δέρμα της περιοχής της πυέλου, αγγεία, νεύρα κλπ. Οι Wagner-Ecker και συν,(281) ακτινοβολώντας καλλιέργειες ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων βρήκαν αυξημένη έκφραση των let-7g, miR-16, miR-20a, miR-21 και miR-29c, και, αντίστοιχα, μειωμένη έκφραση των miR-18a, miR-125a, miR-127, miR-148b, miR-189 and miR-503. Οι Templin και συν.(79) έδειξαν αύξηση της έκφρασης των miR-21 και miR-106b τέσσερις ώρες μετά από ολοσωματική ακτινοβολήση ασθενών υποψήφιων για μεταμόσχευση μυελού. Το miR-21, όπως και τα miR-146a και miR-155 βρέθηκαν να είναι αυξημένα στα μονοπύρρηνα του περιφερικού αίματος ασθενών που υποβλήθηκαν σε εξωτερική ακτινοθεραπεία για καρκίνο προστάτη και εμφάνισαν τοξικότητα από τη θεραπεία στο ουροποιητικό σύστημα.(282) Από την άλλη, δεν γνωρίζουμε την επίδραση άλλων καλοήθων νοσημάτων ή καταστάσεων που μπορεί να επηρεάζουν τα επίπεδα των κυκλοφορούντων miRNAs, καθώς η έρευνα γύρω από τα καλοήθη νοσήματα δεν είναι τόσο εντατική. Ενδεικτικά αναφέρονται καλοήθη νοσήματα στα οποία έχουν συσχετιστεί διαταραχές έκφρασης του miR-21 και miR-106b στους ακόλουθους πίνακες (Πίνακας 16 και Πίνακας 17 αντίστοιχα).

Πίνακας 16. Συσχέτιση του miR-21 με καλοήθη νοσήματα	
Σακχαρώδης διαβήτης	Διαβητική αθηροσκλήρυνση,(283) Διαβητική νεφροπάθεια,(284) Διαβητικό τραύμα(285)
Νόσοι πεπτικού συστήματος	Ελκώδης κολίτιδα,(286) Κίρρωση από ηπατίτιδα Β,(287) Ηπατίτιδα C(288)
Αυτοάνοσα νοσήματα	Ψωρίαση,(289) Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος,(290) Ιδιοπαθής νεανική αρθρίτιδα,(291) Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα(292)
Νόσοι συνδετικού ιστού	Σχηματισμός χηλοειδούς(293)
Παθήσεις ουρογεννητικού συστήματος	Ολιγοσπερμία,(294) Νεφρική ίνωση(295)
Ενδοκρινολογικές παθήσεις	Ανώμαλος σχηματισμός οστού στην ακρομεγαλία(296)
Αναπνευστικές παθήσεις	Πνευμονική βλάβη – ίνωση,(297) Αλλεργική ρινίτιδα(298)
Καρδιαγγειακές παθήσεις	Καρδιακή ίνωση μετά από έμφραγμα,(299) Υπέρταση,(300) Ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια,(301) Υπέρταση κύησης(302)

Πίνακας 17. Συσχέτιση του miR-106b με καλοήγη νοσήματα

Οφθαλμολογικές παθήσεις	Αγγειοπάθεια αμφιβληστροειδούς,(303)
Καρδιαγγειακές παθήσεις	Αθηροσκλήρωση,(304) Υπέρταση,(305) Στένωση καρωτίδων,(306) Έμφραγμα μυοκαρδίου,(307) Στεφανιαία νόσος,(308) Βαλβιδοπάθεια μιτροειδούς,(309)
Νευρολογικές - ψυχιατρικές παθήσεις	Νόσος Alzheimer,(310) Επιληψία,(311) Διπολική διαταραχή,(312) Νόσος Parkinson,(313) Νόσος Creutzfeldt-Jakob,(314), Σχιζοφρένεια,(315)
Παθήσεις αναπνευστικού συστήματος	Χρόνια θρομβοεμβολική πνευμονική υπέρταση,(316) Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια,(317) Άσθμα,(318)
Σακχαρώδης διαβήτης	Αντίσταση στην Ινσουλίνη,(319) Διαβητική νεφροπάθεια,(320) Διαβήτης τύπου II(321)
Άλλες παθήσεις	Περιοδοντίτιδα,(322) Κίρρωση ήπατος,(322) Ατοπική δερματίτιδα(323)

2.4. Συμπεράσματα και προοπτικές

Εν κατακλείδι, δείξαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης στον ορό του miR-106b πριν από την ακτινοθεραπεία συσχετίστηκαν με τοπικά προχωρημένη νόσο. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των miR-21 και miR-106b συσχετίστηκαν με βιοχημική υποτροπή νόσου σε ορισμένες υποομάδες ασθενών και με μειωμένη ολική επιβίωση στο σύνολο των ασθενών. Χρησιμοποιώντας συνδυασμό λειτουργικού εμπλουτισμού και δικτύων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, δείξαμε ότι αυτά τα miRNAs εμπλέκονται σε βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τον καρκίνο και, ιδιαίτερα, με τις οδούς επιδιόρθωσης του DNA. Έτσι, αναδείξαμε έναν ακόμα συνδετικό κρίκο ανάμεσα στην ακτινοθεραπεία, τις μοριακές οδούς που κινητοποιεί και το τελική έκβαση της νόσου των ασθενών. Τα ανωτέρω ευρήματα συμφωνούν με προκλινικά δεδομένα για τον δυνητικό τους ρόλο σε μηχανισμούς ακτινοαντοχής στον καρκίνο του προστάτη.

Η εκτίμηση, λοιπόν, της έκφρασης των miR-21 και miR-106b αλλά και άλλων miRNAs στον ορό ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του προστάτη και υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία αξίζει επιπλέον μελέτης. Οι δυνατότητες αυτών των μικρών μορίων παραμένουν ακόμα άγνωστες και ανεξερεύνητες σε πολύ

μεγάλο βαθμό και, αν φωτιστούν επαρκώς, είναι σχεδόν βέβαιο ότι θα μπορούν να καθοδηγούν ορθότερες και εξατομικευμένες θεραπευτικές αποφάσεις, κάνοντας ένα βήμα πιο κοντά στην ακτινοθεραπεία ακριβείας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cancer Today: International Agency for Research on Cancer; [Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>].
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019;69(1):7-34.
3. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008. xxxii, 2106 p. p.
4. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, et al. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. J Natl Cancer Inst. 2006;98(8):529-34.
5. Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. Eur Urol. 2021;79(2):243-62.
6. Mohler JL, Antonarakis ES, Armstrong AJ, D'Amico AV, Davis BJ, Dorff T, et al. Prostate Cancer, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2019;17(5):479-505.
7. Parker C, Castro E, Fizazi K, Heidenreich A, Ost P, Procopio G, et al. Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.

Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2020;31(9):1119-34.

8. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *Jama*. 1998;280(11):969-74.

9. Eklund E, Diamandis EP, Muytjens C, Wheeler S, Mathew A, Stengelin M, et al. Serum complexed and free prostate specific antigen levels are lower in female elite athletes in comparison to control women. *F1000Res*. 2017;6:1131.

10. Ng TK, Vasilareas D, Mitterdorfer AJ, Maher PO, Lalak A. Prostate cancer detection with digital rectal examination, prostate-specific antigen, transrectal ultrasonography and biopsy in clinical urological practice. *BJU Int*. 2005;95(4):545-8.

11. Borley N, Feneley MR. Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian J Androl*. 2009;11(1):74-80.

12. Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI, et al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol*. 1993;150(1):110-4.

13. Rahman S, Cosmatos H, Dave G, Williams S, Tome M. Predicting pelvic lymph node involvement in current-era prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;82(2):906-10.

14. Campos-Fernández E, Barcelos LS, de Souza AG, Goulart LR, Alonso-Goulart V. Research landscape of liquid biopsies in prostate cancer. *American journal of cancer research*. 2019;9(7):1309-28.

15. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *European journal of cancer & clinical oncology*. 1987;23(6):707-12.

16. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov.* 2021;11(4):858-73.
17. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol.* 2017;71(4):618-29.
18. Khan FMGJP. Khan's the physics of radiation therapy2014.
19. Hall EJGAJ. Radiobiology for the radiologist. 2012.
20. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology.* 2019;25:101084.
21. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta.* 2016;1863(12):2977-92.
22. Huang RX, Zhou PK. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal transduction and targeted therapy.* 2020;5(1):60.
23. Chatterjee P, Choudhary GS, Sharma A, Singh K, Heston WD, Ciezki J, et al. PARP inhibition sensitizes to low dose-rate radiation TMPRSS2-ERG fusion gene-expressing and PTEN-deficient prostate cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(4):e60408.
24. Biau J, Chautard E, Verrelle P, Dutreix M. Altering DNA Repair to Improve Radiation Therapy: Specific and Multiple Pathway Targeting. *Front Oncol.* 2019;9:1009.
25. Fan M, Ahmed KM, Coleman MC, Spitz DR, Li JJ. Nuclear factor-kappaB and manganese superoxide dismutase mediate adaptive radioresistance in low-dose irradiated mouse skin epithelial cells. *Cancer Res.* 2007;67(7):3220-8.

26. Skvortsova I, Skvortsov S, Stasyk T, Raju U, Popper BA, Schiestl B, et al. Intracellular signaling pathways regulating radioresistance of human prostate carcinoma cells. *Proteomics*. 2008;8(21):4521-33.
27. Lee SY, Jeong EK, Ju MK, Jeon HM, Kim MY, Kim CH, et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer*. 2017;16(1):10.
28. Chan N, Bristow RG. "Contextual" synthetic lethality and/or loss of heterozygosity: tumor hypoxia and modification of DNA repair. *Clin Cancer Res*. 2010;16(18):4553-60.
29. Supiot S, Rousseau C, Dore M, Chèze-Le-Rest C, Kandel-Aznar C, Potiron V, et al. Reoxygenation during radiotherapy in intermediate-risk prostate cancer. *Radiother Oncol*. 2019;133:16-9.
30. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*. 2003;300(5622):1155-9.
31. Barker HE, Paget JT, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(7):409-25.
32. Halperin ECWDEPCABLW. *Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology*. 2019.
33. Sudahar H, Kurup PG, Murali V, Mahadev P, Velmurugan J. Equivalent normalized total dose estimates in cyberknife radiotherapy dose delivery in prostate cancer hypofractionation regimens. *Journal of medical physics*. 2012;37(2):90-6.
34. Brenner DJ, Hall EJ. Fractionation and protraction for radiotherapy of prostate carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999;43(5):1095-101.

35. Schaeffer E, Srinivas S, Antonarakis ES, Armstrong AJ, Bekelman JE, Cheng H, et al. NCCN Guidelines Insights: Prostate Cancer, Version 1.2021. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19(2):134-43.
36. Bekelman JE, Rumble RB, Freedland SJ. Clinically Localized Prostate Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of an AUA/ASTRO/SUO Guideline Summary. *Journal of oncology practice*. 2018;14(10):618-24.
37. Kalbasi A, Li J, Berman A, Swisher-McClure S, Smaldone M, Uzzo RG, et al. Dose-Escalated Irradiation and Overall Survival in Men With Nonmetastatic Prostate Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(7):897-906.
38. Murata K, Saga R, Monzen S, Tsuruga E, Hasegawa K, Hosokawa Y. Understanding the mechanism underlying the acquisition of radioresistance in human prostate cancer cells. *Oncol Lett*. 2019;17(6):5830-8.
39. Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2017;1509:1-10.
40. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
41. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
42. Kusenda B, Mraz M, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006;150(2):205-15.
43. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
44. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.

45. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Database issue):D154-8.
46. Reinhart BJ, Bartel DP. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science.* 2002;297(5588):1831.
47. Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science.* 2007;318(5851):761-4.
48. Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia.* 2015;29(5):1004-17.
49. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Research.* 2019;47(7):3353-64.
50. Patil PA, Magi-Galluzzi C. MicroRNA in prostate cancer: Practical aspects. *Histol Histopathol.* 2015;30(12):1379-96.
51. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-60.
52. Mraz M, Dolezalova D, Plevova K, Stano Kozubik K, Mayerova V, Cerna K, et al. MicroRNA-650 expression is influenced by immunoglobulin gene rearrangement and affects the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119(9):2110-3.
53. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853-8.
54. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002;12(9):735-9.
55. Okamura K, Chung WJ, Lai EC. The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs. *Cell Cycle.* 2008;7(18):2840-5.
56. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-69.

57. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
58. Ardekani AM, Naeini MM. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2010;2(4):161-79.
59. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
60. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435(7043):828-33.
61. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine*. 2012;4(3):143-59.
62. Yang C, Dou R, Yin T, Ding J. MiRNA-106b-5p in human cancers: diverse functions and promising biomarker. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2020;127:110211.
63. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res*. 2011;717(1-2):1-8.
64. Salinas-Vera YM, Marchat LA, Gallardo-Rincón D, Ruiz-García E, Astudillo-De La Vega H, Echavarría-Zepeda R, et al. Angiomirs: MicroRNAs driving angiogenesis in cancer (Review). *International journal of molecular medicine*. 2019;43(2):657-70.
65. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González M, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011;2:282.
66. Mao L, Li J, Chen WX, Cai YQ, Yu DD, Zhong SL, et al. Exosomes decrease sensitivity of breast cancer cells to adriamycin by delivering microRNAs. *Tumour Biol*. 2016;37(4):5247-56.

67. Hannafon BN, Carpenter KJ, Berry WL, Janknecht R, Dooley WC, Ding WQ. Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). *Mol Cancer*. 2015;14:133.
68. Larrea E, Sole C, Manterola L, Goicoechea I, Armesto M, Arestin M, et al. New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5).
69. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-41.
70. Tzimagiorgis G, Michailidou EZ, Kritis A, Markopoulos AK, Koudou S. Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids. *Cancer Epidemiol*. 2011;35(6):580-9.
71. Mo MH, Chen L, Fu Y, Wang W, Fu SW. Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *J Cancer*. 2012;3:432-48.
72. Zen K, Zhang CY. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev*. 2012;32(2):326-48.
73. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci*. 2012;37(11):460-5.
74. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.
75. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997-1006.
76. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*. 2015;5(10):1122-43.

77. Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M, et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res.* 2007;67(23):11111-6.
78. Simone NL, Soule BP, Ly D, Saleh AD, Savage JE, Degraff W, et al. Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. *PLoS One.* 2009;4(7):e6377.
79. Templin T, Paul S, Amundson SA, Young EF, Barker CA, Wolden SL, et al. Radiation-induced micro-RNA expression changes in peripheral blood cells of radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;80(2):549-57.
80. Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(4):239-53.
81. Pickhard AC, Margraf J, Knopf A, Stark T, Piontek G, Beck C, et al. Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways. *BMC Cancer.* 2011;11:388.
82. Matsumoto F, Valdecanas DN, Mason KA, Milas L, Ang KK, Raju U. The impact of timing of EGFR and IGF-1R inhibition for sensitizing head and neck cancer to radiation. *Anticancer Res.* 2012;32(8):3029-35.
83. Wu L, Shao L, Li M, Zheng J, Wang J, Feng W, et al. BMS-345541 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to ionizing radiation by selective inhibition of homologous recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Radiat Res.* 2013;179(2):160-70.
84. Mladenov E, Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res.* 2011;711(1-2):61-72.
85. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012;481(7381):287-94.

86. Hazawa M, Hosokawa Y, Monzen S, Yoshino H, Kashiwakura I. Regulation of DNA damage response and cell cycle in radiation-resistant HL60 myeloid leukemia cells. *Oncol Rep.* 2012;28(1):55-61.
87. Mérimo D, Strasser A, Bouillet P. Bim must be able to engage all pro-survival Bcl-2 family members for efficient tumor suppression. *Oncogene.* 2012;31(28):3392-6.
88. Chua ML, Bristow RG. Testosterone in Androgen Receptor Signaling and DNA Repair: Enemy or Frenemy? *Clin Cancer Res.* 2016;22(13):3124-6.
89. Mahajan K, Coppola D, Rawal B, Chen YA, Lawrence HR, Engelman RW, et al. Ack1-mediated androgen receptor phosphorylation modulates radiation resistance in castration-resistant prostate cancer. *J Biol Chem.* 2012;287(26):22112-22.
90. Zhao L, Lu X, Cao Y. MicroRNA and signal transduction pathways in tumor radiation response. *Cell Signal.* 2013;25(7):1625-34.
91. Liccardi G, Hartley JA, Hochhauser D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res.* 2011;71(3):1103-14.
92. Li P, Zhang Q, Torossian A, Li ZB, Xu WC, Lu B, et al. Simultaneous inhibition of EGFR and PI3K enhances radiosensitivity in human breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;83(3):e391-7.
93. Dittmann K, Mayer C, Kehlbach R, Rodemann HP. Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. *Mol Cancer.* 2008;7:69.
94. Davis AJ, Lee KJ, Chen DJ. The N-terminal region of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for its DNA double-stranded break-mediated activation. *J Biol Chem.* 2013;288(10):7037-46.

95. Mukherjee B, Choy H, Nirodi C, Burma S. Targeting nonhomologous end-joining through epidermal growth factor receptor inhibition: rationale and strategies for radiosensitization. *Seminars in radiation oncology*. 2010;20(4):250-7.
96. Kriegs M, Kasten-Pisula U, Rieckmann T, Holst K, Saker J, Dahm-Daphi J, et al. The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. *DNA repair*. 2010;9(8):889-97.
97. Lee KM, Choi EJ, Kim IA. microRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR-associated signaling. *Radiother Oncol*. 2011;101(1):171-6.
98. Tao J, Wu D, Xu B, Qian W, Li P, Lu Q, et al. microRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor receptor. *Oncol Rep*. 2012;27(6):1967-75.
99. Xu B, Wang N, Wang X, Tong N, Shao N, Tao J, et al. MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer. *Prostate*. 2012;72(11):1171-8.
100. Shi Y, Zhang X, Tang X, Wang P, Wang H, Wang Y. MiR-21 is continually elevated long-term in the brain after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*. 2012;177(1):124-8.
101. Valenciano A, Henríquez-Hernández LA, Moreno M, Lloret M, Lara PC. Role of IGF-1 receptor in radiation response. *Translational oncology*. 2012;5(1):1-9.
102. Arnaldez FI, Helman LJ. Targeting the insulin growth factor receptor 1. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2012;26(3):527-42, vii-viii.
103. Zaidi SH, Huddart RA, Harrington KJ. Novel targeted radiosensitisers in cancer treatment. *Current drug discovery technologies*. 2009;6(2):103-34.
104. Jiang L, Liu X, Chen Z, Jin Y, Heidbreder CE, Kolokythas A, et al. MicroRNA-7 targets IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) in tongue squamous cell carcinoma cells. *The Biochemical journal*. 2010;432(1):199-205.

105. Sun Z, Shushanov S, LeRoith D, Wood TL. Decreased IGF type 1 receptor signaling in mammary epithelium during pregnancy leads to reduced proliferation, alveolar differentiation, and expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *Endocrinology*. 2011;152(8):3233-45.
106. Jia CY, Li HH, Zhu XC, Dong YW, Fu D, Zhao QL, et al. MiR-223 suppresses cell proliferation by targeting IGF-1R. *PLoS One*. 2011;6(11):e27008.
107. Kong KL, Kwong DL, Chan TH, Law SY, Chen L, Li Y, et al. MicroRNA-375 inhibits tumour growth and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma through repressing insulin-like growth factor 1 receptor. *Gut*. 2012;61(1):33-42.
108. Zhan M, Han ZC. Phosphatidylinositide 3-kinase/AKT in radiation responses. *Histol Histopathol*. 2004;19(3):915-23.
109. Fokas E, Yoshimura M, Prevo R, Higgins G, Hackl W, Maira SM, et al. NVP-BEZ235 and NVP-BGT226, dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors, enhance tumor and endothelial cell radiosensitivity. *Radiat Oncol*. 2012;7:48.
110. Fang Y, Xue JL, Shen Q, Chen J, Tian L. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012;55(6):1852-62.
111. Guo C, Sah JF, Beard L, Willson JK, Markowitz SD, Guda K. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes, chromosomes & cancer*. 2008;47(11):939-46.
112. Rao E, Jiang C, Ji M, Huang X, Iqbal J, Lenz G, et al. The miRNA-17~92 cluster mediates chemoresistance and enhances tumor growth in mantle cell lymphoma via PI3K/AKT pathway activation. *Leukemia*. 2012;26(5):1064-72.

113. Chun-Zhi Z, Lei H, An-Ling Z, Yan-Chao F, Xiao Y, Guang-Xiu W, et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN. *BMC Cancer*. 2010;10:367.
114. Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, Gerard RD, et al. Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(9):4218-23.
115. Lyng FM, Maguire P, McClean B, Seymour C, Mothersill C. The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects. *Radiat Res*. 2006;165(4):400-9.
116. Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene*. 2003;22(37):5885-96.
117. Ikeda Y, Tanji E, Makino N, Kawata S, Furukawa T. MicroRNAs associated with mitogen-activated protein kinase in human pancreatic cancer. *Molecular cancer research : MCR*. 2012;10(2):259-69.
118. Yang F, Yin Y, Wang F, Wang Y, Zhang L, Tang Y, et al. miR-17-5p Promotes migration of human hepatocellular carcinoma cells through the p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 pathway. *Hepatology*. 2010;51(5):1614-23.
119. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS One*. 2011;6(4):e19139.
120. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(2):121-32.
121. Li F, Sethi G. Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1805(2):167-80.

122. Jiang L, Lin C, Song L, Wu J, Chen B, Ying Z, et al. MicroRNA-30e* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF- κ B/I κ B α negative feedback loop. *J Clin Invest*. 2012;122(1):33-47.
123. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, et al. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell*. 2012;21(1):121-35.
124. Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, Zhang J, Conklin DJ, et al. miR-301a as an NF- κ B activator in pancreatic cancer cells. *Embo j*. 2011;30(1):57-67.
125. Arora H, Qureshi R, Jin S, Park AK, Park WY. miR-9 and let-7g enhance the sensitivity to ionizing radiation by suppression of NF κ B1. *Exp Mol Med*. 2011;43(5):298-304.
126. Kelly RJ, Morris JC. Transforming growth factor-beta: a target for cancer therapy. *Journal of immunotoxicology*. 2010;7(1):15-26.
127. Korpál M, Kang Y. Targeting the transforming growth factor-beta signalling pathway in metastatic cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46(7):1232-40.
128. Zhang M, Kleber S, Röhrich M, Timke C, Han N, Tuettenberg J, et al. Blockade of TGF- β signaling by the TGF β R-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma. *Cancer Res*. 2011;71(23):7155-67.
129. Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A, et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene*. 2012;31(37):4150-63.
130. Kumarswamy R, Volkmann I, Jazbutyte V, Dangwal S, Park DH, Thum T. Transforming growth factor- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(2):361-9.

131. Wang Y, Yu Y, Tsuyada A, Ren X, Wu X, Stubblefield K, et al. Transforming growth factor- β regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM. *Oncogene*. 2011;30(12):1470-80.
132. Basu B, Yap TA, Molife LR, de Bono JS. Targeting the DNA damage response in oncology: past, present and future perspectives. *Curr Opin Oncol*. 2012;24(3):316-24.
133. Furgason JM, Bahassi el M. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;137(3):298-308.
134. Bolderson E, Richard DJ, Zhou BB, Khanna KK. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. *Clin Cancer Res*. 2009;15(20):6314-20.
135. Wohlbold L, Merrick KA, De S, Amat R, Kim JH, Larochelle S, et al. Chemical genetics reveals a specific requirement for Cdk2 activity in the DNA damage response and identifies Nbs1 as a Cdk2 substrate in human cells. *PLoS Genet*. 2012;8(8):e1002935.
136. Gogineni VR, Nalla AK, Gupta R, Dinh DH, Klopfenstein JD, Rao JS. Chk2-mediated G2/M cell cycle arrest maintains radiation resistance in malignant meningioma cells. *Cancer Lett*. 2011;313(1):64-75.
137. Song L, Lin C, Wu Z, Gong H, Zeng Y, Wu J, et al. miR-18a impairs DNA damage response through downregulation of ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase. *PLoS One*. 2011;6(9):e25454.
138. Yan D, Ng WL, Zhang X, Wang P, Zhang Z, Mo YY, et al. Targeting DNA-PKcs and ATM with miR-101 sensitizes tumors to radiation. *PLoS One*. 2010;5(7):e11397.
139. Chang S, Wang RH, Akagi K, Kim KA, Martin BK, Cavallone L, et al. Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. *Nat Med*. 2011;17(10):1275-82.
140. Zhang H, Zuo Z, Lu X, Wang L, Wang H, Zhu Z. MiR-25 regulates apoptosis by targeting Bim in human ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2012;27(2):594-8.

141. Zhang YK, Wang H, Leng Y, Li ZL, Yang YF, Xiao FJ, et al. Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells through down regulating Mcl-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;414(1):233-9.
142. Desjobert C, Renalier MH, Bergalet J, Dejean E, Joseph N, Kruczynski A, et al. MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression. *Blood.* 2011;117(24):6627-37.
143. Chen J, Zhang X, Lentz C, Abi-Daoud M, Paré GC, Yang X, et al. miR-193b Regulates Mcl-1 in Melanoma. *Am J Pathol.* 2011;179(5):2162-8.
144. Leung CM, Li SC, Chen TW, Ho MR, Hu LY, Liu WS, et al. Comprehensive microRNA profiling of prostate cancer cells after ionizing radiation treatment. *Oncol Rep.* 2014;31(3):1067-78.
145. Li B, Shi XB, Nori D, Chao CK, Chen AM, Valicenti R, et al. Down-regulation of microRNA 106b is involved in p21-mediated cell cycle arrest in response to radiation in prostate cancer cells. *Prostate.* 2011;71(6):567-74.
146. Jossen S, Sung SY, Lao K, Chung LW, Johnstone PA. Radiation modulation of microRNA in prostate cancer cell lines. *Prostate.* 2008;68(15):1599-606.
147. Wu Y, Liu GL, Liu SH, Wang CX, Xu YL, Ying Y, et al. MicroRNA-148b enhances the radiosensitivity of non-Hodgkin's Lymphoma cells by promoting radiation-induced apoptosis. *J Radiat Res.* 2012;53(4):516-25.
148. Liu SH, Wang PP, Chen CT, Li D, Liu QY, Lv L, et al. MicroRNA-148b enhances the radiosensitivity of B-cell lymphoma cells by targeting Bcl-w to promote apoptosis. *International journal of biological sciences.* 2020;16(6):935-46.
149. Wang XC, Zhang ZB, Wang YY, Wu HY, Li DG, Meng AM, et al. Increased miRNA-22 expression sensitizes esophageal squamous cell carcinoma to irradiation. *J Radiat Res.* 2013;54(3):401-8.

150. Li AL, Chung TS, Chan YN, Chen CL, Lin SC, Chiang YR, et al. microRNA expression pattern as an ancillary prognostic signature for radiotherapy. *Journal of translational medicine*. 2018;16(1):341.
151. Liu X, Cai H, Sheng W, Huang H, Long Z, Wang Y. microRNAs expression profile related with response to preoperative radiochemotherapy in patients with locally advanced gastric cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1048.
152. Liu JK, Liu HF, Ding Y, Gao GD. Predictive value of microRNA let-7a expression for efficacy and prognosis of radiotherapy in patients with lung cancer brain metastasis: A case-control study. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(44):e12847.
153. Bahtiyar N, Onaran I, Aydemir B, Baykara O, Toplan S, Agaoglu FY, et al. Monitoring of platelet function parameters and microRNA expression levels in patients with prostate cancer treated with volumetric modulated arc radiotherapy. *Oncol Lett*. 2018;16(4):4745-53.
154. Zedan AH, Hansen TF, Assenholt J, Madsen JS, Osther PJS. Circulating miRNAs in localized/locally advanced prostate cancer patients after radical prostatectomy and radiotherapy. *Prostate*. 2019;79(4):425-32.
155. Yentrapalli R, Merl-Pham J, Azimzadeh O, Mutschelknaus L, Peters C, Hauck SM, et al. Quantitative changes in the protein and miRNA cargo of plasma exosome-like vesicles after exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation biology*. 2017;93(6):569-80.
156. Amir S, Ma AH, Shi XB, Xue L, Kung HJ, Devere White RW. Oncomir miR-125b suppresses p14(ARF) to modulate p53-dependent and p53-independent apoptosis in prostate cancer. *PLoS One*. 2013;8(4):e61064.
157. Jackson BL, Grabowska A, Ratan HL. MicroRNA in prostate cancer: functional importance and potential as circulating biomarkers. *BMC Cancer*. 2014;14:930.
158. Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ*. 2010;17(2):215-20.

159. Attwooll C, Lazzerini Denchi E, Helin K. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J.* 2004;23(24):4709-16.
160. Sevli S, Uzumcu A, Solak M, Ittmann M, Ozen M. The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2010;13(3):208-17.
161. Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, et al. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem.* 2007;282(4):2135-43.
162. Pesta M, Klecka J, Kulda V, Topolcan O, Hora M, Eret V, et al. Importance of miR-20a expression in prostate cancer tissue. *Anticancer Res.* 2010;30(9):3579-83.
163. Ambis S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008;68(15):6162-70.
164. Gandellini P, Folini M, Longoni N, Pennati M, Binda M, Colecchia M, et al. miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon. *Cancer Res.* 2009;69(6):2287-95.
165. Menges CW, Altomare DA, Testa JR. FAS-associated factor 1 (FAF1): diverse functions and implications for oncogenesis. *Cell Cycle.* 2009;8(16):2528-34.
166. Qin W, Shi Y, Zhao B, Yao C, Jin L, Ma J, et al. miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One.* 2010;5(2):e9429.
167. Zaman MS, Chen Y, Deng G, Shahryari V, Suh SO, Saini S, et al. The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br J Cancer.* 2010;103(2):256-64.
168. Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol.* 2002;168(3):1356-61.

169. Buscaglia LE, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer*. 2011;30(6):371-80.
170. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*. 2008;27(31):4373-9.
171. Yang CH, Yue J, Fan M, Pfeffer LM. IFN induces miR-21 through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway as a suppressive negative feedback on IFN-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2010;70(20):8108-16.
172. Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol*. 2012;226(2):380-93.
173. Monami G, Emiliozzi V, Bitto A, Lovat F, Xu SQ, Goldoni S, et al. Proepithelin regulates prostate cancer cell biology by promoting cell growth, migration, and anchorage-independent growth. *Am J Pathol*. 2009;174(3):1037-47.
174. Wang WX, Kyprianou N, Wang X, Nelson PT. Dysregulation of the mitogen granulin in human cancer through the miR-15/107 microRNA gene group. *Cancer Res*. 2010;70(22):9137-42.
175. Fuse M, Nohata N, Kojima S, Sakamoto S, Chiyomaru T, Kawakami K, et al. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. *Int J Oncol*. 2011;38(4):1093-101.
176. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
177. Peng X, Guo W, Liu T, Wang X, Tu X, Xiong D, et al. Identification of miRs-143 and -145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT. *PLoS One*. 2011;6(5):e20341.
178. Nguyen HC, Xie W, Yang M, Hsieh CL, Drouin S, Lee GS, et al. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate*. 2013;73(4):346-54.

179. Shi XB, Xue L, Yang J, Ma AH, Zhao J, Xu M, et al. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):19983-8.
180. Ribas J, Ni X, Haffner M, Wentzel EA, Salmasi AH, Chowdhury WH, et al. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res*. 2009;69(18):7165-9.
181. Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, Dai B, et al. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate*. 2011;71(3):326-31.
182. Li T, Li RS, Li YH, Zhong S, Chen YY, Zhang CM, et al. miR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. *J Urol*. 2012;187(4):1466-72.
183. Li T, Li D, Sha J, Sun P, Huang Y. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;383(3):280-5.
184. Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, Dall'Oglio MF, Dip N, Passerotti CC, et al. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. *BMC Urol*. 2012;12:14.
185. Jalava SE, Urbanucci A, Latonen L, Waltering KK, Sahu B, Janne OA, et al. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene*. 2012;31(41):4460-71.
186. Fletcher CE, Dart DA, Sita-Lumsden A, Cheng H, Rennie PS, Bevan CL. Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer. *Human molecular genetics*. 2012;21(14):3112-27.

187. Mulholland DJ, Dedhar S, Wu H, Nelson CC. PTEN and GSK3beta: key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer. *Oncogene*. 2006;25(3):329-37.
188. Sarker D, Reid AH, Yap TA, de Bono JS. Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(15):4799-805.
189. Tian L, Fang YX, Xue JL, Chen JZ. Four microRNAs promote prostate cell proliferation with regulation of PTEN and its downstream signals in vitro. *PLoS One*. 2013;8(9):e75885.
190. Wang G, Lunardi A, Zhang J, Chen Z, Ala U, Webster KA, et al. Zbtb7a suppresses prostate cancer through repression of a Sox9-dependent pathway for cellular senescence bypass and tumor invasion. *Nat Genet*. 2013;45(7):739-46.
191. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005;310(5748):644-8.
192. Leshem O, Madar S, Kogan-Sakin I, Kamer I, Goldstein I, Brosh R, et al. TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model. *PLoS One*. 2011;6(7):e21650.
193. Kim J, Wu L, Zhao JC, Jin HJ, Yu J. TMPRSS2-ERG gene fusions induce prostate tumorigenesis by modulating microRNA miR-200c. *Oncogene*. 2014;33(44):5183-92.
194. Kao CJ, Martiniez A, Shi XB, Yang J, Evans CP, Dobi A, et al. miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT. *Oncogene*. 2014;33(19):2495-503.
195. Gordanpour A, Stanimirovic A, Nam RK, Moreno CS, Sherman C, Sugar L, et al. miR-221 is down-regulated in TMPRSS2:ERG fusion-positive prostate cancer. *Anticancer Res*. 2011;31(2):403-10.

196. Spahn M, Kneitz S, Scholz CJ, Stenger N, Rudiger T, Strobel P, et al. Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence. *Int J Cancer*. 2010;127(2):394-403.
197. Hoffmann MJ, Engers R, Florl AR, Otte AP, Muller M, Schulz WA. Expression changes in EZH2, but not in BMI-1, SIRT1, DNMT1 or DNMT3B are associated with DNA methylation changes in prostate cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007;6(9):1403-12.
198. Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ, Cao X, Wang X, et al. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell*. 2010;17(5):443-54.
199. Borno ST, Fischer A, Kerick M, Falth M, Laible M, Brase JC, et al. Genome-wide DNA methylation events in TMPRSS2-ERG fusion-negative prostate cancers implicate an EZH2-dependent mechanism with miR-26a hypermethylation. *Cancer Discov*. 2012;2(11):1024-35.
200. Cao P, Deng Z, Wan M, Huang W, Cramer SD, Xu J, et al. MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1alpha/HIF-1beta. *Mol Cancer*. 2010;9:108.
201. Yu DC, Li QG, Ding XW, Ding YT. Circulating microRNAs: potential biomarkers for cancer. *Int J Mol Sci*. 2011;12(3):2055-63.
202. Porzycki P, Ciszkowicz E, Semik M, Tyrka M. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. *Int Urol Nephrol*. 2018;50(9):1619-26.
203. Lodes MJ, Caraballo M, Suciu D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One*. 2009;4(7):e6229.
204. Moltzahn F, Olshen AB, Baehner L, Peek A, Fong L, Stoppler H, et al. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Res*. 2011;71(2):550-60.

205. Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol.* 2011;32(3):583-8.
206. Gonzales JC, Fink LM, Goodman OB, Jr., Symanowski JT, Vogelzang NJ, Ward DC. Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2011;9(1):39-45.
207. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, Steuber T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2011;128(3):608-16.
208. Selth LA, Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ, et al. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *Int J Cancer.* 2012;131(3):652-61.
209. Selth LA, Townley SL, Bert AG, Stricker PD, Sutherland PD, Horvath LG, et al. Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients. *Br J Cancer.* 2013;109(3):641-50.
210. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer.* 2012;106(4):768-74.
211. Shen J, Hruby GW, McKiernan JM, Gurvich I, Lipsky MJ, Benson MC, et al. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *Prostate.* 2012;72(13):1469-77.
212. Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology.* 2011;77(5):1265 e9-16.

213. Foj L, Ferrer F, Serra M, Arevalo A, Gavagnach M, Gimenez N, et al. Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. *Prostate*. 2017;77(6):573-83.
214. Lopes Vendrami C, McCarthy RJ, Chatterjee A, Casalino D, Schaeffer EM, Catalona WJ, et al. The Utility of Prostate Specific Antigen Density, Prostate Health Index, and Prostate Health Index Density in Predicting Positive Prostate Biopsy Outcome is Dependent on the Prostate Biopsy Methods. *Urology*. 2019;129:153-9.
215. Shaw GL, Thomas BC, Dawson SN, Srivastava G, Vowler SL, Gnanapragasam VJ, et al. Identification of pathologically insignificant prostate cancer is not accurate in unscreened men. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2405-11.
216. Kuner R, Brase JC, Sultmann H, Wuttig D. microRNA biomarkers in body fluids of prostate cancer patients. *Methods*. 2013;59(1):132-7.
217. Barron N, Keenan J, Gammell P, Martinez VG, Freeman A, Masters JR, et al. Biochemical relapse following radical prostatectomy and miR-200a levels in prostate cancer. *Prostate*. 2012;72(11):1193-9.
218. Avgeris M, Stravodimos K, Fragoulis EG, Scorilas A. The loss of the tumour-suppressor miR-145 results in the shorter disease-free survival of prostate cancer patients. *Br J Cancer*. 2013;108(12):2573-81.
219. Kneitz B, Krebs M, Kalogirou C, Schubert M, Joniau S, van Poppel H, et al. Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3. *Cancer Res*. 2014;74(9):2591-603.
220. Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Fernandez-Serra A, Lopez-Guerrero JA. miRNAs as biomarkers in prostate cancer. *Clin Transl Oncol*. 2012;14(11):803-11.
221. Labbé M, Hoey C, Ray J, Potiron V, Supiot S, Liu SK, et al. microRNAs identified in prostate cancer: Correlative studies on response to ionizing radiation. *Mol Cancer*. 2020;19(1):63.

222. Hummel R, Hussey DJ, Haier J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. *Eur J Cancer*. 2010;46(2):298-311.
223. Svoboda M, Izakovicova Holla L, Sefr R, Vrtkova I, Kocakova I, Tichy B, et al. Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol*. 2008;33(3):541-7.
224. Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Calatrava A, Mancarella C, Masia E, Casanova J, et al. Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol*. 2014;192(1):252-9.
225. Wang XC, Du LQ, Tian LL, Wu HL, Jiang XY, Zhang H, et al. Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011;72(1):92-9.
226. Malla B, Aebersold DM, Dal Pra A. Protocol for serum exosomal miRNAs analysis in prostate cancer patients treated with radiotherapy. *Journal of translational medicine*. 2018;16(1):223.
227. John-Aryankalayil M, Palayoor ST, Makinde AY, Cerna D, Simone CB, 2nd, Falduto MT, et al. Fractionated radiation alters oncomir and tumor suppressor miRNAs in human prostate cancer cells. *Radiat Res*. 2012;178(3):105-17.
228. Pashaei E, Pashaei E, Ahmady M, Ozen M, Aydin N. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179543.
229. Nguyen PL, Haddad Z, Ross AE, Martin NE, Deheshi S, Lam LLC, et al. Ability of a Genomic Classifier to Predict Metastasis and Prostate Cancer-specific Mortality after Radiation or Surgery based on Needle Biopsy Specimens. *Eur Urol*. 2017;72(5):845-52.
230. Wang Y, Lieberman R, Pan J, Zhang Q, Du M, Zhang P, et al. miR-375 induces docetaxel resistance in prostate cancer by targeting SEC23A and YAP1. *Mol Cancer*. 2016;15(1):70.

231. Melbø-Jørgensen C, Ness N, Andersen S, Valkov A, Dønnem T, Al-Saad S, et al. Stromal expression of MiR-21 predicts biochemical failure in prostate cancer patients with Gleason score 6. *PLoS One*. 2014;9(11):e1113039.
232. Hudson RS, Yi M, Esposito D, Glynn SA, Starks AM, Yang Y, et al. MicroRNA-106b-25 cluster expression is associated with early disease recurrence and targets caspase-7 and focal adhesion in human prostate cancer. *Oncogene*. 2013;32(35):4139-47.
233. Hu B, Wang X, Hu S, Ying X, Wang P, Zhang X, et al. miR-21-mediated Radioresistance Occurs via Promoting Repair of DNA Double Strand Breaks. *J Biol Chem*. 2017;292(8):3531-40.
234. Bao B, Ahmad A, Kong D, Ali S, Azmi AS, Li Y, et al. Hypoxia induced aggressiveness of prostate cancer cells is linked with deregulated expression of VEGF, IL-6 and miRNAs that are attenuated by CDF. *PLoS One*. 2012;7(8):e43726.
235. McDermott N, Meunier A, Wong S, Buchete V, Marignol L. Profiling of a panel of radioresistant prostate cancer cells identifies deregulation of key miRNAs. *Clinical and translational radiation oncology*. 2017;2:63-8.
236. Cookson MS, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, D'Amico AV, Dmochowski RR, et al. Variation in the definition of biochemical recurrence in patients treated for localized prostate cancer: the American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel report and recommendations for a standard in the reporting of surgical outcomes. *J Urol*. 2007;177(2):540-5.
237. Roach M, 3rd, Hanks G, Thames H, Jr., Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, et al. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;65(4):965-74.

238. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Wrang Teilum M, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*. 2013;59(1):S1-6.
239. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
240. Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D153-9.
241. Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J. g:Profiler--a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W193-200.
242. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D808-15.
243. Bautista-Sánchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, De La Rosa-Velázquez IA, González-Barrios R, Contreras-Espinosa L, et al. The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2020;20:409-20.
244. Ribas J, Lupold SE. The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer. *Cell Cycle*. 2010;9(5):923-9.
245. Yang Y, Guo JX, Shao ZQ. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: An experimental study. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2017;10(1):87-91.

246. Ghorbanmehr N, Gharbi S, Korsching E, Tavallaei M, Einollahi B, Mowla SJ. miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine-promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. *Prostate*. 2019;79(1):88-95.
247. Carvalheira G, Nozima BH, Cerutti JM. microRNA-106b-mediated down-regulation of C1orf24 expression induces apoptosis and suppresses invasion of thyroid cancer. *Oncotarget*. 2015;6(29):28357-70.
248. Yang TS, Yang XH, Chen X, Wang XD, Hua J, Zhou DL, et al. MicroRNA-106b in cancer-associated fibroblasts from gastric cancer promotes cell migration and invasion by targeting PTEN. *FEBS Lett*. 2014;588(13):2162-9.
249. Tan W, Liang G, Xie X, Jiang W, Tan L, Sanders AJ, et al. Incorporating MicroRNA into Molecular Phenotypes of Circulating Tumor Cells Enhances the Prognostic Accuracy for Patients with Metastatic Breast Cancer. *The oncologist*. 2019.
250. Yu X, Wu Y, Liu Y, Deng H, Shen Z, Xiao B, et al. miR-21, miR-106b and miR-375 as novel potential biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2014;15(5):503-8.
251. Molina-Pinelo S, Pastor MD, Suarez R, Romero-Romero B, Gonzalez De la Pena M, Salinas A, et al. MicroRNA clusters: dysregulation in lung adenocarcinoma and COPD. *The European respiratory journal*. 2014;43(6):1740-9.
252. Zhu Z, Yang Q, Zhang B, Wu W, Yuan F, Zhu Z. miR-106b Promotes Metastasis of Early Gastric Cancer by Targeting ALEX1 in Vitro and in Vivo. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52(3):606-16.
253. Zhuang M, Zhao S, Jiang Z, Wang S, Sun P, Quan J, et al. MALAT1 sponges miR-106b-5p to promote the invasion and metastasis of colorectal cancer via SLAIN2 enhanced microtubules mobility. *EBioMedicine*. 2019;41:286-98.
254. Martens-Uzunova ES, Jalava SE, Dits NF, van Leenders GJ, Moller S, Trapman J, et al. Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene*. 2012;31(8):978-91.

255. Szczyrba J, Loprich E, Wach S, Jung V, Unteregger G, Barth S, et al. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Molecular cancer research : MCR*. 2010;8(4):529-38.
256. Song CJ, Chen H, Chen LZ, Ru GM, Guo JJ, Ding QN. The potential of microRNAs as human prostate cancer biomarkers: A meta-analysis of related studies. *J Cell Biochem*. 2018;119(3):2763-86.
257. Xue B, Lu QY, Massie L, Qualls C, Mao JT. Grape seed procyanidin extract against lung cancer: the role of microRNA-106b, bioavailability, and bioactivity. *Oncotarget*. 2018;9(21):15579-90.
258. McCann MJ, Rowland IR, Roy NC. The anti-proliferative effects of enterolactone in prostate cancer cells: evidence for the role of DNA licensing genes, mi-R106b cluster expression, and PTEN dosage. *Nutrients*. 2014;6(11):4839-55.
259. Avci CB, Harman E, Dodurga Y, Susluer SY, Gunduz C. Therapeutic potential of an anti-diabetic drug, metformin: alteration of miRNA expression in prostate cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(2):765-8.
260. Rani V, Singhal S, Sharma K, Vaid R, Aggarwal K, Bhadana R, et al. Human Gut Microbiome: A New Frontier in Cancer Diagnostics & Therapeutics. *Current pharmaceutical design*. 2021.
261. Liang H, Studach L, Hullinger RL, Xie J, Andrisani OM. Down-regulation of RE-1 silencing transcription factor (REST) in advanced prostate cancer by hypoxia-induced miR-106b~25. *Exp Cell Res*. 2014;320(2):188-99.
262. Yin W, Chen J, Wang G, Zhang D. MicroRNA106b functions as an oncogene and regulates tumor viability and metastasis by targeting LARP4B in prostate cancer. *Mol Med Rep*. 2019;20(2):951-8.
263. Choi N, Park J, Lee JS, Yoe J, Park GY, Kim E, et al. miR-93/miR-106b/miR-375-CIC-CRABP1: a novel regulatory axis in prostate cancer progression. *Oncotarget*. 2015;6(27):23533-47.

264. Zheng L, Zhang Y, Liu Y, Zhou M, Lu Y, Yuan L, et al. MiR-106b induces cell radioresistance via the PTEN/PI3K/AKT pathways and p21 in colorectal cancer. *Journal of translational medicine*. 2015;13:252.
265. Gao J, Liu L, Li G, Cai M, Tan C, Han X, et al. LncRNA GAS5 confers the radio sensitivity of cervical cancer cells via regulating miR-106b/IER3 axis. *International journal of biological macromolecules*. 2019;126:994-1001.
266. Filella X, Foj L. miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(5):715-36.
267. Kanwal R, Plaga AR, Liu X, Shukla GC, Gupta S. MicroRNAs in prostate cancer: Functional role as biomarkers. *Cancer Lett*. 2017;407:9-20.
268. Richardsen E, Andersen S, Melbø-Jørgensen C, Rakae M, Ness N, Al-Saad S, et al. MicroRNA 141 is associated to outcome and aggressive tumor characteristics in prostate cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):386.
269. Furth N, Aylon Y, Oren M. p53 shades of Hippo. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):81-92.
270. Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends in genetics : TIG*. 2012;28(3):128-36.
271. Pefani DE, O'Neill E. Hippo pathway and protection of genome stability in response to DNA damage. *The FEBS journal*. 2016;283(8):1392-403.
272. Griñán-Lisón C, Olivares-Urbano MA, Jiménez G, López-Ruiz E, Del Val C, Morata-Tarifa C, et al. miRNAs as radio-response biomarkers for breast cancer stem cells. *Molecular oncology*. 2020;14(3):556-70.
273. Jiang S, Wang R, Yan H, Jin L, Dou X, Chen D. MicroRNA-21 modulates radiation resistance through upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α -promoted glycolysis in non-small cell lung cancer cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(5):4101-7.

274. Zhang J, Zhang C, Hu L, He Y, Shi Z, Tang S, et al. Abnormal Expression of miR-21 and miR-95 in Cancer Stem-Like Cells is Associated with Radioresistance of Lung Cancer. *Cancer investigation*. 2015;33(5):165-71.
275. Jiang LP, He CY, Zhu ZT. Role of microRNA-21 in radiosensitivity in non-small cell lung cancer cells by targeting PDCD4 gene. *Oncotarget*. 2017;8(14):23675-89.
276. Huang S, Li XQ, Chen X, Che SM, Chen W, Zhang XZ. Inhibition of microRNA-21 increases radiosensitivity of esophageal cancer cells through phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 activation. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus*. 2013;26(8):823-31.
277. Gwak HS, Kim TH, Jo GH, Kim YJ, Kwak HJ, Kim JH, et al. Silencing of microRNA-21 confers radio-sensitivity through inhibition of the PI3K/AKT pathway and enhancing autophagy in malignant glioma cell lines. *PLoS One*. 2012;7(10):e47449.
278. Chao TF, Xiong HH, Liu W, Chen Y, Zhang JX. MiR-21 mediates the radiation resistance of glioblastoma cells by regulating PDCD4 and hMSH2. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2013;33(4):525-9.
279. Tang S, Liu B, Liu M, Li Z, Liu J, Wang H, et al. Ionizing radiation-induced growth in soft agar is associated with miR-21 upregulation in wild-type and DNA double strand break repair deficient cells. *DNA repair*. 2019;78:37-44.
280. McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimnich A. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*. 2011;57(6):833-40.
281. Wagner-Ecker M, Schwager C, Wirkner U, Abdollahi A, Huber PE. MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells. *Radiat Oncol*. 2010;5:25.

282. Kopcalic K, Petrovic N, Stanojkovic TP, Stankovic V, Bukumiric Z, Roganovic J, et al. Association between miR-21/146a/155 level changes and acute genitourinary radiotoxicity in prostate cancer patients: A pilot study. *Pathol Res Pract*. 2019;215(4):626-31.
283. Shao M, Yu M, Zhao J, Mei J, Pan Y, Zhang J, et al. miR-21-3p regulates AGE/RAGE signalling and improves diabetic atherosclerosis. *Cell biochemistry and function*. 2020;38(7):965-75.
284. Wang J, Duan L, Tian L, Liu J, Wang S, Gao Y, et al. Serum miR-21 may be a Potential Diagnostic Biomarker for Diabetic Nephropathy. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2016;124(7):417-23.
285. Liechty C, Hu J, Zhang L, Liechty KW, Xu J. Role of microRNA-21 and Its Underlying Mechanisms in Inflammatory Responses in Diabetic Wounds. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9).
286. Lu X, Yu Y, Tan S. The role of the miR-21-5p-mediated inflammatory pathway in ulcerative colitis. *Experimental and therapeutic medicine*. 2020;19(2):981-9.
287. Jiang S, Jiang W, Xu Y, Wang X, Mu Y, Liu P. Serum miR-21 and miR-26a Levels Negatively Correlate with Severity of Cirrhosis in Patients with Chronic Hepatitis B. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*. 2019;8(1):86-92.
288. Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, Keck K, Hoffer BA, Icardi MS, et al. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2010;90(12):1727-36.
289. Jia HY, Zhang K, Lu WJ, Xu GW, Zhang JF, Tang ZL. LncRNA MEG3 influences the proliferation and apoptosis of psoriasis epidermal cells by targeting miR-21/caspase-8. *BMC molecular and cell biology*. 2019;20(1):46.

290. Kourti M, Sokratous M, Katsiari CG. Regulation of microRNA in systemic lupus erythematosus: the role of miR-21 and miR-210. *Mediterranean journal of rheumatology*. 2020;31(1):71-4.
291. Li HW, Zeng HS. Regulation of JAK/STAT signal pathway by miR-21 in the pathogenesis of juvenile idiopathic arthritis. *World journal of pediatrics : WJP*. 2020;16(5):502-13.
292. Zou YC, Gao YP, Yin HD, Liu G. Serum miR-21 expression correlates with radiographic progression but also low bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis: a cross-sectional study. *Innate immunity*. 2019;25(5):314-21.
293. Wu J, Fang L, Cen Y, Qing Y, Chen J, Li Z. MiR-21 Regulates Keloid Formation by Downregulating Smad7 via the TGF- β /Smad Signaling Pathway. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*. 2019;40(6):809-17.
294. Abhari A, Zarghami N, Farzadi L, Nouri M, Shahnazi V. Altered of microRNA expression level in oligospermic patients. *Iranian journal of reproductive medicine*. 2014;12(10):681-6.
295. Zhou TB, Jiang ZP. Role of miR-21 and its signaling pathways in renal diseases. *Journal of receptor and signal transduction research*. 2014;34(5):335-7.
296. Xiong Y, Tang Y, Fan F, Zeng Y, Li C, Zhou G, et al. Exosomal hsa-miR-21-5p derived from growth hormone-secreting pituitary adenoma promotes abnormal bone formation in acromegaly. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2020;215:1-16.
297. Mo Y, Zhang Y, Wan R, Jiang M, Xu Y, Zhang Q. miR-21 mediates nickel nanoparticle-induced pulmonary injury and fibrosis. *Nanotoxicology*. 2020;14(9):1175-97.
298. Wang R, Xue S, Liu Y, Peng M, Guo B. The correlation of long non-coding RNA NEAT1 and its targets microRNA (miR)-21, miR-124, and miR-125a with disease risk,

severity, and inflammation of allergic rhinitis. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(4):e22946.

299. Yuan J, Chen H, Ge D, Xu Y, Xu H, Yang Y, et al. Mir-21 Promotes Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction Via Targeting Smad7. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(6):2207-19.

300. Li X, Wei Y, Wang Z. microRNA-21 and hypertension. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2018;41(9):649-61.

301. Panagal M, Biruntha M, Vidhyavathi RM, Sivagurunathan P, Senthilkumar SR, Sekar D. Dissecting the role of miR-21 in different types of stroke. *Gene*. 2019;681:69-72.

302. Kan C, Cao J, Hou J, Jing X, Zhu Y, Zhang J, et al. Correlation of miR-21 and BNP with pregnancy-induced hypertension complicated with heart failure and the diagnostic value. *Experimental and therapeutic medicine*. 2019;17(4):3129-35.

303. Ménard C, Wilson AM, Dejda A, Miloudi K, Binet F, Crespo-Garcia S, et al. miR-106b suppresses pathological retinal angiogenesis. *Aging*. 2020;12(24):24836-52.

304. Zhang Y, Wang L, Xu J, Kong X, Zou L. Up-regulated miR-106b inhibits ox-LDL-induced endothelial cell apoptosis in atherosclerosis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2020;53(3):e8960.

305. Oh J, Matkovich SJ, Riek AE, Bindom SM, Shao JS, Head RD, et al. Macrophage secretion of miR-106b-5p causes renin-dependent hypertension. *Nat Commun*. 2020;11(1):4798.

306. Zhang T, Chen Z, Yang X, Fu R, Wang J, Xu H. Circulating miR-106b-5p serves as a diagnostic biomarker for asymptomatic carotid artery stenosis and predicts the occurrence of cerebral ischemic events. *Vascular medicine (London, England)*. 2020;25(5):436-42.

307. Liu Z, Yang D, Xie P, Ren G, Sun G, Zeng X, et al. MiR-106b and MiR-15b modulate apoptosis and angiogenesis in myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem*. 2012;29(5-6):851-62.
308. Elgebaly SA, Christenson RH, Kandil H, Ibrahim M, Rizk H, El-Khazragy N, et al. Nourin-Dependent miR-137 and miR-106b: Novel Biomarkers for Early Diagnosis of Myocardial Ischemia in Coronary Artery Disease Patients. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 2021;11(4).
309. Bulent Vatan M, Kalaycı Yigin A, Akdemir R, Tarik Agac M, Akif Cakar M, Aksoy M, et al. Altered Plasma MicroRNA Expression in Patients with Mitral Chordae Tendineae Rupture. *The Journal of heart valve disease*. 2016;25(5):580-8.
310. Madadi S, Saidijam M, Yavari B, Soleimani M. Downregulation of serum miR-106b: a potential biomarker for Alzheimer disease. *Archives of physiology and biochemistry*. 2020:1-5.
311. An N, Zhao W, Liu Y, Yang X, Chen P. Elevated serum miR-106b and miR-146a in patients with focal and generalized epilepsy. *Epilepsy research*. 2016;127:311-6.
312. Camkurt MA, Karababa İ F, Erdal ME, Kandemir SB, Fries GR, Bayazit H, et al. MicroRNA dysregulation in manic and euthymic patients with bipolar disorder. *Journal of affective disorders*. 2020;261:84-90.
313. Xie S, Niu W, Xu F, Wang Y, Hu S, Niu C. Differential expression and significance of miRNAs in plasma extracellular vesicles of patients with Parkinson's disease. *The International journal of neuroscience*. 2020:1-16.
314. Norsworthy PJ, Thompson AGB, Mok TH, Guntoro F, Dabin LC, Nihat A, et al. A blood miRNA signature associates with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease diagnosis. *Nat Commun*. 2020;11(1):3960.
315. Camkurt MA, Karababa F, Erdal ME, Bayazit H, Kandemir SB, Ay ME, et al. Investigation of Dysregulation of Several MicroRNAs in Peripheral Blood of Schizophrenia Patients. *Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official*

scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology. 2016;14(3):256-60.

316. Miao R, Dong X, Gong J, Wang Y, Guo X, Li Y, et al. hsa-miR-106b-5p participates in the development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension via targeting matrix metalloproteinase 2. *Pulmonary circulation*. 2020;10(3):2045894020928300.

317. Soeda S, Ohyashiki JH, Ohtsuki K, Umezu T, Setoguchi Y, Ohyashiki K. Clinical relevance of plasma miR-106b levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of molecular medicine*. 2013;31(3):533-9.

318. Elnady HG, Sherif LS, Kholoussi NM, Ali Azzam M, Foda AR, Helwa I, et al. Aberrant Expression of Immune-related MicroRNAs in Pediatric Patients with Asthma. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2020;9(4):246-55.

319. Zhang Y, He W, Gao YF, Fan ZM, Gao CL, Xia ZK. MicroRNA-106b regulates skeletal muscle insulin sensitivity and glucose homeostasis by targeting mitofusion-2. *Mol Med Rep*. 2017;16(5):6858-63.

320. Yu Y, Jia YY, Wang M, Mu L, Li HJ. PTGER3 and MMP-2 play potential roles in diabetic nephropathy via competing endogenous RNA mechanisms. *BMC nephrology*. 2021;22(1):27.

321. Flowers E, Kanaya AM, Fukuoka Y, Allen IE, Cooper B, Aouizerat BE. Preliminary evidence supports circulating microRNAs as prognostic biomarkers for type 2 diabetes. *Obesity science & practice*. 2017;3(4):446-52.

322. Perri R, Nares S, Zhang S, Barros SP, Offenbacher S. MicroRNA modulation in obesity and periodontitis. *Journal of dental research*. 2012;91(1):33-8.

323. Yin H, Wang S, Gu C. Identification of Molecular Signatures in Mild Intrinsic Atopic Dermatitis by Bioinformatics Analysis. *Annals of dermatology*. 2020;32(2):130-40.




ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Δημοσιευμένη εργασία στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής:

Circulating miRNAs as Potential Biomarkers in Prostate Cancer Patients Undergoing Radiotherapy

Kachris S, Papadaki C, Rounis K, Tsitoura E, Kokkinaki C, Nikolaou C, Sourvinos G, Mavroudis D. *Cancer Manag Res.* 2021 Nov 2;13:8257-8271. doi: 10.2147/CMAR.S325246. eCollection 2021.

Circulating miRNAs as Potential Biomarkers in Prostate Cancer Patients Undergoing Radiotherapy

Stefanos Kachris¹ 
 Chara Papadaki² 
 Konstantinos Rounis³
 Eliza Tsitoura⁴
 Chrysanthi Kokkinaki⁴
 Christoforos Nikolaou⁵⁻⁷ 
 George Sourvinos⁴
 Dimitrios Mavroudis^{2,3}

¹Department of Radiation Oncology, University General Hospital, Heraklion, Crete, Greece; ²Laboratory of Translational Oncology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece; ³Department of Medical Oncology, University General Hospital, Heraklion, Crete, Greece; ⁴Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece; ⁵Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece; ⁶Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB), Foundation of Research and Technology (FORTH), Heraklion, Crete, Greece; ⁷Institute of Bioinnovation, Biomedical Science Research Center "Alexander Fleming", Athens, Greece

Introduction: Disease recurrence is a major concern in patients with localized prostate cancer (PCa) following treatment with radiotherapy (RT), and few studies have evaluated the clinical relevance of microRNAs (miRNAs) prior and post-RT.

Purpose: We aimed to investigate the significance of miRNAs in the outcomes of prostate cancer patients undergoing radiotherapy and to identify the related pathways through bioinformatics analysis.

Materials and Methods: The expression levels of miR-21, miR-106b, miR-141 and miR-375 involved in the response to radiotherapy were assessed by RT-qPCR in the serum of PCa patients (n=56) prior- and post-RT.

Results: Low expression levels of miR-106b prior-RT were associated with extracapsular extension and seminal vesicles invasion by the tumor (p=0.031 and 0.044, respectively). In the high-risk subgroup (n=47), post-RT expression levels of miR-21 were higher in patients with biochemical relapse (BR) compared to non-relapse (p=0.043). Also, in the salvage treatment subgroup (post-operative BR; n=20), post-RT expression levels of miR-21 and miR-106b were higher in patients with BR compared to non-relapse (p=0.043 and p=0.032, respectively). In the whole group of patients, high expression levels of miR-21 prior-RT and of miR-106b post-RT were associated with significantly shorter overall survival (OS; p=0.049 and p=0.050, respectively). No associations were observed among miR-141 and miR-375 expression levels with clinicopathological features or treatment outcome. Bioinformatics analysis revealed significant enrichment in DNA damage response pathways.

Conclusion: Circulating miRNAs prior or post-RT may hold prognostic implications in patients with PCa.

Keywords: prostate cancer, radiotherapy, salvage radiotherapy, circulating microRNAs, high risk, biochemical relapse

Introduction

Prostate cancer is the most commonly diagnosed cancer and a leading cause of cancer-related death in men worldwide.¹ RT is a standard treatment option along with surgery, hormone therapy and chemotherapy.² However, the efficacy of RT is impeded by inherent resistance of tumor cells.³

RT utilizes targeted ionizing radiation to induce DNA damage either directly or indirectly through reactive oxygen species (ROS).⁴ DNA damage response (DDR) pathways are activated to repair the damage or to induce arrest of cell-cycle progression or apoptotic cell death.⁵ Radioresistance mechanisms to RT-induced cell death or

Correspondence: Dimitrios Mavroudis
 Laboratory of Translational Oncology,
 School of Medicine, University of Crete,
 Heraklion, 71110, Greece
 Tel +30 2810392750
 Email mavroudis@uoc.gr

apoptosis include DNA repair,⁶ impaired apoptotic signaling after DNA damage,⁷ elevation of antioxidant enzymes,⁸ impaired intracellular signaling pathways such as Heat Shock Protein 90 (HSP90)⁹ and activation of epithelial to mesenchymal transition (EMT) pathways.¹⁰

Despite the progress in emerging biomarkers, such as PCA3 score and Prostate Health Index¹¹ that improve the specificity of prostate-specific antigen (PSA) and provide useful information about disease aggressiveness, the results are otherwise inconclusive.¹² In addition, there is a paucity of molecular biomarkers for the prediction of relapse in patients with localized prostate cancer receiving definitive RT as a single treatment modality or in the salvage setting.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs (18–23nt) that regulate a plethora of physiological and pathological procedures.¹³ MiRNAs exert their function by regulating gene expression at post-transcriptional level.¹⁴ MiRNAs' expression is deregulated in human malignancies and could either act as oncomirs or tumor suppressors, depending on the context.¹⁵ MiRNAs are significantly stable in tissues and in biological fluids such as serum and plasma.¹⁶ In the last few years, miRNAs have been proposed as promising biomarkers for cancer diagnosis, prognosis, and prediction of treatment outcome¹⁷ and have been recognized as liquid biopsy biomarkers.

Mounting evidence suggests that miRNAs expression is modulated after irradiation.¹⁸ Consequently, miRNAs regulate components involved in DDR machinery.¹⁸ MiR-21, miR-106b, miR-141 and miR-375, among others, have been shown to associate with the pathogenesis and prognosis of prostate cancer.^{19–22} Moreover, their expression is modulated post irradiation in prostate cancer cells.²³ In addition, miR-141 and miR-106b have been proposed as potential prognostic biomarkers as they are differentially expressed in prostate cancer cell lines of different radiosensitivity.²⁴ Mir-21 has also been demonstrated to mediate radioresistance²⁵ as well as it was overexpressed in hypoxic conditions in prostate cancer cells,²⁶ leading to more increased aggressiveness. However, the results from miRNA profiling studies investigating the prediction of biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with PCa, vary among studies.²⁷ Furthermore, there are limited results regarding the role of miRNAs in the prediction of post-surgery RT outcomes²⁷ or development of distant metastasis.²⁸

In the present study, we investigated the role of circulating miRNAs as possible non-invasive biomarkers for

monitoring patients undergoing RT. We assessed the serum miR-21, miR-106b, miR-141 and miR-375 expression levels prior- and post-RT in PCa patients undergoing RT and evaluated their significance in patients' outcomes. We also performed a bioinformatic analysis to identify the key mRNA targets as well as the molecular pathways involved by the miRNAs of our study.

Materials and Methods

Patients and Sample Collection

In the current study, clinical and molecular data from 56 patients with histologically confirmed localized prostate adenocarcinoma who received definitive curative RT in the University Hospital of Heraklion, from January 2013 until July 2016, were prospectively collected. Patients were treated with 3-D conformal RT, which was the standard approach during that period in our department. RT was given as primary, adjuvant or salvage treatment. Radiation doses ranged from 64.8 Gy to 71 Gy, personalized per patient. Post radical prostatectomy (RP) biochemical relapse (BR) was defined as two consecutive rising PSA values ≥ 0.2 ng/mL.²⁹ The BR post definitive RT was defined as a rise in PSA levels >2 ng/mL compared to its nadir value.³⁰ In addition, patients were categorized based on their risk of relapse for localized prostate cancer according to ESMO guidelines³¹ and by D'Amico et al.³² More specifically, patients were categorized into three prognostic subgroups based on the following characteristics: 1) low risk: T1a-T2a, Gleason score=6, PSA<10 ng/mL; 2) intermediate risk: T2b-T2c, Gleason score=7, PSA=10–20 ng/mL; and 3) high risk: T \geq T3a or Gleason score=8–10 or PSA>20 ng/mL.

Relapse-free survival (RFS) was defined as the time duration from the start of RT until BR or death. Overall survival (OS) was defined as the time duration from the start of RT until the time of death. Patients who had not progressed or they were alive at the time of data collection were censored for RFS or OS at the time of last follow-up, respectively.

Two peripheral whole blood samples of 3 mL each were collected from each patient by experienced nurses, with all precautions to avoid hemolysis. The first sample was taken just before the first and the second sample just after the last RT session, into tubes without anticoagulant. Coagulated samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Serum was carefully collected in 1.5 mL RNase-free tubes and immediately stored at -80°C until further

process. Thawed frozen sera were centrifuged for 3 min at 11,000 g to remove residual cells and debris.

Approval Committee

This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Human Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion (ID: 16363). Written informed consent was obtained from all participants.

RNA Isolation

Serum samples were subsequently spiked-in with known quantity of *Caenorhabditis elegans* microRNA, cel-mir-39 (miRNeasy Serum/Plasma spike-in control, Qiagen) as a control of extraction and amplification procedures. Specifically, serum samples of 300 µL were spiked with 8.8×10^8 copies of cel-mir-39 microRNA and small RNAs were isolated by the NucleoSpin[®] miRNA Plasma Kit (Macherey-Nagel) according to manufacturer's instructions.

Quantitative Real-Time PCR Analysis and miRNA Expression

TaqMan technology (Applied Biosystems) was used for reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) reactions, according to manufacturer's instructions. In brief, 2 µL of RNA input were used for cDNA synthesis in 10 µL reactions, including 2 µL of stem loop-specific primer for each miRNA, 0.1 µL dNTPs, 0.75 µL reverse transcriptase, 1 µL 10x reaction buffer, 0.13 µL RNase inhibitor and 4.02 µL ddH₂O. cDNAs were subsequently diluted threefold and 2 µL of diluted cDNA were used in 10 µL RT-qPCR using TaqMan Universal Master mix II.no UNG including 0.5 µL primer, 5 µL 2× reaction mix and 2.5 µL ddH₂O. All the assays were performed in triplicates. Appropriate negative controls were used in both cDNA synthesis and RT-qPCRs, where RNA input was replaced by H₂O and no template control was used, respectively. TaqMan[™] Assay Ids of the examined microRNAs are depicted in [Table S1](#). Relative changes in miRNA abundance in samples after RT were calculated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using as reference cel-mir-39, using the following equation:

$$\text{Relative change} = 2^{-[(Ct_{\text{miR}\#} - Ct_{\text{cel-mir-39}})_{\text{before}} - (Ct_{\text{miR}\#} - Ct_{\text{cel-mir-39}})_{\text{after}}]}$$

For the purposes of our analysis, patients were divided into two groups: 1) patients with relative change values of ≥ 1 are characterized by higher expression of each miRNA prior RT and 2) patients with relative change values of < 1 are characterized by higher expression of each miRNA post RT.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the SPSS software package, version 22.0 (SPSS Inc. Chicago, IL). Descriptive statistics were applied to define and describe nominal and categorical values. Correlations of expression between the different miRNAs and were performed by Spearman's test. Spearman's correlation coefficient was also applied to examine any potential correlation with miRNA levels expression levels before RT with PSA levels prior to RT. The chi-squared test was used to estimate potential associations between miRNA expression and clinicopathological characteristics. Mann-Whitney *U*-test was applied to examine the miRNA levels as continuous variables with the rates of biochemical recurrence post-RT and clinicopathological features. The associations between circulating miRNA expression levels and RFS or OS were assessed by Kaplan-Meier method, log rank test (Mantel-Cox) and Cox proportional hazard regression models. Patients were divided into high and low expression according to the median value for each miRNA expression. Patients with miRNA expression above or equal to the median values were characterized as having high, whereas patients with miRNA expression below the median as having low expression. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

miRNA Gene Target and Pathway Enrichment Analysis

TarBase was used to retrieve the protein coding gene targets for each of the investigated miRNA.³⁴ For each miRNA, we obtained the full set of human protein coding genes that were found associated in cancerous tissues. For all the four miRNAs, we were able to identify more than 1000 protein coding gene targets. Much smaller numbers of protein coding targets were found associated with prostate cancer tissues (181 targets for hsa-miR-106b-5p; 0 targets for hsa-miR-141-3p; 1 target for hsa-miR-21-3p and 1 target for hsa-miR-375) an effect probably associated with the lack of datasets from prostate cancer biopsies. Therefore, we decided to proceed with the larger number of genes associated with cancerous tissues, as mentioned above. Most of the targets

were miRNA-specific; however, 628 out of 3048 targets (approximately 20%) were shared by at least two miRNAs (Figure 1). Gene and gene target overlaps were assessed with the use of the Jaccard similarity coefficient, which is given by the ratio of the two sets' intersection over their union. We then analyzed the subset of 628 genes for particular functional enrichments. gProfiler³⁵ was used to calculate the enrichment significance for Gene Ontology (GO) and for Biological Pathways (BP) as compiled by the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Protein-protein interaction (PPI) analysis was performed with the STRING database (STRING-DB; <https://string-db.org>).³⁶ Clustering was performed with Markov cluster (MCL) as implemented by STRING-DB.

Results

Study Design and Patients' Characteristics

The flow chart of the study and patients' characteristics are shown in Figure 2 and Table 1, respectively. A total of 56 patients were included in the study. The median age was 71 years (range 51–86 years), median PSA before RT was 0.5 (range 0–45.56), whereas 48.1% of the patients had a Gleason score 8–10 (Table 1). The median biochemical

relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) have not yet been reached. After a median follow-up time of 4.8 years, 15 patients (26.8%) developed biochemical relapse (BR) and 9 (16.1%) patients died. PSA values distribution prior RT was significantly higher in patients who experienced biochemical relapse compared to those without relapse (Figure S1; Mann-Whitney *U*-test, $p=0.011$).

miRNA Expression and Statistical Correlations

No correlations were observed among miRNAs expression and PSA levels prior RT administration (Figure S2). Low expression levels of miR-106b prior-RT were correlated with extracapsular extension and seminal vesicles invasion (Mann-Whitney *U*-test, $p=0.031$ and $p=0.044$, respectively; Table 2 and Figure 3). No other significant correlations were observed among miRNAs expression prior-RT and clinicopathological characteristics (Mann-Whitney *U*-test, $p>0.05$). Wilcoxon test revealed no significant differences among miRNAs expression prior and post-RT (Figure S3). However, significant correlations were observed between expression levels of the different miRNAs prior and post-RT (Table 3). A strong correlation was observed between miR-21 expression and miR-141

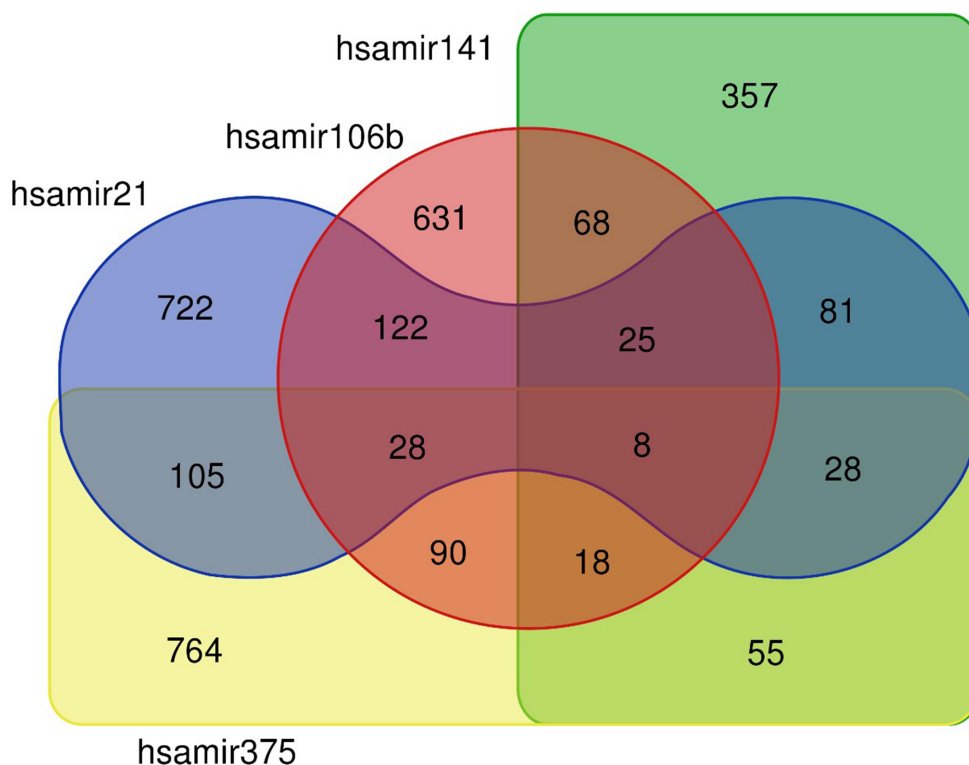


Figure 1 Venn diagram depicting common and specific protein-coding targets of the four analyzed miRNAs.

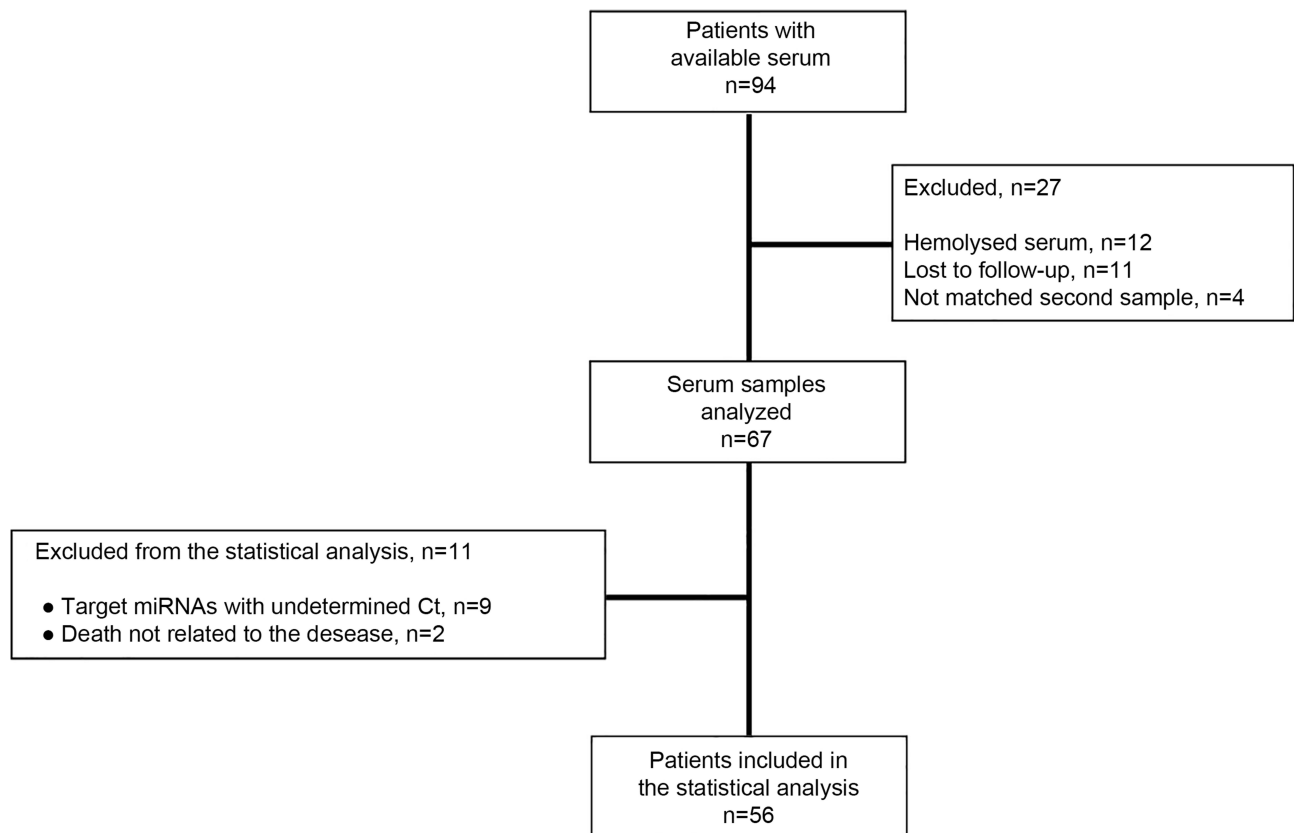


Figure 2 Flow chart of the study.

and miR-375 before RT (Spearman's ρ , 0.764; $p < 0.001$ and Spearman's ρ , 0.699; $p < 0.001$, respectively) and post-RT (Spearman's ρ , 0.752; $p < 0.001$ and Spearman's ρ , 0.690; $p < 0.001$, respectively). Furthermore, a strong correlation was observed between miR-141 and miR-375 before RT (Spearman's ρ , 0.807; $p < 0.001$) and post-RT (Spearman's ρ , 0.844; $p < 0.001$) (Table 3).

miRNA Expression Levels and Clinical Outcome

No significant differences were observed between expression levels of the examined miRNAs prior and post-RT and BR in the whole patients' group. However, in the high-risk subgroup ($n=47$), patients who experienced BR after RT, had higher post-RT miR-21 expression levels compared to patients without relapse ($p=0.043$) (Table 4 and Figure 4A). Also, in the subgroup of patients who received RT as salvage treatment ($n=20$) higher post-RT miR-21 and miR-106 expression levels were observed in patients who experienced BR compared to those without relapse ($p=0.043$ and $p=0.032$, respectively) (Table 4 and Figure 4B and C). No associations were observed between

miRNA expression and RFS. However, increased expression levels of miR-21 prior-RT and miR-106 post-RT were associated with significantly shorter OS ($p=0.049$ and $p=0.050$, respectively; Figure 5). No correlations were observed between the remaining two miRNAs and OS.

mRNA Target and Pathway Enrichment Analysis

KEGG pathway analysis from 628 genes that are common targets for at least two miRNAs revealed strong functional association with a number of cancer types including prostate cancer, as well as for general miRNA deregulation in cancers. The top 19 most enriched, non-redundant biological processes ranked according to an adjusted p -value are shown in Table 5 and Figure 6. Interestingly, pathways related to DNA repair such as FoxO, p53 and Hippo signaling were significantly enriched (Table 5 and Figure 6). In an attempt to visualize the relationships between the protein coding genes targeted by the different miRNAs, we obtained the subset of genes that were enriched in at least one KEGG pathway (Table 5) and created their protein-protein interaction network with the

Table 1 Patients' Characteristics

Characteristics	All Patients	
	N	%
Number of patients	56	
Age (years) Median (range)	71 (51–86)	
PSA before RT Median (range)	0.5 (0–45.56)	
Gleason score		
6	2	3.6
7	27	48.2
8–10	27	48.2
RT dosage (Gy) Mean (range)	69 (63–72)	
Risk groups		
Low	0	0
Intermediate	9	16.1
High	47	83.9
Radical prostatectomy		
No	17	30.4
Yes	39	69.6
Resection		
R0	18	46.1
R1	21	53.8
R2	0	0
Biochemical relapse post-radical prostatectomy		
No	19	48.7
Yes	20	51.3
Reason for RT administration		
Adjuvant post R1 resections	19	33.9
Definitive treatment as single modality	17	30.4
Salvage treatment for rising PSA after surgery	20	35.7
Anti-androgen treatment during RT		
Yes	37	66.1
No	19	33.9
Extra-prostatic extension		
Yes	31	55.3
No	13	23.2
No data	12	21.4
Perineural invasion		
Yes	24	42.8
No	15	26.7
No available data	17	30.3

(Continued)

Table 1 (Continued).

Characteristics	All Patients	
	N	%
Seminal vesicles invasion		
Yes	18	32.2
No	25	44.6
No available data	13	23.2
Lymph node infiltration		
Yes	6	10.7
No	36	64.3
No available data	14	25.0
Biochemical relapse post-RT		
Yes	15	26.8
No	41	73.2
Death		
Yes	9	16.1
No	47	83.9

Abbreviations: Low risk, T1a–T2a, Gleason=6, PSA<10 ng/mL; intermediate risk, T2b–T2c, Gleason=7, PSA 10–20 ng/mL; high risk, T≥T3a or Gleason score=8–10 or PSA>20 ng/mL; Gy, Gray.

use of STRING-DB. The network consisted of 90 genes is shown in [Figure 7](#). Slight tendency for common occurrence of targets of hsa-miR-21 and hsa-miR-106b (blue-orange connecting edges, respectively; [Figure 7](#)) is visible in the network and also quantified in an increased Jaccard similarity for this particular combination ([Table 6](#)).

Discussion

In the present study, we assessed the expression levels of four miRNAs in serum prior- and post-RT and evaluated their prognostic significance in PCa patients. We found that low expression levels of miR-106b prior-RT were correlated with extraprostatic extension and seminal vesicles invasion. In addition, patients in the high-risk subgroup who experienced BR had significantly higher distributions of post-RT levels of miR-21. Furthermore, in the salvage RT-treated subgroup, patients who experienced BR had significantly higher post RT mir21 and mir106b distribution levels compared to those without recurrent disease. Most importantly, high expression levels of miR-21 prior and of miR-106b post-RT were associated with shorter OS. Finally, bioinformatics analysis of mRNA targets revealed interesting associations related to DNA repair pathways regulated by the examined miRNAs.

MiR-21 is a well-known oncomir with regulatory roles in cell proliferation, apoptosis, epithelial-mesenchymal

Table 2 Correlation of miRNA Expression Levels with Clinical Parameters Prior-RT (p Values are Shown)

Variable	miR-21	miR-106b	miR-141	miR-375
Extraprostatic extension	0.969	0.031*	0.122	0.837
PNI	0.194	0.484	0.899	0.470
SVI	0.228	0.044*	0.558	0.318
LN infiltration	0.746	0.175	0.983	0.834
BR prior-RT	0.182	0.848	0.960	0.279
BR post-RT	0.554	0.937	0.816	0.449

Notes: Mann–Whitney *U*-test, * $p \leq 0.05$.

Abbreviations: SVI, seminal vesicle invasion; PNI, perineural invasion; LN, lymph node; BR, biochemical relapse.

transition (EMT) and chemoresistance.³⁷ MiR-21 mediates androgen-induced prostate cancer cell proliferation and is sufficient for androgen-dependent tumors to overcome castration-mediated growth arrest.^{38,39} Also, miR-21 promotes prostate cancer cell proliferation by targeting PTEN⁴⁰ whereas, by regulating MARCKS it promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells.⁴¹

MiR-21 is commonly up-regulated in cancer tissue in several types of malignancies, including PCa,⁴² thus it has been proposed as a potential biomarker in the prognosis of PCa patients.³⁷ Specifically, deregulated circulating miR-21 has been shown to distinguish PCa patients from healthy adults and local from metastatic disease.⁴³ It has also been proposed as predictor of chemotherapy efficacy in metastatic hormone refractory disease.⁴⁴ In addition, up-regulated expression of tissue miR-21 is an independent predictor of 5-yr biochemical recurrence.⁴⁵ This is in accordance with our results that higher circulating levels of miR-21 prior-RT were associated with increased rates of BR in the subgroup of

high-risk patients and those receiving salvage RT. Furthermore, we showed for the first time in this study that high expression levels of circulating miR-21 prior-RT are associated with shorter OS.

MiR-106b is a member of the miR-106b-25 cluster, which is frequently deregulated in several types of cancer, including PCa and has been associated with cancer progression.⁴⁶ It has been found to play dual role in cancer development, acting either as oncomir or as tumor suppressor.⁴⁷ MiR-106b has been shown to regulate apoptosis and focal adhesion-related pathways.⁴⁸ Also, miR-106b promotes cell proliferation and invasion⁴⁹ and in another study was shown that its hypoxia-induced over-expression results in a more aggressive phenotype.⁴⁶ It has also been shown that miR-106b is highly expressed in metastatic tissues compared to normal and is correlated with bone metastasis.²¹ In contrast, we herein found that lower expression levels of miR-106b before RT were correlated with locally advanced disease.

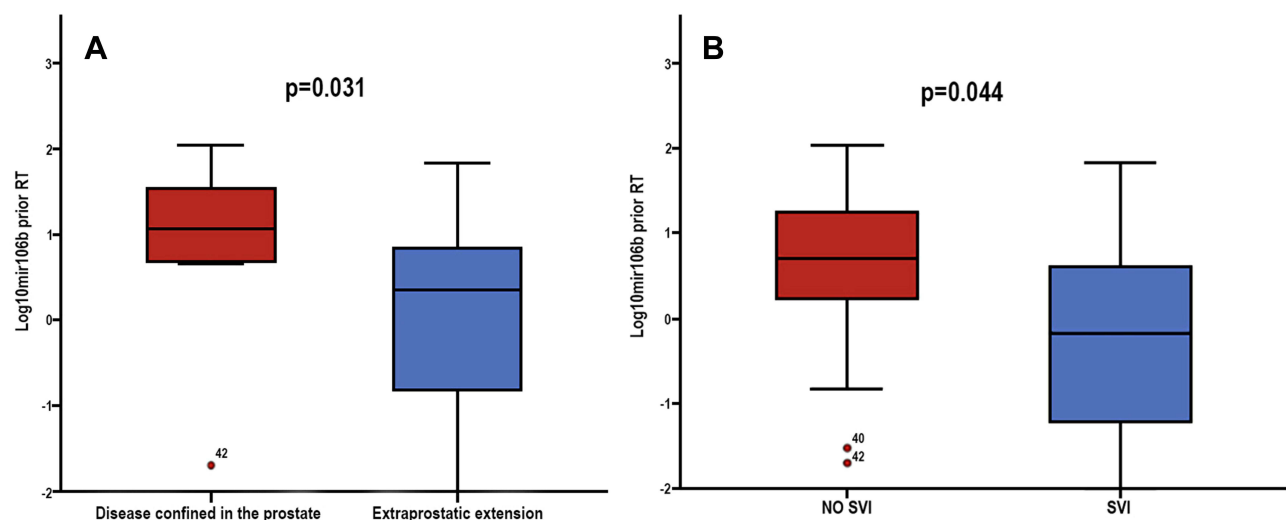


Figure 3 Fold change of serum miR-106b expression levels prior-RT, according to (A) extraprostatic extension and (B) seminal vesicles invasion (SVI). Mann–Whitney *U*-test was used to determine statistically significant differences, and the results are displayed on box plots. Horizontal line depicts median, whereas the length of the boxes is the interquartile range that represents values between the 75th and 25th percentiles of individual fold change expression values. p Values are shown.

Table 3 Correlation Coefficients Among the Four miRNAs

Prior-RT				
	miR-21	miR-106	miR-141	miR-375
miR-21	I			
miR-106	0.414*	I		
miR-141	0.764**	0.518**	I	
miR-375	0.699**	0.404*	0.807**	I
Post-RT				
miR-21	I			
miR-106	0.373*	I		
miR-141	0.752**	0.414*	I	
miR-375	0.690**	0.397*	0.844**	I

Notes: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

In irradiated prostate cancer cells, miR-106b increases radioresistance by overriding p21-activated cell cycle arrest.⁵⁰ In addition, similar results were obtained for colorectal⁵¹ and cervical cancer cells.⁵² Over-expression of miR-106b was also correlated with increased risk of early recurrence.²¹ In accordance with the above results, we observed that higher post-RT levels of miR-106b were associated with increased rates of BR in the subgroup of patients receiving salvage RT. Moreover, we found that higher post-RT levels are associated with shorter OS. As it is noted, limited data exist regarding miR-106b role in clinical samples, and therefore its prognostic significance shown for the first time in our study, merits further evaluation in PCa.

MiR-141 also plays a major role in PCa, targeting genes that regulate apoptosis, cell proliferation and EMT transition.⁵³ It was one of the first circulating miRNAs

associated with PCa pathogenesis and poor prognosis.⁵⁴ MiR-375 is involved in cell proliferation and EMT transition in PCa.⁵⁴ It also stimulates cell growth and invasion and impairs apoptosis.⁵⁴ Higher expression levels of miR-375 and miR-141 are associated with worse prognosis, high Gleason scores, positive lymph nodes, castration resistance and metastatic disease.⁵⁵ Although their expression prior and post-RT was strongly correlated with that of miR-21, probably due to underlying common mechanisms of regulation, we did not find significant associations with pathological features or with patients' outcome.

KEGG pathway enrichment analysis revealed 19 significantly enriched pathways mostly related to cancer. Among these, p53, FoxO and Hippo signaling are widely reported to be correlated with the DDR.^{56–58} Interestingly, major regulatory components of the above pathways such as MDM2, FOXO3 and YAP1 were included in the 90 genes that were enriched in at least one KEGG pathway. Furthermore, the increased Jaccard similarity for common occurrence of targets of miR-21 and miR-106b suggest a functional link between these two miRNAs related to DDR.

Most of our knowledge about the role of miRNAs in radiation response comes from in vitro studies. Among others, mir-21 was upregulated during RT in breast cancer stem cell cultures and was associated with negative prognostic factors such as ki-67 and triple-negative phenotype in breast cancer patients.⁵⁹ In non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, mir-21 increased radioresistance either by upregulating hypoxia-inducible factor 1a⁶⁰ or by downregulating PTEN, SNX1, and SGPP1 expression and increasing Akt phosphorylation⁶¹ or even by inhibiting programmed cell death.⁶² Inhibition of mir-21 decreased radioresistance in esophageal cancer cells through activation of PTEN⁶³ and in malignant glioma cells through inhibition of PI3k/AKT pathway⁶⁴ or increased

Table 4 Association of miRNAs Expression Levels with Post-RT Biochemical Relapse in the Subgroups of High-Risk (n=47) and Salvage Treatment (n=20) Groups of Patients

miR-21		miR-106b		miR-141		miR-375	
Before RT	Post-RT	Before RT	Post-RT	Before RT	Post-RT	Before RT	Post-RT
High-risk group (n=47)							
0.334	0.043*	0.841	0.444	0.678	0.119	0.279	0.147
Salvage treatment group (n=20)							
0.866	0.045*	0.526	0.033*	0.928	0.190	0.499	0.128

Notes: Mann-Whitney U-test, * $p < 0.05$.

Abbreviations: High risk, T \geq T3a or Gleason score=8–10 or PSA>20 ng/mL; RT, radiotherapy.

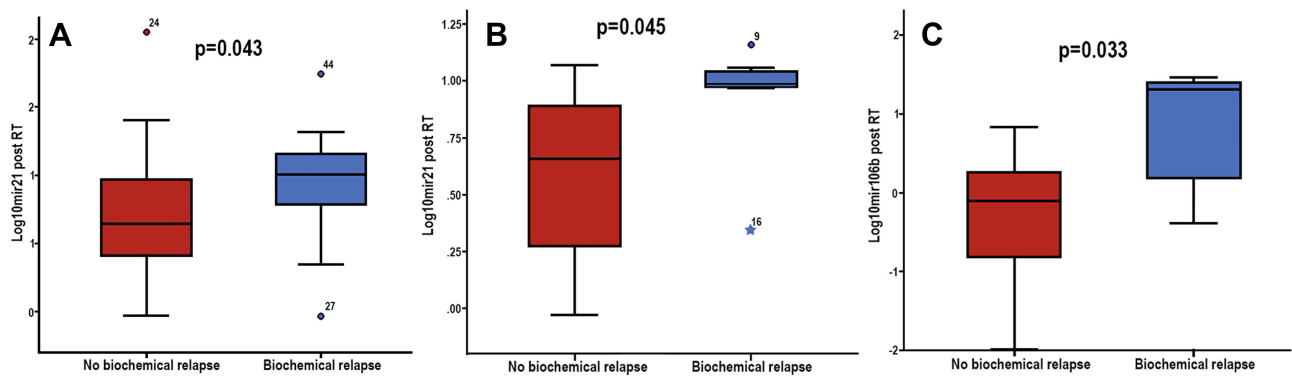


Figure 4 Mann–Whitney *U*-test demonstrating the differences in the distributions of (A) miR-21 fold change of expression post RT, in the high risk subgroup among those who experienced relapse and those without relapse, (B) mir21 and (C) miR-106b fold change of expression post RT, in the subgroup of salvage-treated among those who experienced biochemical relapse compared to those without relapse.

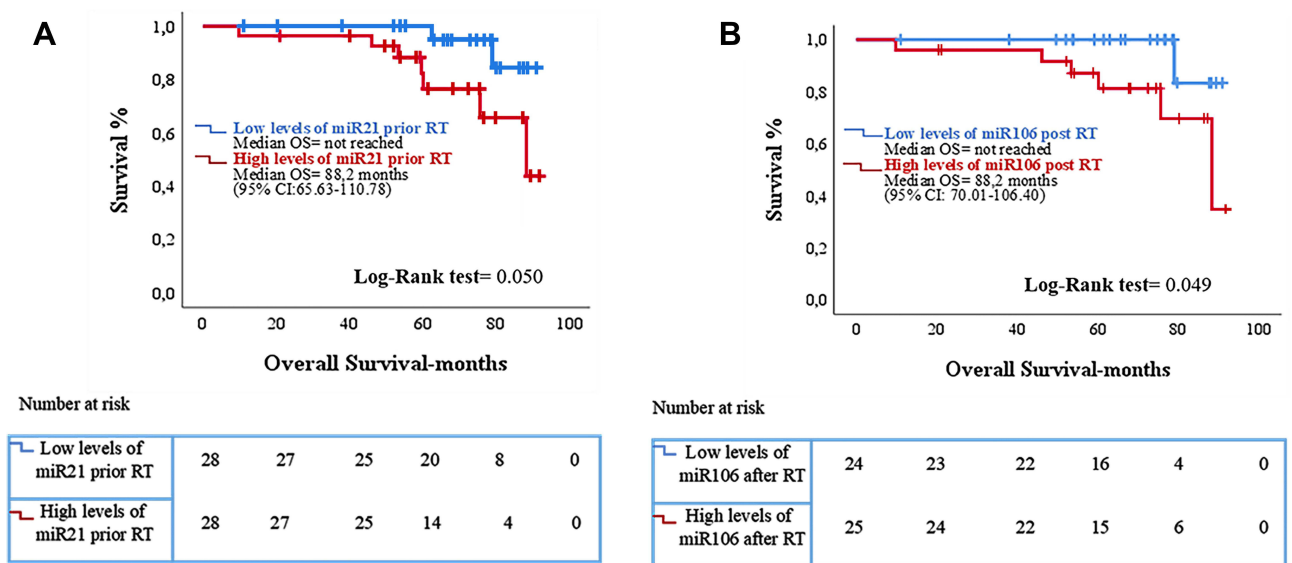


Figure 5 Kaplan–Meier analysis for overall survival (OS) according to miRNA expression in the serum of prostate cancer patients (n = 56). Patients were classified into high and low expression groups according to the median value of each miRNA. OS in patients with high or low expression of (A) miR-21 prior-RT and (B) miR-106 post-RT. Curves were compared using the log rank test. *p* Values are shown; RT, radiotherapy.

expression of PDCD4 and hMSH2.⁶⁵ It is also linked to radio-resistance due to DNA double-strand breaks repair.^{25,66} Over-expression of mir-106b in cervical cancer cells resulted in decreased radiosensitivity by negatively regulating Immediate Early Response 3 (*IER3*) gene.⁵² In the same study, Growth Arrest-Specific 5 (*GAS5*) noncoding RNA “sponged” mir-106b, resulting in increased radiosensitivity.

To the best of our knowledge, the present study is among the first to correlate circulating miRNAs with outcomes of PCa patients undergoing RT. Limitations of the current study include the small cohort of patients with limited statistical power and the lack of validation in an

independent patient group. Also, due to the small number of events post-RT, the associations of high miR-21 and miR-106b expression levels with shorter OS were not validated as independent predictors in a multivariate analysis. However, significant advantages strengthen the power of our results such as 1) pre-analytical and analytical parameters were thoroughly examined to avoid bias in miRNAs detection and quantification,⁶⁷ 2) blood samples and clinical information were prospectively collected and 3) follow-up time was adequate for our patient cohort. Nevertheless, further studies in an independent cohort of PCa patients are needed to confirm our findings.

Table 5 KEGG Enrichment Pathways for the Set of 628 Gene Targets Derived from the Combination of at Least Two miRNAs

Pathway	Enrichment p-value	Genes
MicroRNAs in cancer	5.75e-10	TGFB2, ABL1, CRKL, MAPK1, DICER1, MMP9, CCND1, E2F3, VEGFA, CCNG1, GLS, CCND2, CDKN1A, MDM2, MYC, THBS1, CYP11B1, MCL1, BCL2L11, CDC25A, CRK, DDIT4, STAT3, IRS1, BCL2, PTEN, BMPR2
FoxO signaling pathway	4.24e-05	TGFB2, MAPK1, TGFBR1, CCND1, FOXO3, CCND2, CDKN1A, PRKAB2, MDM2, IL6, IGF1R, SETD7, PIK3R1, BCL2L11, TGFBR2, STAT3, IRS1, PTEN, USP7
Cellular senescence	0.000151	MRE11A, TGFB2, MAPK1, TGFBR1, CCND1, E2F3, FOXO3, CCND2, CDKN1A, MDM2, IL6, MYC, PIK3R1, IGF1R, HIPK1, TGFBR2, CDC25A, BTRC, PTEN, PPP3R1
p53 signaling pathway	0.000208	SESN1, CCND1, CCNG1, CCND2, APAF1, TNFRSF10B, CDKN1A, MDM2, THBS1, IGF1R, BCL2, RRM2, PTEN
Chronic myeloid leukemia	0.000393	TGFB2, ABL1, CRKL, MAPK1, TGFBR1, CCND1, E2F3, CDKN1A, MDM2, MYC, PIK3R1, TGFBR2, CRK
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0.00166	EDN1, ICAM1, TGFB2, MAPK1, TGFBR1, CCND1, VEGFA, EGRI, IL1B, IL6, PIK3R1, TGFBR2, STAT3, BCL2
Bladder cancer	0.00156	MAPK1, MMP9, CCND1, E2F3, VEGFA, CDKN1A, MDM2, MYC, THBS1
HIF-1 signaling pathway	0.00209	TFRC, EDN1, MKNK2, MAPK1, PGK1, VEGFA, CDKN1A, PDHA1, IL6, IGF1R, PIK3R1, HK2, STAT3, BCL2
Hepatitis B	0.0024	MAVS, TGFB2, MAP3K1, MAPK1, MMP9, TGFBR1, CCND1, E2F3, APAF1, CDKN1A, IL6, MYC, PIK3R1, YWHAZ, STAT3, BCL2, PTEN
Focal adhesion	0.00499	BIRC3, VCL, ITGA6, CRKL, MAPK1, ITGB8, RAPGEF1, CCND1, VEGFA, CCND2, ROCK2, THBS1, IGF1R, PIK3R1, CRK, CTNNB1, PTK2, BCL2, PTEN, PAK2
Thyroid cancer	0.00527	TPR, MAPK1, CCDC6, CCND1, CDKN1A, MYC, CTNNB1, NCOA4
Cell cycle	0.00548	SMC1A, TGFB2, ABL1, CCND1, MCM3, E2F3, CCND2, CDKN1A, MDM2, MYC, CDC25A, YWHAZ, WEE1, YWHAG, PRKDC
Pathways in cancer	0.00559	BIRC3, TPR, HSP90AA1, ITGA6, TGFB2, ABL1, CRKL, MAPK1, MMP9, JAG1, TGFBR1, CCDC6, CCND1, E2F3, VEGFA, CCND2, GNA13, APAF1, NCOA3, CDKN1A, ROCK2, IL6ST, MDM2, IL6, MYC, IGF1R, PIK3R1, BCL2L11, GNAQ, APPL1, TGFBR2, CRK, CTNNB1, STAT3, PTK2, BCL2, PTEN, NCOA4
Colorectal cancer	0.00768	TGFB2, MAPK1, TGFBR1, CCND1, CDKN1A, MYC, PIK3R1, BCL2L11, APPL1, TGFBR2, CTNNB1, BCL2
Hippo signaling pathway	0.0195	MPP5, TGFB2, SMAD7, TGFBR1, CCND1, CCND2, PARD6B, MYC, YAPI, TGFBR2, YWHAZ, BTRC, CTNNB1, YWHAG, NF2, BMPR2
Endocrine resistance	0.0203	MAPK1, MMP9, JAG1, CCND1, E2F3, NCOA3, CDKN1A, MDM2, IGF1R, PIK3R1, PTK2, BCL2
Prostate cancer	0.0248	HSP90AA1, MAPK1, MMP9, CCND1, E2F3, CDKN1A, MDM2, IGF1R, PIK3R1, CTNNB1, BCL2, PTEN
Platinum drug resistance	0.0318	REV3L, BIRC3, MAPK1, APAF1, CDKN1A, TOP2A, MDM2, SLC31A1, PIK3R1, BCL2
Pancreatic cancer	0.0496	TGFB2, MAPK1, TGFBR1, CCND1, E2F3, VEGFA, CDKN1A, PIK3R1, TGFBR2, STAT3

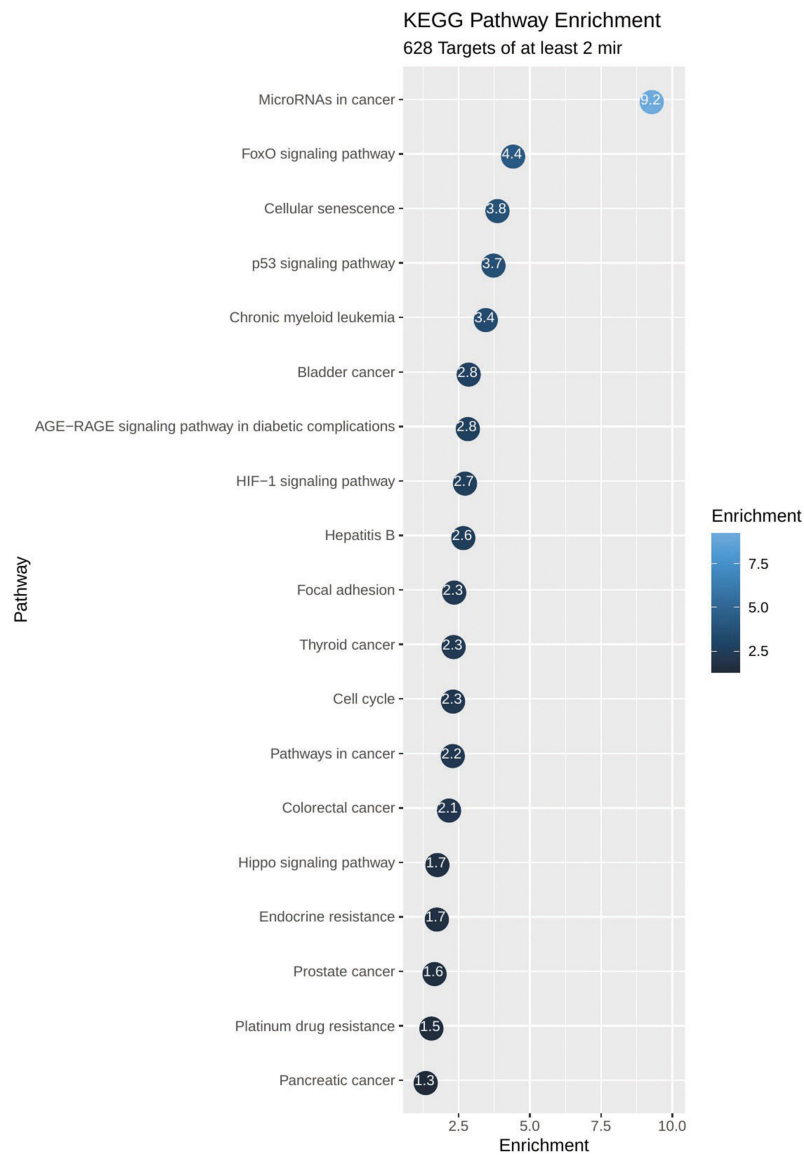


Figure 6 Functional enrichment plot of the set of 628 genes targeted by at least two miRNAs. Pathways related to prostate cancer, cellular functions, miRNAs deregulation and to DNA repair are shown to be significantly enriched. On the plot, each bubble represents a term and includes the significance of the enrichment as $-\log_{10}$ (p-value).

In summary, we herein show that serum miR-106b expression levels assessed prior-RT were correlated with locally advanced disease. Also, higher prior- or post-RT serum miR-21 and miR-106b expression levels were correlated with BR in the high risk and salvage RT-treated subgroups and with OS in the whole group of patients. Furthermore, using a combination of functional enrichment and protein-protein interaction networks, we showed that these miRNAs are involved in

cancer-related biological processes and particularly in DNA repair pathways. The above findings further confirm preclinical evidence for their potential role in mechanisms of radioresistance in PCa. Therefore, miR-21 and miR-106b assessment in the serum of PCa patients during the disease time course merits further evaluation to address their potential role as non-invasive biomarkers for monitoring patients who could benefit from RT.

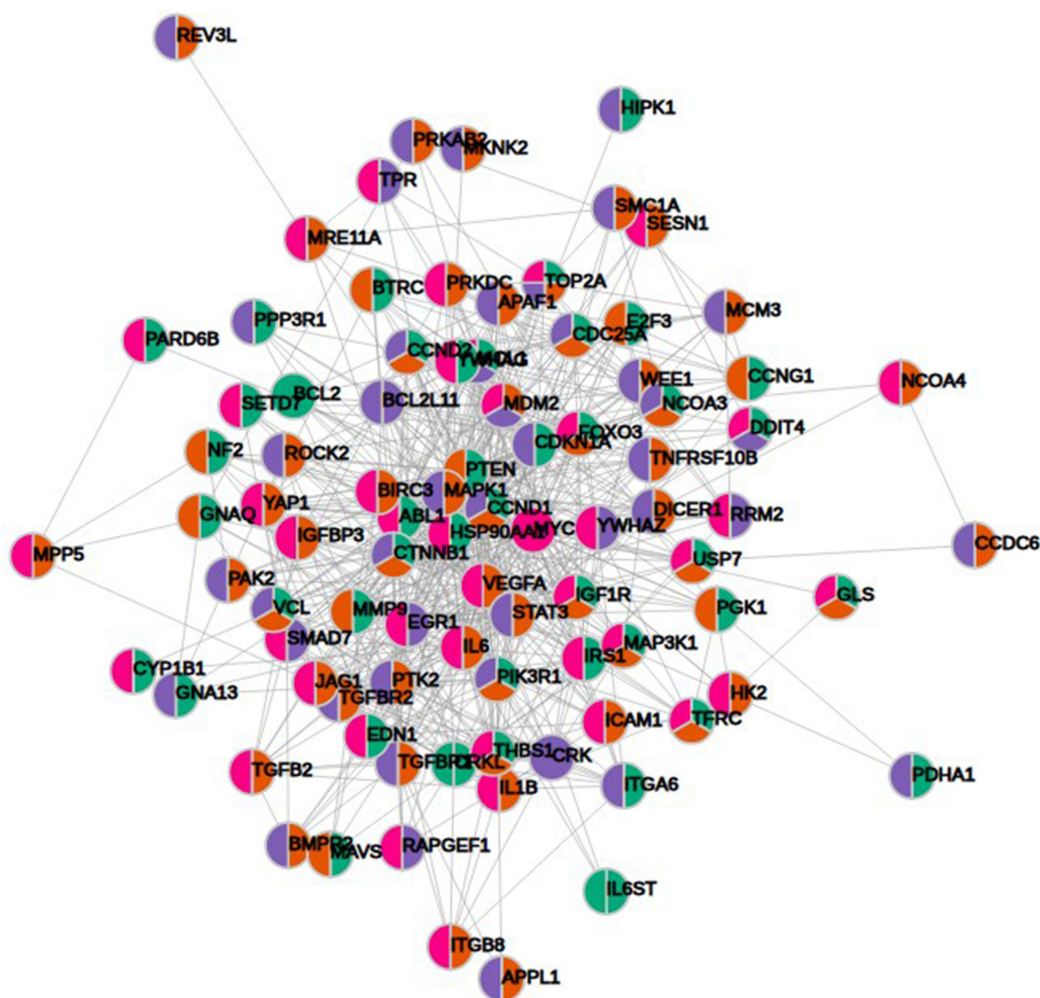


Figure 7 Protein–protein interaction network of 90 protein coding gene targets of at least two miRNAs with significant KEGG enrichments. Color-coding depends on the associated miRNA (blue, hsa-miR-21; orange, hsa-miR-106b; green, hsa-miR-141 and magenta, hsa-miR-375).

Conclusion

We herein demonstrate that the expression levels of miRNAs evaluated in the serum of patients undergoing radiotherapy may hold significant prognostic implications in PCa. Bioinformatic analysis suggests that the

unfavorable prognostic role of miR-21 and miR-106b could be related to their functional involvement in pathways related to DDR. Further studies are needed to investigate the potential functional role of these miRNAs in PCa.

Table 6 Common Protein Gene Targets with Pathway Enrichment Between miRNA Calculated as Jaccard Index (2*intersection/ Union)

miR (Total Genes)	hsa-miR-141 (45)	hsa-miR-21 (62)	hsa-miR-106b (47)	hsa-miR-375 (43)
hsa-miR-141		0.633	0.479	0.529
hsa-miR-21			0.717	0.633
hsa-miR-106b				0.286

Acknowledgments

We would like to thank Sevasti Dara for her help in graphic design. We are also grateful to all patients who signed the consent form and participated in this study.

Disclosure

The authors declare that they have no conflicts of interest regarding this work.

References

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7–30. doi:10.3322/caac.21590
- Halperin EC. *Perez & Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology*. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019.
- Huang RX, Zhou PK. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduction Targeted Ther*. 2020;5(1):60.
- Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*. 2019;25:101084. doi:10.1016/j.redox.2018.101084
- Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(12):2977–2992. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012
- Chatterjee P, Choudhary GS, Sharma A, et al. PARP inhibition sensitizes to low dose-rate radiation TMRSS2-ERG fusion gene-expressing and PTEN-deficient prostate cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(4):e60408. doi:10.1371/journal.pone.0060408
- Biau J, Chautard E, Verrelle P, Dutreix M. Altering DNA repair to improve radiation therapy: specific and multiple pathway targeting. *Front Oncol*. 2019;9:1009. doi:10.3389/fonc.2019.01009
- Fan M, Ahmed KM, Coleman MC, Spitz DR, Li JJ. Nuclear factor-kappaB and manganese superoxide dismutase mediate adaptive radioresistance in low-dose irradiated mouse skin epithelial cells. *Cancer Res*. 2007;67(7):3220–3228. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2728
- Skvortsova I, Skvortsov S, Stasyk T, et al. Intracellular signaling pathways regulating radioresistance of human prostate carcinoma cells. *Proteomics*. 2008;8(21):4521–4533. doi:10.1002/pmic.200800113
- Lee SY, Jeong EK, Ju MK, et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer*. 2017;16(1):10.
- Lopes Vendrami C, McCarthy RJ, Chatterjee A, et al. The utility of prostate specific antigen density, prostate health index, and prostate health index density in predicting positive prostate biopsy outcome is dependent on the prostate biopsy methods. *Urology*. 2019;129:153–159. doi:10.1016/j.urology.2019.03.018
- Shaw GL, Thomas BC, Dawson SN, et al. Identification of pathologically insignificant prostate cancer is not accurate in unscreened men. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2405–2411. doi:10.1038/bjc.2014.192
- Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview. *Methods Mol Biol*. 2017;1509:1–10.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5
- Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med*. 2012;4(3):143–159. doi:10.1002/emmm.201100209
- Tzimagiorgis G, Michailidou EZ, Kritis A, Markopoulos AK, Kouidou S. Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids. *Cancer Epidemiol*. 2011;35(6):580–589. doi:10.1016/j.canep.2011.02.016
- Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015;5(10):1122–1143. doi:10.7150/thno.11543
- Labbé M, Hoey C, Ray J, et al. microRNAs identified in prostate cancer: correlative studies on response to ionizing radiation. *Mol Cancer*. 2020;19(1):63. doi:10.1186/s12943-020-01186-6
- Wang Y, Lieberman R, Pan J, et al. miR-375 induces docetaxel resistance in prostate cancer by targeting SEC23A and YAP1. *Mol Cancer*. 2016;15(1):70. doi:10.1186/s12943-016-0556-9
- Melbø-Jørgensen C, Ness N, Andersen S, et al. Stromal expression of MiR-21 predicts biochemical failure in prostate cancer patients with Gleason score 6. *PLoS One*. 2014;9(11):e113039. doi:10.1371/journal.pone.0113039
- Hudson RS, Yi M, Esposito D, et al. MicroRNA-106b-25 cluster expression is associated with early disease recurrence and targets caspase-7 and focal adhesion in human prostate cancer. *Oncogene*. 2013;32(35):4139–4147. doi:10.1038/ncr.2012.424
- Gonzales JC, Fink LM, Goodman OB Jr, Symanowski JT, Vogelzang NJ, Ward DC. Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2011;9(1):39–45. doi:10.1016/j.clgc.2011.05.008
- Hummel R, Hussey DJ, Haier J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. *Eur J Cancer*. 2010;46(2):298–311. doi:10.1016/j.ejca.2009.10.027
- McDermott N, Meunier A, Wong S, Buchete V, Marignol L. Profiling of a panel of radioresistant prostate cancer cells identifies deregulation of key miRNAs. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2017;2:63–68. doi:10.1016/j.ctro.2017.01.005
- Hu B, Wang X, Hu S, et al. miR-21-mediated radioresistance occurs via promoting repair of DNA double strand breaks. *J Biol Chem*. 2017;292(8):3531–3540. doi:10.1074/jbc.M116.772392
- Bao B, Ahmad A, Kong D, et al. Hypoxia induced aggressiveness of prostate cancer cells is linked with deregulated expression of VEGF, IL-6 and miRNAs that are attenuated by CDF. *PLoS One*. 2012;7(8):e43726. doi:10.1371/journal.pone.0043726
- Pashaei E, Pashaei E, Ahmady M, Ozen M, Aydin N. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179543. doi:10.1371/journal.pone.0179543
- Nguyen PL, Haddad Z, Ross AE, et al. Ability of a genomic classifier to predict metastasis and prostate cancer-specific mortality after radiation or surgery based on needle biopsy specimens. *Eur Urol*. 2017;72(5):845–852. doi:10.1016/j.eururo.2017.05.009
- Cookson MS, Aus G, Burnett AL, et al. Variation in the definition of biochemical recurrence in patients treated for localized prostate cancer: the American Urological Association prostate guidelines for localized prostate cancer update panel report and recommendations for a standard in the reporting of surgical outcomes. *J Urol*. 2007;177(2):540–545.
- Roach M 3rd, Hanks G, Thames H Jr, et al. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO phoenix consensus conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;65(4):965–974. doi:10.1016/j.ijrobp.2006.04.029
- Parker C, Castro E, Fizazi K, et al. Prostate cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2020;31(9):1119–1134. doi:10.1016/j.annonc.2020.06.011
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998;280(11):969–974. doi:10.1001/jama.280.11.969

33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
34. Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D153–159. doi:10.1093/nar/gku1215
35. Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J. g:Profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W193–W200. doi:10.1093/nar/gkm226
36. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D808–815. doi:10.1093/nar/gks1094
37. Bautista-Sánchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, et al. The promising role of miR-21 as a cancer biomarker and its importance in RNA-based therapeutics. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;20:409–420. doi:10.1016/j.omtn.2020.03.003
38. Ribas J, Lupold SE. The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer. *Cell Cycle*. 2010;9(5):923–929. doi:10.4161/cc.9.5.10930
39. Ribas J, Ni X, Haffner M, et al. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res*. 2009;69(18):7165–7169. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1448
40. Yang Y, Guo JX, Shao ZQ. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: an experimental study. *Asian Pac J Trop Med*. 2017;10(1):87–91. doi:10.1016/j.apjtm.2016.09.011
41. Li T, Li D, Sha J, Sun P, Huang Y. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;383(3):280–285. doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.077
42. Ghorbanmehr N, Gharbi S, Korsching E, Tavallaie M, Einollahi B, Mowla SJ. miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine-promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. *Prostate*. 2019;79(1):88–95. doi:10.1002/pros.23714
43. Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol*. 2011;32(3):583–588. doi:10.1007/s13277-011-0154-9
44. Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, et al. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate*. 2011;71(3):326–331. doi:10.1002/pros.21246
45. Li T, Li RS, Li YH, et al. miR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. *J Urol*. 2012;187(4):1466–1472. doi:10.1016/j.juro.2011.11.082
46. Liang H, Studach L, Hullinger RL, Xie J, Andrisani OM. Down-regulation of RE-1 silencing transcription factor (REST) in advanced prostate cancer by hypoxia-induced miR-106b-25. *Exp Cell Res*. 2014;320(2):188–199. doi:10.1016/j.yexcr.2013.09.020
47. Yang C, Dou R, Yin T, Ding J. MiRNA-106b-5p in human cancers: diverse functions and promising biomarker. *Biomed Pharmacother*. 2020;127:110211. doi:10.1016/j.biopha.2020.110211
48. Yin W, Chen J, Wang G, Zhang D. MicroRNA106b functions as an oncogene and regulates tumor viability and metastasis by targeting LARP4B in prostate cancer. *Mol Med Rep*. 2019;20(2):951–958.
49. Choi N, Park J, Lee JS, et al. miR-93/miR-106b/miR-375-CIC-CRABP1: a novel regulatory axis in prostate cancer progression. *Oncotarget*. 2015;6(27):23533–23547. doi:10.18632/oncotarget.4372
50. Li B, Shi XB, Nori D, et al. Down-regulation of microRNA 106b is involved in p21-mediated cell cycle arrest in response to radiation in prostate cancer cells. *Prostate*. 2011;71(6):567–574. doi:10.1002/pros.21272
51. Zheng L, Zhang Y, Liu Y, et al. MiR-106b induces cell radioresistance via the PTEN/PI3K/AKT pathways and p21 in colorectal cancer. *J Transl Med*. 2015;13:252. doi:10.1186/s12967-015-0592-z
52. Gao J, Liu L, Li G, et al. LncRNA GAS5 confers the radio sensitivity of cervical cancer cells via regulating miR-106b/IER3 axis. *Int J Biol Macromol*. 2019;126:994–1001. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.176
53. Filella X, Foj L. miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(5):715–736. doi:10.1515/cclm-2015-1073
54. Kanwal R, Plaga AR, Liu X, Shukla GC, Gupta S. MicroRNAs in prostate cancer: functional role as biomarkers. *Cancer Lett*. 2017;407:9–20. doi:10.1016/j.canlet.2017.08.011
55. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2011;128(3):608–616. doi:10.1002/ijc.25376
56. Furth N, Aylon Y, Oren M. p53 shades of Hippo. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):81–92. doi:10.1038/cdd.2017.163
57. Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *TIG*. 2012;28(3):128–136. doi:10.1016/j.tig.2011.12.002
58. Pefani DE, O'Neill E. Hippo pathway and protection of genome stability in response to DNA damage. *FEBS J*. 2016;283(8):1392–1403. doi:10.1111/febs.13604
59. Griñán-Lisón C, Olivares-Urbano MA, Jiménez G, et al. miRNAs as radio-response biomarkers for breast cancer stem cells. *Mol Oncol*. 2020;14(3):556–570. doi:10.1002/1878-0261.12635
60. Jiang S, Wang R, Yan H, Jin L, Dou X, Chen D. MicroRNA-21 modulates radiation resistance through upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α -promoted glycolysis in non-small cell lung cancer cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(5):4101–4107. doi:10.3892/mmr.2016.5010
61. Zhang J, Zhang C, Hu L, et al. Abnormal expression of miR-21 and miR-95 in cancer stem-like cells is associated with radioresistance of lung cancer. *Cancer Invest*. 2015;33(5):165–171. doi:10.3109/07357907.2015.1019676
62. Jiang L-P, He C-Y, Zhu Z-T. Role of microRNA-21 in radiosensitivity in non-small cell lung cancer cells by targeting PDCD4 gene. *Oncotarget*. 2017;8(14):23675–23689. doi:10.18632/oncotarget.15644
63. Huang S, Li XQ, Chen X, Che SM, Chen W, Zhang XZ. Inhibition of microRNA-21 increases radiosensitivity of esophageal cancer cells through phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 activation. *Dis Esophagus*. 2013;26(8):823–831. doi:10.1111/j.1442-2050.2012.01389.x
64. Gwak HS, Kim TH, Jo GH, et al. Silencing of microRNA-21 confers radio-sensitivity through inhibition of the PI3K/AKT pathway and enhancing autophagy in malignant glioma cell lines. *PLoS One*. 2012;7(10):e47449. doi:10.1371/journal.pone.0047449
65. Chao TF, Xiong HH, Liu W, Chen Y, Zhang JX. MiR-21 mediates the radiation resistance of glioblastoma cells by regulating PDCD4 and hMSH2. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2013;33(4):525–529. doi:10.1007/s11596-013-1153-4
66. Tang S, Liu B, Liu M, et al. Ionizing radiation-induced growth in soft agar is associated with miR-21 upregulation in wild-type and DNA double strand break repair deficient cells. *DNA Repair (Amst)*. 2019;78:37–44. doi:10.1016/j.dnarep.2019.03.012
67. McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimmich A. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*. 2011;57(6):833–840. doi:10.1373/clinchem.2010.157198

Cancer Management and Research

Dovepress

Publish your work in this journal

Cancer Management and Research is an international, peer-reviewed open access journal focusing on cancer research and the optimal use of preventative and integrated treatment interventions to achieve improved outcomes, enhanced survival and quality of life for the cancer patient.

The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/cancer-management-and-research-journal>



CORRIGENDUM

Circulating miRNAs as Potential Biomarkers in Prostate Cancer Patients Undergoing Radiotherapy [Corrigendum]

Kachris S, Papadaki C, Rounis K, et al. *Cancer Manag Res*. 2021;13:8257–8271.

The authors have advised there is an error with the author list on page 8257. The author “Stefanos Kachris¹” should read “Stefanos Kachris^{1,2}”.

The authors apologize for this error.

Cancer Management and Research downloaded from <https://www.dovepress.com/> on 27-Feb-2022
For personal use only.

Cancer Management and Research

Dovepress

Publish your work in this journal

Cancer Management and Research is an international, peer-reviewed open access journal focusing on cancer research and the optimal use of preventative and integrated treatment interventions to achieve improved outcomes, enhanced survival and quality of life for the cancer patient. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/cancer-management-and-research-journal>

<https://doi.org/10.2147/CMAR.S360019>

Received: 26 January 2022
Accepted: 26 January 2022
Published: 1 February 2022

Cancer Management and Research 2022:14 409

409



© 2022 Kachris et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <https://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<https://www.dovepress.com/terms.php>).