

Metilacija nestaničnoga DNA gena RASSF1 i CAV1 u krvi i ejakulatu bolesnika s rakom prostate

Škara, Lucija

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:267062>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Lucija Škara

**Metilacija nestaničnoga DNA gena
RASSF1 i CAV1 u krvi i ejakulatu
bolesnika s rakom prostate**

DISERTACIJA



Zagreb, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Lucija Škara

**Metilacija nestaničnoga DNA gena
RASSF1 i CAV1 u krvi i ejakulatu
bolesnika s rakom prostate**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u okviru Znanstvene grupe za istraživanje epigenetičkih biomarkera (epiMark).

Ovu je disertaciju financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Epigenetički biomarkeri raka prostate“ (epiPro, UIP-2017-05-8138), voditelja izv. prof. dr. sc. Nina Sinčića, dr. med. Disertaciju je poduprla Europska unija putem Europskog fonda za regionalni razvoj, konkurentnost i koheziju, prema sporazumu o dodjeli bespovratnih sredstava br. KK.01.1.1.01.0008, „Reproduktivna i regenerativna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala“.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Monika Ulamec

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Anatomija i fiziologija prostate	1
1.2 Bolesti prostate	2
1.3 Rak prostate	3
1.3.1 Epidemiologija	3
1.3.2 Rizični čimbenici	4
1.3.3 Klinička slika i dijagnostika	5
1.3.4 Patohistološka dijagnoza	6
1.3.5 Određivanje stadija bolesti	8
1.3.6 Liječenje.....	12
1.3.7 Molekularna patologija raka prostate	13
1.3.8. Epigenetika raka prostate	16
1.4. Biomarkeri raka prostate.....	21
1.4.1 PSA.....	21
1.4.2 Noviji biomarkeri raka prostate	23
1.4.2.1 Tkivni biomarkeri.....	23
1.4.2.2 Biomarkeri iz tekućinskih biopsija	25
1.5 Nestanični DNA.....	27
1.6 <i>RASSF1</i>	29
1.7 <i>CAV1</i>	30
2. HIPOTEZA.....	32
3. SVRHA I CILJEVI RADA.....	33
4. ISPITANICI I METODE	34
4.1. Ispitanici	34
4.2 Dizajn studije	35
4.3 Prikupljanje i obrada uzoraka tekućinskih biopsija	36
4.4 Obrada uzoraka- tkivo	36
4.5. Hemalaun-eozin bojanje parafinskih rezova	36
4.6 Imunohistokemijsko bojanje parafinskih rezova.....	37
4.7 Analiza imunohistokemijskih preparata	38
4.8 Izolacija i kvantifikacija gDNA iz parafinskih blokova	39
4.9 Izolacija i kvantifikacija cfDNA iz krvne i sjemene plazme.....	40

4.10 Bisulfitna konverzija izoliranih i kvantificiranih cfDNA i gDNA.....	41
4.11 Lančana reakcija polimerazom nakon bisulfitne konverzije	42
4.12 Pirosekvenciranje	44
4.13 Analiza rezultata pirosekvenciranja	45
4.14 Statistička obrada podataka.....	45
5. REZULTATI	46
5.1. Klinički i patohistološki podaci ispitanika	46
5.2 Ekspresija i metilacija gena <i>RASSF1</i>	47
5.2.1 Ekspresija gena <i>RASSF1</i> na proteinskoj razini	47
5.2.2 Metilacija gena <i>RASSF1A</i> u tkivu	50
5.2.3 Povezanost metilacije s ekspresijom gena <i>RASSF1</i> u tkivu	51
5.2.4 Metilacija i ekspresija gena <i>RASSF1</i> u tkivu i kliničke značajke	51
5.2.5 Metilacija gena <i>RASSF1A</i> u krvnoj plazmi	53
5.2.6 Metilacija gena <i>RASSF1A</i> u sjemennoj plazmi.....	53
5.2.7 Metilacija gena <i>RASSF1A</i> u tekućinskim biopsijama i kliničke značajke.....	54
5.3 Ekspresija i metilacija gena <i>CAV1</i>	55
5.3.1 Ekspresija gena <i>CAV1</i> na proteinskoj razini.....	55
5.3.2 Metilacija gena <i>CAV1</i> u tkivu.....	58
5.3.3 Povezanost metilacije s ekspresijom gena <i>CAV1</i>	59
5.3.4 Metilacija i ekspresija gena <i>CAV1</i> u tkivu i kliničke značajke	59
5.3.5 Metilacija gena <i>CAV1</i> u krvnoj plazmi	62
5.3.6 Metilacija gena <i>CAV1</i> u sjemennoj plazmi	62
5.3.7 Metilacija gena <i>CAV1</i> u tekućinskim biopsijama i kliničke značajke	63
5.3.8 Karakteristike metilacije cfDNA gena <i>CAV1</i> kao biomarkera	65
6. RASPRAVA	67
6.1 Ekspresija i metilacija gena <i>RASSF1</i>	68
6.2 Ekspresija i metilacija gena <i>CAV1</i>	71
6.3 Buduća istraživanja.....	75
7. ZAKLJUČAK.....	77
8. SAŽETAK.....	78
9. ABSTRACT	79
10. POPIS LITERATURE.....	80
11. ŽIVOTOPIS.....	90

Popis oznaka i kratica

AJCC - Američko udruženje za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer*)

AUC - površina ispod krivulje (engl. *area under curve*)

BHP - benigna hiperplazija prostate (engl. *benign prostatic hyperplasia*)

BSA - goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)

CAV1 - kaveolin 1 (engl. *caveolin 1*)

cfDNA - nestanična DNA (engl. *cell-free DNA*)

CpG - citozin koji prethodi gvaninu (engl. *cytosine-phosphate-guanine*)

DAB - 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid

gDNA - genomska DNA

hKL3 - humani kalikrein-3

IRS - imunohistokemijski indeks bojanja (engl. *immunoreactivity score*)

mpMRI - multiparametrijska magnetska rezonanca

MSP - lančana reakcija polimerazom specifična za metilaciju (engl. *methylation-specific polymerase chain reaction*)

ONT - okolno netumorsko tkivo

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PIA - proliferacijska inflamatorna atrofija

PIN - prostatična intraepitelna neoplazija (engl. *prostate intraepithelial neoplasia*)

PSA - antigen specifičan za prostatu (engl. *prostate-specific antigen*)

qMSP - kvantitativna metilacija-specifična lančana reakcija polimerazom (engl. *quantitative methylation-specific polymerase chain reaction*).

RASSF1 - engl. *Ras association domain family protein 1*

ROC - krivulja odnosa specifičnosti i osjetljivosti (engl. *receiver operating characteristics*)

RP - rak prostate

T - anatomska proširenost primarnog tumora

TBS - tris-puferirana fiziološka otopina (engl. *tris-buffered saline*)

1. UVOD

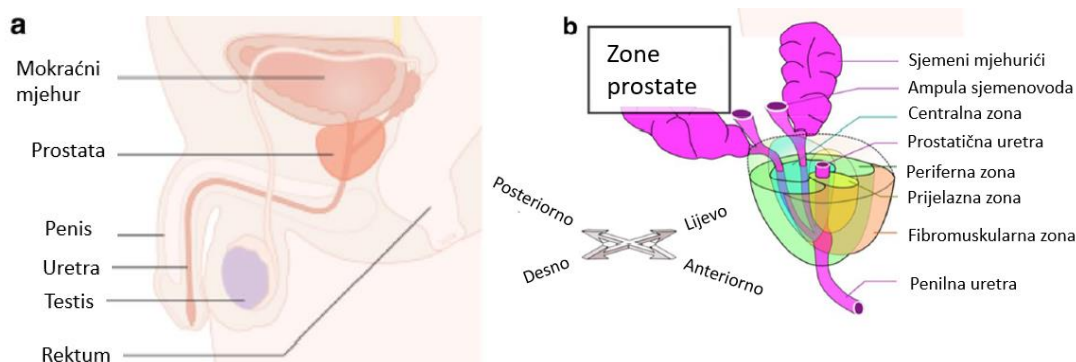
1.1 Anatomija i fiziologija prostate

Prostata je neparna pomoćna žlijezda muškog spolnog sustava. Ima egzokrinu funkciju, sudjeluje u stvaranju i izlučivanju sperme. Smještena je na dnu male zdjelice, ispod mokraćnog mjehura, a okružuje početna 3 cm mokraćne cijevi (Slika 1a). Prostata odraslog čovjeka široka je 4 cm, duga 3 cm, volumena oko 20 cm³ i težine oko 20 g. Veličinom i oblikom odgovara kestenu te je drugi naziv za prostatu kestenjača. Kroz prostatu prolazi mokraćna cijev te ejakulatorni kanali koji se ulijevaju u mokraćnu cijev. Prostata se može podijeliti u četiri biološki i anatomske različite zone: periferna, centralna i tranzicijska zona te područje anteriorne fibromuskularne strome (Slika 1b) (1). Periferna zona tvori oko 70 % žljezdanog dijela prostate, a izvodni kanali se slijevaju u distalni kraj prostatičnog dijela mokraćne cijevi. Središnja zona tvori oko 25 % žljezdanog dijela prostate, a izvodni kanali se uglavnom slijevaju u središnji dio prostatičnog dijela mokraćne cijevi. Prijelazna zona tvori oko 5 % žljezdanog dijela prostate, a ti izvodni kanali se slijevaju u proksimalni kraj prostatičnog dijela mokraćne cijevi.

Prostata je obavijena tankom čvrstom ovojnicom, a tkivo prostate se sastoji od žljezdanog tkiva uloženog u vezivno-mišićnu stromu. Žljezdano tkivo čine tri tipa tubuloalveolarnih žlijezda koje se razlikuju po udaljenosti od mokraćne cijevi. Najbliže mokraćnoj cijevi nalaze se mukozne žlijezde koje su malih dimenzija te imaju kratki tubularni dio preko kojeg se izlijevaju u mokraćnu cijev. Pokraj mukoznih žlijezda nalaze se submukozne žlijezde. Najveći dio prostatičnog žljezdanog tkiva čine glavne žlijezde kojih ima 30 - 50, a nalaze se uz ovojnicu. Glavne žlijezde i submukozne žlijezde zajedno kroz 15 - 30 izvodnih kanala izlijevaju žljezdani sekret u prostatični dio mokraćne cijevi. Oko žlijezda se nalaze glatke mišićne stanice, koje pomažu istiskivati sekret, te rahlo vezivo koje zajedno čini vezivno-mišićnu stromu. U stromi se nalaze još i krvne i limfne žile te živčani ogranci.

Na mikroskopskoj razini, prostatične žlijezde građene su od tri tipa stanica: luminalnih, bazalnih i neuroendokrinih. Luminalne cilindrične epitelne stanice čine jedan sloj stanica koje okružuju lumen. Luminalne stanice izlučuju prostatični sekret u lumen, a ekspresiraju markere citokeratin 8, citokeratin 18, androgeni receptor, prostatična kiselna fosfataza, antigen specifičan za prostatu (PSA), prostein, NKX3. Oko luminalnih stanica nalaze se sloj kubičnih bazalnih stanica koje leže na bazalnoj membrani. Bazalne stanice ekspresiraju markere p63, citokeratin 5, citokeratin 14. Omjer luminalnih i bazalnih stanica u normalnoj prostatičnoj žlijezdi je 60:40.

Neuroendokrine stanice su rijetke te se nalaze na bazalnoj membrani. Oko dvosloja luminalnih i bazalnih stanica nalazi se vezivno-mišićna stroma (1).



Slika 1. Smještaj i anatomija prostate. Pozicija prostate u muškom reproduktivnom sustavu (a) i podjela na tri glavne anatomske zone prostate (b). (Preuzeto i prilagođeno prema Tonry C i sur. *Clin Proteomics*. 2020 (2)).

Primarna funkcija prostate je proizvodnja i izlučivanje tekućine koja zajedno sa spermijima i tekućinom iz drugih žlijezdi tvori spermu. Epitelne stanice prostate izlučuju sekret i to u obliku mjehurića (apokrino) ili izravno u lumen (merokrino). Sekret prostate čini oko 15 % volumena sperme, a sadrži organske i anorganske molekule koje imaju antibakterijski učinak te pomažu u oplodnji jajne stanice. Mišići prostate omogućuju izbacivanje sperme u uretru, a lužnatost sekreta omogućava preživljavanje spermija u kiselom okolišu vagine (3,4).

1.2 Bolesti prostate

Najčešći patološki procesi u prostati su prostatitis, benigna hiperplazija prostate (BHP) i rak prostate (RP) (1). Kliničke karakteristike triju glavnih bolesti prostate definira zona iz koje potječu (2). Prostatitis pogađa 4,5 - 9 % muškaraca te je najčešća urološka dijagnoza muškaraca mlađih od 50 godina te treća najčešća urološka dijagnoza muškaraca starijih od 50 godina (5). Najčešći oblik prostatitisa je bakterijski, dok je BHP najčešća bolest prostate. Zbog velike učestalosti u starijoj dobi gotovo može biti smatrana fiziološkim procesom starenja (29). BHP je povećanje prijelazne zone prostate i to zbog hiperplazije epitelnih stanica i stanica strome čime nastaju čvorovi u periuretralnom području prostate koji zbog svoje veličine mogu vršiti pritisak i sužavati lumen uretre te onemogućiti normalan protok mokraće. Prvonastali noduli sačinjeni su gotovo u potpunosti od stanica strome, a kasniji uglavnom od epitelnih stanica (29).

Povećanje prijelazne zone prostate često je uzorkovano smanjenjem proizvodnje testosterona te povećanjem proizvodnje estrogena čime se stimulira rast stanica prostate (2).

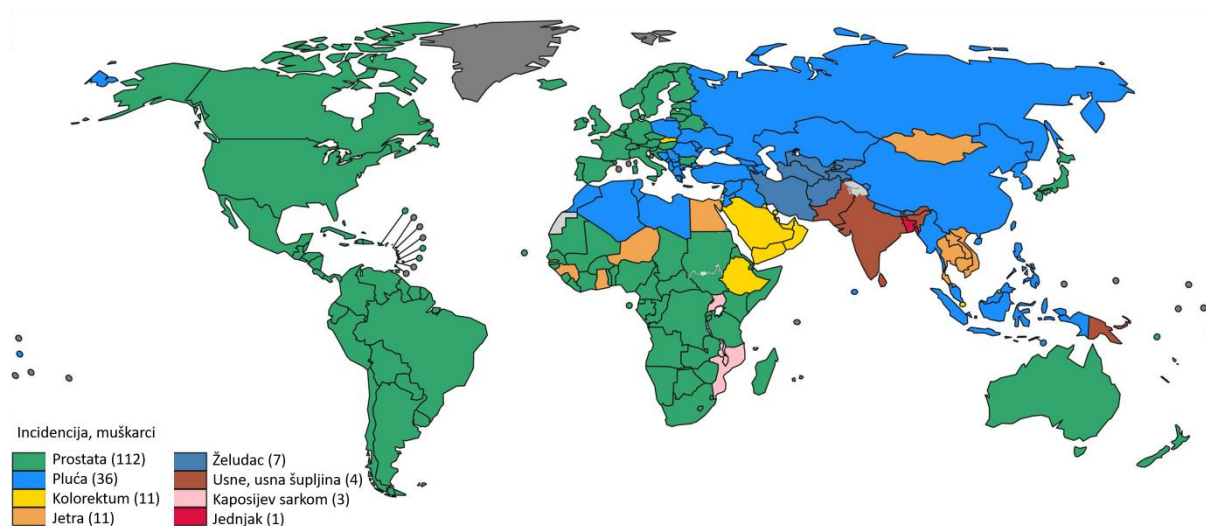
Zbog povećanja mase prostate, simptomi koji se javljaju su češće mokrenje, noćno mokrenje, otežano započinjanje i zaustavljanje mokrenja, bolno mokrenje i nemogućnost pražnjenja mjehura u potpunosti (6). BHP ne rezultira razvojem raka te se i transkripcijski razlikuje od njega (8).

1.3 Rak prostate

Za razliku od BHP-a, rak prostate karakterizira hiperproliferacija epitelnih stanica (8). Većina slučajeva raka prostate potječe iz periferne zone prostate, a ostatak od 20 % iz prijelazne zone. Rak prostate iz prijelazne zone većeg su volumena i imaju više koncentracije PSA, ali su povoljnije prognoze od raka prostate iz periferne zone. Čak je u 80 % uzoraka prostate nakon radikalne prostatektomije prisutno više žarišta raka. Ta žarišta pokazuju ne samo interfokalnu već i intrafokalnu heterogenost unutar istog pacijenta (2).

1.3.1 Epidemiologija

Incidencija i mortalitet variraju između različitih geografskih područja i etničkih skupina. Prema podacima za 2020. godinu rak prostate je, odmah nakon raka pluća, drugi najčešće dijagnosticirani rak (14,1 %) u muškaraca u svijetu općenito, a u čak 112 od 185 država svijeta je najčešći (Slika 2). Po mortalitetu rak prostate je peti u svijetu općenito (6,8 %), a u 48 od 185 zemalja svijeta je vodeći uzrok smrti od raka (7).



Slika 2. Incidenција najčešćih tipovi raka muškaraca 2020. godine po državama svijeta. Legenda prikazuje broj država u kojima je određen rak najčešći. Nemelanomski rak kože, najčešći tip raka u Australiji Novome Zelandu i USD-u, je isključen. (Preuzeto i prilagođeno prema Sung H i sur. *CA Cancer J Clin*, 2021(7)).

Prema posljednjem izvještaju Registra za rak Republike Hrvatske za 2019. godinu, prostata s 2731 novooboljelih (20 %) najčešće je sijelo raka u muškaraca te je rak prostate drugi najčešći uzrok smrti od raka sa stopom od 807 umrlih na 100 000 muškaraca. Najviše je novih slučajeva detektirano u pacijenata u dobnoj skupini 65-69 godina (11).

1.3.2 Rizični čimbenici

Etiologija raka prostate je slabo poznata naspram drugih čestih malignih oboljenja. Dobro znani rizični čimbenici za rak prostate općenito su starija dob, geografsko podrijetlo, obiteljska anamneza i genetska predispozicija (8). Rak prostate ima pozitivnu korelaciju s dobi te rijetko pogađa muškarce mlađe od 40 godina, dok njegova incidenција naglo raste nakon 55.-te godine života. Velika većina pacijenata (85 %) starija je od 65 godina, a incidenција je najviša između 70. i 74. godine. Obdukcijom se rak prostate nalazi u > 75 % muškaraca starijih od 85 godina (8-10). Najveći rizik od razvoja i mortaliteta imaju Afroamerikanci, srednji rizik imaju bijelci dok Azijati imaju najmanji rizik. Razlike u geografskom podrijetlu posljedica su genetskih razlika, utjecaja okoliša i načina života (14). Muškarci s pozitivnom obiteljskom anamnezom imaju veći rizik od razvoja raka prostate. Genetski faktori čine oko 50 % rizika za rak prostate (11). Ostali rizični faktori povezani s rakom prostate su prehrana (smanjen unos voća, povrća i vitamina te povećan unos zasićenih životinjskih masti i crveno mesa), pretilost, fizička

aktivnost, upala, hiperglikemija, infekcije te izloženost kemikalijama i ionizirajućem zračenju (12).

1.3.3 Klinička slika i dijagnostika

Većina slučajeva raka prostate otkrije se probirom asimptomatskih pacijenta dok su kod manjeg broja pacijenata prisutni simptomi slični onima kod BHP-a: smetnje prilikom mokrenja te hematurija. U pacijenata s metastazama kao simptomi javljaju se bol u kralješnici te patološka fraktura kosti (13).

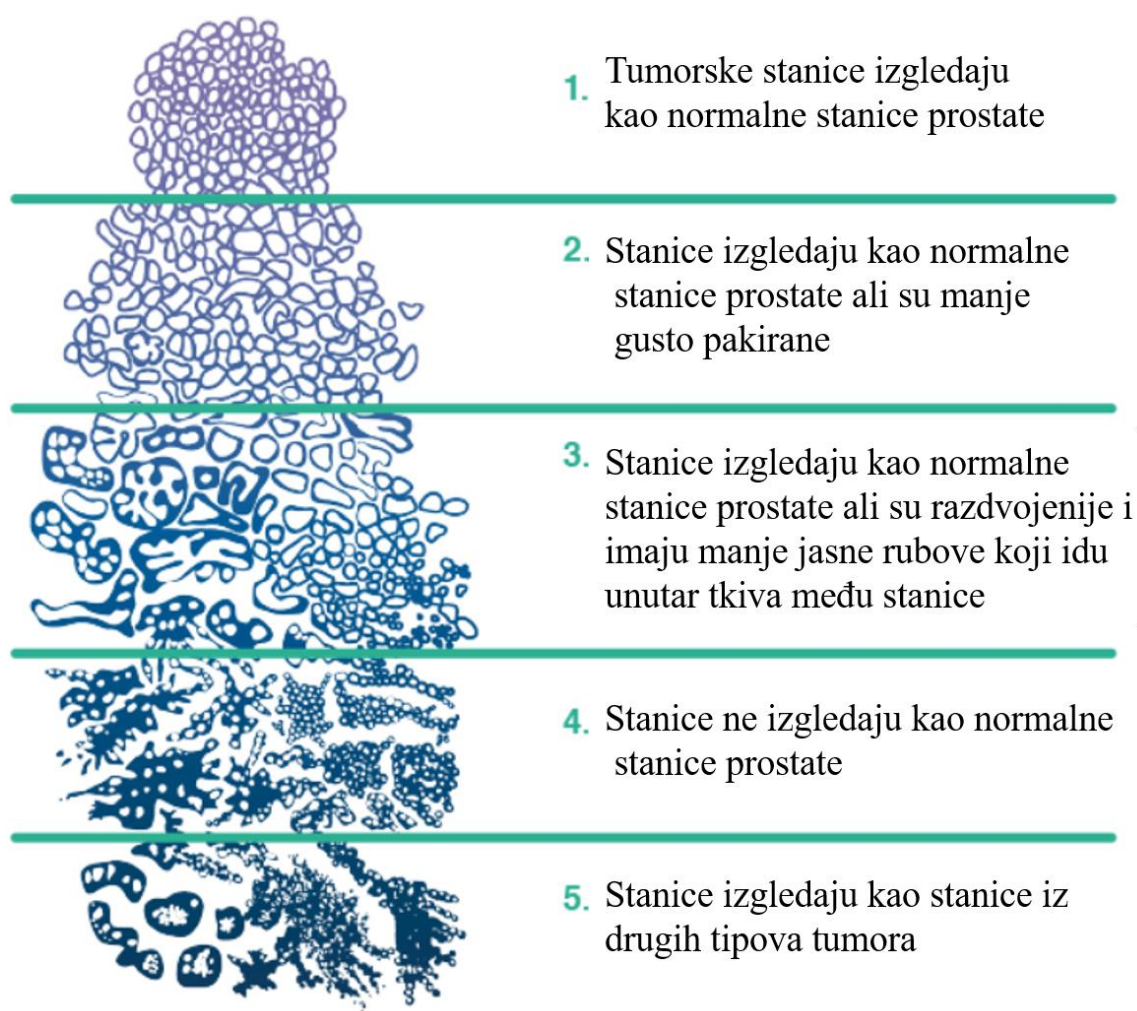
Rani i lokalizirani rak prostate rijetko su popraćeni simptomima pa se njihovo otkrivanje temelji na digitorektalnom pregledu prostate i određivanju serumske koncentracije PSA. Ukoliko je prostata prilikom digitorektalnog pregleda tvrda, čvorasta i bezbolna, postoji sumnja na rak prostate (13).

Povišene vrijednosti PSA i suspektan digitorektalni pregled indikacije su za biopsiju prostate kojom se utvrđuje definitivna dijagnoza raka prostate. Pod kontrolom transrektalnog ultrazvuka pomoću bioptičkog pištolja za patohistološku analizu prema shemi uzima se 10 - 12 cilindara tkiva prostate (13). U posljednjem desetljeću multiparametrijskom magnetskom rezonancom (mpMRI) vođena biopsija prostate unijela je revoluciju u dijagnostiku raka prostate.

Europsko urološko društvo preporuča mpMRI za pacijente s PSA vrijednošću ≥ 3 ng/mL koji nisu bili bioptirani te za pacijente koji imaju prethodno negativan nalaz biopsije. PI-RADS (engl. *Prostate Imaging Reporting and Data System*) je standardizirani nalaz mpMRI prostate kojim se na skali od 1 do 5 određuje rizik od klinički značajnog raka prostate. Prema švedskim preporukama, pacijenti s nalazom PI-RADS ≥ 3 upućuju se na mpMRI vođenu biopsiju prostate (14). Mogućnost lociranja suspektnih lezija povećala je detekciju klinički značajnih oblika za 18 % te smanjila nepotrebno bioptiranje za 27 % (15). mpMRI vođena biopsija prostate s osjetljivošću od 87 % i negativnom prediktivnom vrijednošću od 72 % pokazala se superiornom nad transrektalnom ultrazvučno vođenom biopsijom prostate (osjetljivost 60 %, negativna prediktivna vrijednost 65 %), međutim još uvijek ima manju specifičnost i pozitivnu prediktivnu vrijednost (15). Iako mpMRI kao dodatna procedura predstavlja i dodatni trošak, otprilike 1000 kn po pacijentu, ona zapravo može i pridonijeti smanjenu ukupnog troška dijagnostike jer su pacijenti s niskim rizikom pošteđeni biopsije (16).

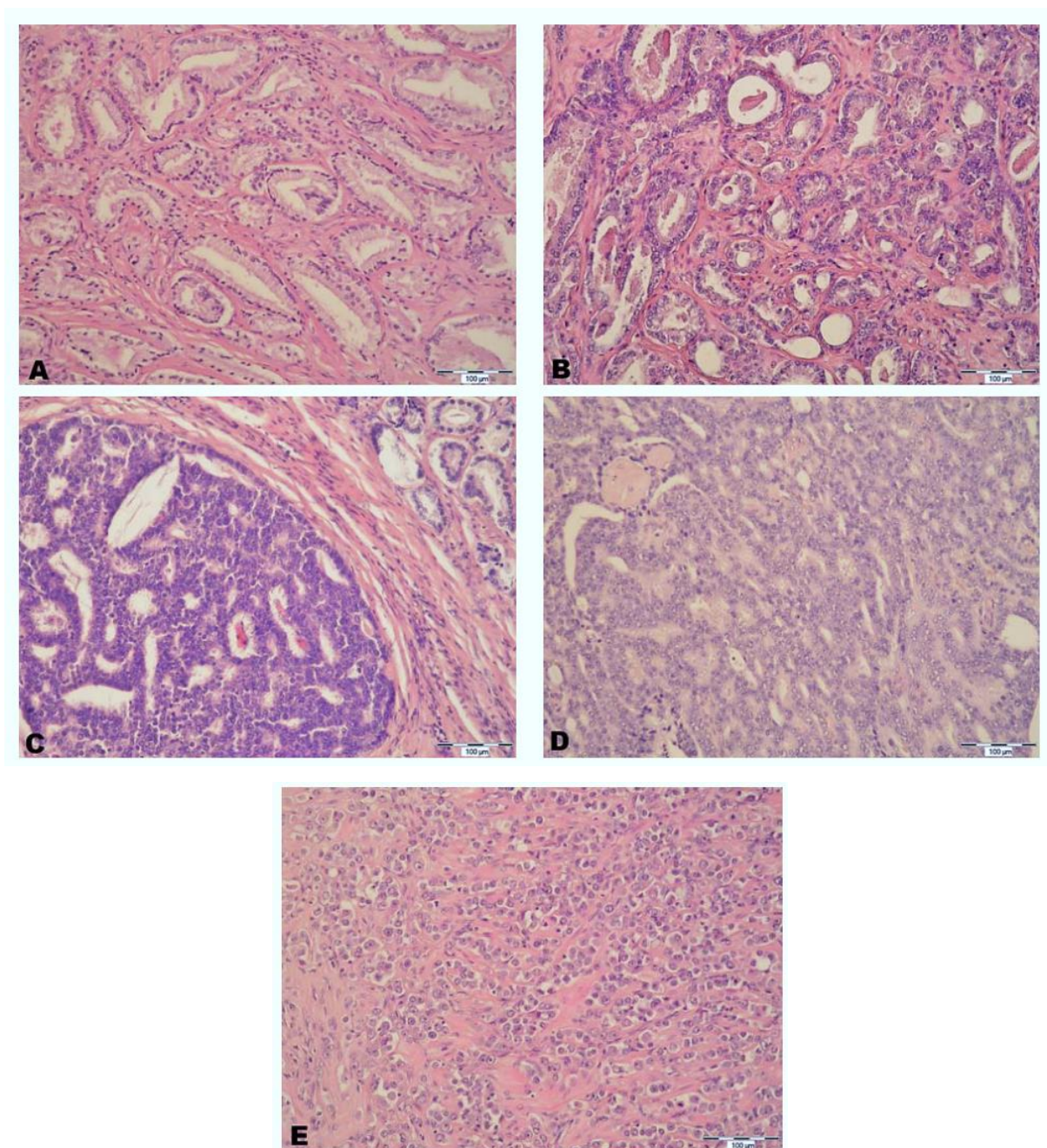
1.3.4 Patohistološka dijagnoza

Biopati se patohistološki analiziraju te se na temelju arhitekturnih i citoloških kriterija donosi definitivna dijagnoza. Osnovne arhitekturne značajke raka prostate su: infiltrativni rast i odsutnost bazalnih stanica, a osnovna citološka značajka je jezgra s naglašenim jezgricama (17). Prema histološkoj slici određuje se diferenciranost tumora temeljem Gleasonove ljestvice. Donald Gleason je 1966. g. prvi opisao obrasce glandularne diferencijacije te na temelju arhitekturnih obilježja i izgleda tumorskih žlijezda svrstao tumore u jedan od pet Gleasonovih gradusa (engl. *Gleason pattern/grade*). Prema Gleasonovnom sustavu najdiferenciraniji obrazac označava se kao Gleasonov gradus 1, a najmanje diferencirani kao Gleasonov gradus 5 (Slika 3) (18).



Slika 3. Gleasonov sustav za stupnjevanje karcinoma prostate. (Preuzeto i prilagođeno sa <https://prostadcs.co.uk>).

U svakoj biopsiji određuje se Gleasonov gradus za dva najzastupljenija histološka obrasca rasta, a zbrajanjem vrijednosti najzastupljenijeg i sljedeće zastupljenog Gleasonovog gradusa dobije se Gleasonov zbroj (engl. *Gleason score/sum*). Iako Gleasonov zbroj teoretski može biti između 2 i 10, on je najčešće između 6 i 10. Nadalje, karcinomi Gleasonovnog zbroja 7 imaju različitu prognozu i ponašanje ovisno radi li se o gradusima 3 + 4 ili 4 + 3 te su neopravdano svrstani u istu skupinu. Zbog navedenih nedostataka Međunarodno udruženje za urološku patologiju (engl. *International Society for Urological Pathology*, ISUP) 2014. g. prihvaća prijedlog svrstavanja Gleasonovih zbrojeva u prognostičke grupe te se prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2016. g. karcinomi svrstavaju u pet skupina gradusa (engl. *grade groups*). Ovakav način klasifikacije je jednostavniji te bolje korelira s prognozom. Skupina gradusa 1 obuhvaća karcinome Gleasonovog zbroja od 2 do 6. U skupinu gradusa 2 spadaju karcinomi koji imaju najzastupljeniji obrazac Gleasonovog gradusa 3 pa idući najzastupljeniji 4 (3 + 4), a u skupinu 3 karcinomi s najzastupljenijim Gleasonovim gradusom 4 pa potom 3 (4 + 3). U skupinu gradusa 4 spadaju karcinomi s Gleasonovim zbrojem 8, a u skupinu gradusa 5 karcinomi s Gleasonovim zbrojem 9 ili 10 (15,18) (Slika 4). Ove godine (2022.) Svjetska zdravstvena organizacija objavila je peto izdanje klasifikacije tumora mokraćnog sustava i muških spolnih organa koje sadrži nekoliko novina vezanih klasifikaciju, dijagnozu i prognozu raka prostate (19). Najčešći patohistološki tip karcinoma (> 95 %) je acinarni adenokarcinom, a rjeđi oblici su karcinom urotela, rabdomiosakrom i leiomiosakrom (20).



Slika 4. Histološki prikaz karcinoma prostate s različitim gradusima. A - skupina gradusa 1, B - skupina gradusa 2, C - skupina gradusa 3, D - skupina gradusa 4, E - skupina gradusa 5. (Preuzeto i prilagođeno prema Krušlin i sur., *Lijec Vjesn*, 2017 (18)).

1.3.5 Određivanje stadija bolesti

Nakon patohistološke potvrde, na temelju kliničkog T-stadija (T-anatomska proširenost primarnog tumora), Gleasonova zbroja, udjela uzoraka biopsije zahvaćenih tumorom i vrijednosti PSA pacijent se svrstava u jednu od rizičnih skupina. Pacijentima iz skupine vrlo

niskog i niskog rizika dodatna dijagnostička obrada nije potrebna, dok je pacijentima iz ostalih skupina potrebna. Po završetku svih potrebnih obrada pacijent se konačno svrstava u jednu od rizičnih skupina te se prema tome donosi terapijska odluka (21). Rak prostate se stupnjuje prema TNM sustavu Američkog udruženja za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC) koji obuhvaća određivanje anatomske proširenosti primarnog tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova (N) te proširenosti na udaljene dijelove tijela (M). Postoje dva načina određivanja proširenost raka prostate: klinički i patološki. Klinički stadij bolesti određuje se pomoću digitorektalnog pregleda i radiološkim pretragama (magnetska rezonancija zdjelice i scintigrafija kostiju), a patološki stadij bolesti određuje patolog postoperativnom analizom prostate, sjemenih mjehurića i limfnih čvorova (Tablica 1) (21). Određivanje stadija i proširenosti raka prostate važno je za odabir liječenja i prognozu.

Tablica 1. TNM-klasifikacija raka prostate. (Preuzeto i prilagođeno prema Solarić M i sur., *Lijec Vjesn*, 2019 (21)).

Primarni tumor	
Klinički (T)	
Tx	– primarni se tumor ne može otkriti
T0	– nema znakova primarnog tumora
T1	– klinički neprimjetan tumor bilo palpacijom ili slikovnim dijagnostičkim pretragama
	T1a – slučajan nalaz tumora u 5% reseciranog tkiva ili manje T1b – slučajan nalaz tumora u više od 5% reseciranog tkiva T1c – tumor dijagnosticiran s pomoću biopsije iglom (zbog povišene vrijednosti PSA)
T2	– tumor je ograničen na prostatu*
	T2a – tumor obuhvaća polovicu jednog režnja ili manje T2b – tumor obuhvaća više od polovice jednog režnja, ali ne oba režnja T2c – tumor obuhvaća oba režnja
T3	– tumor proširen izvan kapsule prostate**
	T3a – izvanprostatna proširenost (jednostrana ili obostrana) T3b – tumor proširen na sjemenske mjehuriće
T4	– tumor fiksiran ili proširen na okolne strukture osim sjemenskih mjehurića: mokraćni mjehur, mišić levatore i/ili zdjelične stijenke/
Patološki (pT)	
pT2	– tumor je ograničen na prostatu
pT3	– izvanprostatno širenje
	T3a – izvanprostatno širenje ili mikroskopska infiltracija vrata mjehura**** T3b – infiltracija sjemenskih mjehurića
pT4	– infiltracija mjehura, rektuma
Regionalni limfni čvorovi	
Klinički (N)	
Nx	– prisutnost rasadnica u regionalnim limfnim čvorovima ne može se utvrditi
N0	– nema rasadnica u regionalne limfne čvorove
N1	– rasadnice u regionalne limfne čvorove
Patološki (pN)	
Nx	– regionalni limfni čvorovi nisu pregledani
N0	– nema pozitivnih regionalnih čvorova
N1	– rasadnice u regionalne limfne čvorove
Udaljene rasadnice (M)*	
M0	– nema udaljenih rasadnica
M1	– prisutne su udaljene rasadnice
	M1a – u neregionalne limfne čvorove M1b – u kost(i) M1c – u ostala sjela s koštanim rasadnicama ili bez njih

* Tumor nađen biopsijom u jednom ili oba režnja, ali je nepalpabilan ili se ne može vizualizirati dijagnostičkim pretragama, klasificira se kao T1c.

** Tumor koji invadira apeks prostate ili u prostatičku kapsulu (ali ne izvan nje) klasificira se kao T2, a ne T3.

*** Ne postoji patološka T1c-klasifikacija.

**** Pozitivan kirurški rub treba biti obilježen oznakom R1 (ostatna mikroskopska bolest).

***** Kad je prisutno više od jedne rasadnice, klasificiramo prema najraširenijoj.

TNM klasifikacija se kombinira s vrijednošću PSA te skupinom gradusa za određivanju stadija i prognoze (Tablica 2) (22).

Tablica 2. Prognostički stadiji raka prostate prema AJCC. (Preuzeto i prilagođeno prema Abramović I, 2022 (23)).

Kad je T...	i N je...	i M je...	i PSA ($\mu\text{g/L}$) je...	i gradusna grupa je...	onda je stadij...
cT1a-c, cT2a	N0	M0	< 10	1	I
pT2	N0	M0	< 10	1	I
cT1a-c, cT2a	N0	M0	$\geq 10, < 20$	1	IIA
pT2	N0	M0	$\geq 10, < 20$	1	IIA
cT2b-c	N0	M0	< 20	1	IIA
T1-2	N0	M0	< 20	2	IIB
T1-2	N0	M0	< 20	3	IIC
T1-2	N0	M0	< 20	4	IIC
T1-2	N0	M0	≥ 20	1-4	IIIA
T3-4	N0	M0	bilo koji	1-4	IIIB
bilo koji	N0	M0	bilo koji	5	IIIC
bilo koji	N1	M0	bilo koji	bilo koja	IVA
bilo koji	bilo koji	M1	bilo koji	bilo koja	IVB

1.3.6 Liječenje

Odabir liječenja svakog pacijenta je individualiziran te se u obzir uzimaju stadij i gradus tumora, dob pacijenta, opće stanje, komorbiditeti i osobne preferencije. Terapijske mogućnosti za lokalizirani rak prostate su aktivni nadzor, radikalna prostatektomija i radijacijska terapija. Aktivni nadzor je zapravo praćenje pacijenta s niskorizičnim karcinomom, a uključuje kontrolu PSA svaka 3 mjeseca, digitorektalni pregled svakih 6 mjeseci, ponavljanje biopsije svakih 1 - 2 godine te praćenje simptoma. Aktivno liječenje se provodi u slučaju progresije bolesti. Potencijalni pacijenti za ovakav terapijski pristup imaju očekivani životni vijek > 10 godina, klinički ograničenu bolest (T1 - T2a), PSA < 10 ng/ml, Gleasonov zbroj ≤ 6 , 1 ili 2 pozitivna cilindra s < 50 % raka u svakom cilindru, nemaju sarkomatoidni, sitnostanični ni intraduktalni karcinom niti limfovaskularnu invaziju (21). Cilj ovakvog pristupa je smanjenje pretjeranog liječenja jer pacijenti s niskorizičnim karcinomom imaju visoko dvadesetogodišnje preživljenje (80 - 90 %) (13).

Radikalna prostatektomija je kirurško uklanjanje prostate i sjemenih mjehurića u cijelosti s ili bez regionalne zdjelične limfadenektomije. Indicira se u pacijenata s niskim ili srednjim rizikom, lokalizirani rakom (T1, T2), PSA < 20 ng/ml, Gleasonovim zbrojem 6 - 7 te očekivanim životnim vijekom > 10 godina. Radikalna prostatektomija može biti otvorena, laparoskopska ili asistirana robotski, a moguće dugoročne komplikacije su erektilna disfunkcija i urinarna inkontinencija.

Radioterapija se kao primarna terapija indicira u pacijenata s lokaliziranim rakom prostate, ali zbog općeg stanja ili komorbiditeta postoji veliki operacijski rizik ili je očekivani životni vijek < 10 godina. Izvor ionizirajućeg zračenja može biti vanjski (linearni accelerator) ili trajno postavljeni implantati unutar prostate (brahiterapija). Radioterapija kao adjuvantna terapija se može primjenjivati nakon radikalne prostatektomije ili kao palijativna terapija. Komplikacije ovakve terapije su radijacijski cistitis i/ili proktitis s čestim krvarenjima, edemima donjih ekstremiteta, postiradijacijske promjene na koži, erektilna disfunkcija te urinarna inkontinencija (13,21).

Liječenje uznapredovalog raka prostate može biti agresivno s ciljem uništenja tumorskih stanica, sprečavanja progresije i smanjenje metastaza ili palijativno s ciljem olakšavanja smetnji prouzročenih uznapredovanjem. Izlječenje uznapredovalog raka prostate nije moguće, a kao prva linija agresivnog liječenja primjenjuje se hormonska terapija čime se stanicama raka uskraćuje androgen blokiranjem izlučivanja iz testisa i/ili blokiranjem vezivanja androgena za receptor (13). Odgovor na hormonsku terapiju je brz, ali traje razmjerno kratko (18 - 36

mjeseci). Kod određenih pacijenata s rakom prostate otpornim na hormone primjenjuje se kemoterapija, a njihov prosječni očekivani životni vijek je do dvije godine (13).

S jedne strane indolentan rak prostate dovodi do pretjeranog liječenja i komplikacija uzrokovanih liječenjem, a s druge strane agresivni rak prostate uzrokuje izuzetan morbiditet i smrtnost. Odabir između aktivnog nadzora i aktivnog liječenja lokaliziranog raka prostate na temelju stadija je izazov te su se tijekom proteklih desetljeća razvili novi alati i markeri (više u poglavljima 1.4.2.1 i 1.4.2.2) kako bi se se maksimizirala sigurnost i kvaliteta života pacijenata te smanjilo pretjerano nepotrebno liječenje (24,25).

1.3.7 Molekularna patologija raka prostate

Tumorigeneza stanica prostate rezultat je složenog međudjelovanja više faktora: sklonosti nasljeđenih sa zametnim stanicama, stečenih somatskih promjena te okolišnih čimbenika. Lokalizirani rak prostate često ima više genetički različitih žarišta koji se razlikuju po sposobnosti metastaziranja i odgovoru na terapiju (26). Vjeruje se da rak prostate nastaje progresijom prostatične intraepitelne neoplazije (engl. *prostate intraepithelial neoplasia*, PIN). Procjenjuje se da gotovo polovina muškaraca do 50. godine razvije PIN. Histološki razlikujemo PIN niskog stupnja i PIN visokog stupnja (27). Trenutno najšire prihvaćena prekursorska lezija raka prostate je PIN visokog stupnja. Ne razvija se iz svih PIN lezija rak prostate već s vremenom neke PIN lezije stječu somatske promjene u genomu koje omogućavaju razvoj u rak prostate (13). Luminalne stanice PIN-a visokog stupnja imaju povećanu jezgru s izraženim jezgricama i bazofilijom citoplazme te povećanom ekspresijom markera staničnog ciklusa. Kromosomske aberacije, skraćivanje telomera, povećana aktivnost telomerase, hipermetilacija gena *GSTP1*, povećana ekspresija gena *p16*, *p53*, *BCL-2*, *MYC* i *AMACR* te smanjena ekspresija *NKX3.1* i *p27* promjene su prisutne i u raku prostate i u PIN-u visokog stupnja. Također, proliferacija i apoptoza su pojačane i u raku prostate i u PIN-u visokog stupnja (28). U 25 - 30 % slučajeva PIN visokog stupnja se razvije u invazivni rak prostate, a to je proces koji može potrajati i više od deset godina (29). Osim PIN, u prostati je prisutan i drugi tip lezija koji se smatra prekursorom raka prostate, proliferacijska inflamatorna atrofija (engl. *proliferative inflammatory atrophy*, PIA), a javlja se kao odgovor na upalu. Većina studija pokazala je da PIA nema genetičke defekte, da su antiapoptotski gen *Bcl-2* i protektivni gen *GSTP1* više izraženi dok su tumor supresorski geni *PTEN*, *NKX3.1* i *CDKN1B* manje izraženi (27,30).

Rak prostate je rak s niskom stopom mutacija (0,9 po megabazi) (31). U ranom stadiju raka prostate polimorfizmi jedne baze su rijetki, a često su prisutni strukturni rearanžmani i/ili

promjene u broju kopija gena (26). Najčešće promjene povezane s patogeneom lokaliziranog raka prostate su fuzije gena pod kontrolom androgen receptora s genom iz ETS obitelji transkripcijskih faktora (Tablica 3). Oko 50 % pacijenata pripadnika bijele rase ima *TMPRSS2-ERG* fuziju dok je ista fuzija prisuta u manjem udjelu pacijenata pripadnika crne rase ili Azijata (27 - 31 %) (32). Ostale rane aberacije u genomu uključuju inaktivirajuće (engl. *loss-of-function*) mutacije *SPOP* (5 - 15 % pacijenata) i aktivirajuće (engl. *gain-of-function*) mutacije gena *FOXA1* (3 - 5 % pacijenata), a promjene u genu za androgen receptor su rijetke. U Azijata su česte mutacije gena *FOXA1*, *ZBF292* i *CHD1*. Delecije gena *PTEN* te mutacije u genu *TP53* prisutne su u 10 - 20 % pacijenata s lokaliziranim te u oko 50 % pacijenata s uznapredovalim rakom prostate (26). U uznapredovalom obliku česte su mutacije gena uključenih u homolognu rekombinaciju (*BRCA2*, *ATM*) te regulaciju staničnog ciklusa (*TP53* i *RB1*). Metastatski rak prostate ima veću frekvenciju mutacija i promjena u broju kopija nego lokalizirani oblik. 2 - 6 % pacijenata s metastatskim rakom prostate osjetljivim na androgen te > 70 % pacijenata s metastatskim rakom prostate rezistentnim na kastraciju imaju promjene vezane za signalizaciju putem androgen receptora. Amplifikacija, aktivirajuće mutacije, povećana transkripcijska aktivnost androgen receptora, različite varijante transkripata gena koje konstitutivno aktiviraju AR (npr. AR-V7) te inaktivacija represora signalizacije androgenim receptorom (*ZBTB16* i *NCOR1*) su načini kojima rak prostate postaje neosjetljiv na androgene. Pozitivna obiteljska anamneza je značajan rizični faktor za razvoj raka prostate. Muškarci imaju 2 puta veći rizik za razvoj raka prostate ako u prvom koljenu imaju osobu oboljelu od raka prostate te 4 puta veći rizik ako je u trenutku dijagnosticiranja oboljela osoba bila mlađa od 60 godina (9). Udio nasljednog raka prostate je 5 - 15 % te je on posljedica nasljeđenih promjena prvenstveno u genima uključenih u homolognu rekombinaciju (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2*) te popravak krivo sparenih baza (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*) (33). Nasljedni rak prostate nastaje ranije u životu, agresivniji je te je češći povratak bolesti nakon operacije nego kod sporadičnog raka prostate dok nema razlike u sveukupnom preživljenju (19). Opće je prihvaćeno da su nasljedne promjene ključne za inicijaciju tumorigeneze dok su somatske promjene ključne za propagaciju (9). U tablici 3 navedene su mutacije u somatskim i zametnim stanicama te njihova učestalost po stadijima.

Tablica 3. Učestalost promjena u somatskim i zametnim stanicama po stadiju. (Preuzeto i prilagođeno prema Sandhu S i sur.. *Lancet*, 2021 (26)).

	Lokalizirani (n=333)	Metastatski, osjetljiv na kastraciju (n=140)	Metastatski, neosjetljiv na kastraciju (n=444)
Mutacije somatskih stanica	(%)	(%)	(%)
<i>TMPRSS2-ERG</i> fuzija	46	nema podataka	41
Fuzije s drugim genima iz ETS obitelji	14	nema podataka	10
<i>SPOP</i> mutacije	11	11	5
<i>CHD1</i> delecije	7	6	23
<i>FOXA1</i> mutacije	4	1	9
<i>PTEN</i> delecije (homozigotne)	17	17	32
<i>TP53</i> mutacije ili delecije	8	3	40
<i>RB1</i> delecije (homozigotne) ili mutacije	1	7	12
<i>PI3K</i> mutacije	3	5	5
<i>AKT</i> mutacije	1	2	5
<i>BRCA1</i> mutacije ili delecije	1	1	1
<i>BRCA2</i> mutacije ili delecije	3	7	10
<i>ATM</i> mutacije	1	2	1
<i>CDK12</i> mutacije	2	6	4
Mutacije gena popravka krivo sparenih nukleotida ili mikrosatelitna nestabilnost	5	5	4
<i>APC</i> delecije	5	13	8
<i>CTNNB1</i> mutacije	2	6	4
<i>MYC</i> mutacije dobitka funkcije	7	6	23
<i>AR</i> amplifikacije ili mutacije	1	4	59

	Lokalizirani (n=499)	Metastatski, osjetljivost na kastraciju nije određena (n=692)
Mutacije zametnih stanica	(%)	(%)
<i>BRCA1</i>	0,6	0,9
<i>BRCA2</i>	0,2	5,3
<i>ATM</i>	1	1,6
<i>CHEK2</i>	0,4	1,9
<i>PALB2</i>	0,4	0,4
<i>RAD51D</i>	0,4	0,4
Popravlak krivo sparenih baza (Lynchov sindrom)	0,6	0,6

1.3.8. Epigenetika raka prostate

Epigenetika je pojam kojeg je 1942. g. osmislio Conrad Hal Waddington, a doslovni prijevod bi bio „iznad gena“. Za razliku od mutacija koje uzrokuju trajne promjene u sekvenci DNA, epigenetske promjene ne mijenjaju sekvencu DNA već ili uzrokuju promjene u njenoj konformaciji čime se modulira pristup transkripcijskih faktora promotorskim sekvencama ili uzrokuju promjene stupajući u interakciju s mRNA molekulama (34,35). Epigenetički mehanizmi su metilacija DNA, modifikacije histona (metilacija, acetilacija i fosforilacija), remodeliranje kromatina i nekodirajuće RNA (27). U raku prostate, epigenetske promjene prethode genetskim promjenama (34).

Najviše proučavan epigenetički mehanizam je metilacija DNA. Metilacija DNA podrazumijeva dodavanje metilne skupine na citozin koji prethodi gvaninu (engl. *cytosine-phosphate-guanine*, CpG), a reakcija je katalizirana enzimima iz obitelji DNA metiltransferaza. DNMT1 je važna za održavanje metilacije dok su DNMT3A i DNMT3B odgovorne za *de novo* metilaciju (35). Promjene DNA metilacije događaju se još tijekom incijacije raka prostate.

DNA metiltransferaze, posebice *DNMT3A* i *DNMT3B*, visoko su eksprimirane u raku prostate te je primijećena lokalna hipermetilacija promotora gena koja se očituje njihovim utišavanjem (36,37). Do sada je otkriveno više od 50 gena koji su aberantno hipermetilirani u raku prostate,

a imaju ulogu u kontroli staničnog ciklusa, popravku DNA, apoptozi, prijenosu signala, odgovoru na hormonsku terapiju, invaziji i supresiji tumora (Tablica 4) (38).

U raku prostate dolazi do globalne hipometilacije koja na više načina podupire onkogenezu: aktivira onkogene kao što su *c-MYC* i *H-RAS*, aktivira latentne retrotranspozone i doprinosi kromosomskoj nestabilnosti (34).

Tablica 4. Hipermetilirani geni u raku prostate. (Preuzeto i prilagođeno prema Wu Y, Sarkissyan M i sur. *Methods Mol Biol*, 2015 (38)).

Signalni put	Kratika gena	Naziv gena na hrvatskom jeziku	Naziv gena na engleskom jeziku
Hormonalni odgovor	<i>AR</i>	Androgen receptor	Androgen receptor
	<i>ESR1</i>	Estrogen receptor 1	Estrogen receptor 1
	<i>ESR2</i>	Estrogen receptor 2	Estrogen receptor 2
	<i>RARβ2</i>	Receptor retinoične kiseline β2	Retinoic acid receptor β2
	<i>RARRES1</i>	Protein odgovora na receptor retinoične kiseline 1	Retinoic acid receptor responder 1
Kontrola staničnog ciklusa	<i>CCND2</i>	Ciklin D2	Cyclin D2
	<i>RPRM</i>	Reprimo	Reprimo
	<i>SFN</i>	Stratifin	Stratifin
	<i>CDK1</i>	Ciklin-ovisna kinaza 1	Cyclin-dependent kinase 1
	<i>CDKN1B</i>	Inhibitor ciklin-ovisne kinaze 1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27kip)
	<i>CDKN1A</i>	Inhibitor ciklin-ovisne kinaze 1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)
	<i>CDKN2A</i>	Inhibitor ciklin-ovisne kinaze 2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)

Invazija tumora	<i>APC</i>	Adenomatозна polipoza kolona	Adenomatous polyposis coli
	<i>CAV1</i>	Kaveolin 1	Caveolin 1
	<i>CHD1</i>	E-kadherin	E-cadherin
	<i>CHD13</i>	Kadherin 13	Kadherin 13
	<i>CD44</i>	Klaster diferencijacije 44	Cluster of differentiation antigen 44
	<i>LAMA3</i>	α -3 laminin	α -3 laminin
	<i>LAM C2</i>	γ -3 laminin	γ -3 laminin
	<i>TIMP3</i>	TIMP inhibitor metalopeptidaza 3	TIMP metalopeptidase inhibitor 3
Prijenos signala	<i>DKK3</i>	Dickkopf	Dickkopf 3
	<i>EDNRB</i>	Endotelinski receptor tip B	Endothelin receptor type B
	<i>RASSF1A</i>	Gen za domenu 1A obitelji asocijacije RAS	Ras association domain family protein 1 isoform A
	<i>RUNX3</i>	Transkripcijski faktor 3 vezan za žgoljavca	Runt-related transcription factor 3
	<i>SFRP1</i>	Protein povezan s Frizzled receptorom	Secreted frizzled- related protein 1
Popravak oštećenja DNA	<i>GSTM1</i>	Glutation S- transferaza M1	Glutathione S- transferase M1
	<i>GSTP1</i>	Glutation S- transferaza P1	Glutathione S- transferase P1
	<i>GPX3</i>	Glutation peroksidaza 3	Glutathione peroxidase 3
	<i>MGMT</i>	O6-metilguanin DNA metiltransferaza	O-6-methylguanine DNA methyltransferase

	<i>ASC</i>	Protein nalik mrljama povezan s apoptozom koji sadrži 13 domenu za aktivaciju i privlačenje kaspaza	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
Tumor supresor	<i>RB</i>	Retinoblastom	Retinoblastoma
	<i>TMS1</i>	Meta metilacijom induciranog utišavanja 1	Target of methylation-induced silencing 1
	<i>DAPK</i>	Protein kinaza povezana sa smrću	Death-associated protein kinase
	<i>RBL1</i>	Protein sličan retinoblastomu 1	Retinoblastoma-like 1
	<i>PAX6</i>	Upareni okvir 6	Paired box gene 6
	<i>FHIT</i>	Fragilna histidinska trijada	Fragile histidine triad
Apoptoza	<i>BCL2</i>	B-stanični limfom 2	B cell lymphoma 2
	<i>DAPK</i>	Protein kinaza povezana sa smrću	Death-associated kinase
	<i>CASP8</i>	Kaspaza 8	Caspase 8, Apoptosis-Related Cysteine
	<i>CD14</i>	Klaster diferencijacije 14	Cluster of differentiation antigen CD14
	<i>MDR1</i>	Receptor za višestruku otpornost na lijekove 1	Multidrug resistance receptor 1

Ostali	<i>PTGS2</i>	Sintetaza prostaglandin endoperoxidaze 2	Prostaglandin endoperoxidase synthase 2
	<i>HIC</i>	Hipermetiliran u karcinomu 1	Hypermethylated in cancer
	<i>GLUT4</i>	Glukozni transporter tipa 4	Solute carrier insulin transport
	<i>GATA3</i>	GATA vezujući protein 3	Gata binding protein 3
	<i>SYBL1</i>	Sinaptobrevinu sličan 1	Synaptobrevin-like 1
	<i>ATF2</i>	Aktivacijski transkripcijski faktor 2	Activating transcription factor 2
	<i>MYOD</i>	Miogeni faktor diferencijacije	Myogenic differentiation 1
	<i>SIM2</i>	Jedno-skloni homolog 1	Single-minded homologue 1
	<i>WT1</i>	Wilmsov tumor gen 1	Wilms tumor 1
	<i>CIITA</i>	induktor transkripcije MHC klase II	Class 2 MHC transactivator

Iako potencijalno reverzibilne, promjene u DNA metilaciji svojstvene raku prostate su česte te su stabilne tijekom progresije što ih čini pogodnima za biomarkere. Metilacija nekih gena već je dio komercijalno dostupnih testova za rak prostate (29).

Tumorsko i netumorsko tkivo prostate razlikuje se i po oznakama na histonima. Razine H4Ac, H3Ac, H3K4, H3K9me3, H3K9me2 and H3K4me1 su značajno niže u tumorskome tkivu. H3K9me2 i H3Ac imaju osjetljivost 8 % i specifičnost 90 % za razlikovanje tumorskog i netumorskog tkiva prostate (35).

1.4. Biomarkeri raka prostate

1.4.1 PSA

PSA je jednolančani glikoprotein koji je po funkciji serinska proteaza. PSA je jedan od 15 serinskih proteaza iz porodice kalikreina. Svi geni iz ove porodice nalaze se u neprekinutom slijedu na 19. kromosomu (19q13.3-13.4) te imaju po 5 egzona slične veličine. PSA je treći u tome nizu te je kodiran genom za humani kalikrein-3 (*hKL3*) (39). Protein PSA prisutan je samo u epitelnim stanicama prostate, i acinusa i kanalića, te se izlučuje u lumen u inaktivnom obliku kao pro-PSA. Serinska proteinaza hK2 od pro-PSA proteolitički odcjepljuje oligopeptid duljine 7 aminokiselina čime nastaje enzimski aktivan, zreli PSA (39).

Koncentracija PSA je milijun puta viša u sjemennoj tekućini (0.5 - 2.0 mg/mL) nego u serumu (oko 1.0 ng/mL). Funkcija PSA je cijepanje seminogelina i fibronektina čime se postiže likvefakcija sperme i povećava pokretljivost spermija (40).

Zbog normalne arhitekture prostate PSA se zadržava unutar organa, a tek mali dio uspije procuriti u krvotok. Koncentracija PSA u serumu je niska te ovisi o volumenu prostate, rasi i starosti. PSA je prisutan u krvi u slobodnom obliku (10 - 30 %) ili je kovalentno vezan za inhibitor proteaze α 1-anti-kimotripsin (70 - 90 %) ili α 2-makroglobulin (< 1 %). Narušena arhitektura prostate, bilo uzrokovana bolešću (rak, BHP, prostatitis) ili manipulacijom (masaža, biopsija, transuretralna resekcija, seksualna aktivnost), omogućava ulazak PSA u krvotok te dolazi do povećanja koncentracije PSA (40,41). Od 80-tih godina 20. stoljeća PSA se koristi kao marker za rak prostate u probiru te praćenju tijeka bolesti i liječenja (3).

PSA probir je posljednjih desetljeća rezultirao smanjenjem incidencije uznapredovalog raka prostate te je najčešće dijagnosticirani oblik raka prostate onaj lokalizirani s velikom uspješnošću liječenja (12). Rast PSA zabilježen je kod više od 75 % bolesnika s rakom prostate. Općenito, vrijednosti PSA > 4 ng/mL stvaraju sumnju na rak prostate te se pacijenti upućuju na biopsiju (27). Međutim, većina pacijenata s vrijednostima ukupnog PSA između 4 i 10 ng/ml ima BHP. BHP je česta i u pacijenata s rakom prostate. U muškaraca starijih od 60 godina razina PSA u krvi se povećava što dodatno smanjuje osjetljivost PSA kao markera raka prostate. PSA u krvi raste sa starenjem i to 0.04 ng/mL godišnje. Veći godišnji rast imaju pacijenti s BHP-om (0.07 - 0.27 ng/mL) i pacijenti s rakom prostate (> 0.75 ng/mL) (27). S obzirom da vrijednosti PSA u krvi rastu starenjem, za dijagnostiku se primjenjuje i dobno specifična vrijednost PSA (Tablica 5) (42).

Tablica 5. Dobno specifične vrijednosti PSA (42).

Dob (godine)	Referentnih interval (ng/mL)
40 - 49	0,0 - 2,5
50 - 59	0,0 - 3,5
60 - 69	0,0 - 4,5
70 - 79	0,0 - 6,5

Osim godina, lijekovi također mogu utjecati na razinu PSA u krvi. Inhibitori 5-alfa reduktaze koriste se za liječenje BHP-a, a snižavaju koncentraciju PSA za otprilike pola (15).

PSA se koristi za dijagnostiku, stratifikaciju rizika i praćenje međutim, zbog niske prediktivne vrijednosti (~ 30 %) i niske specifičnosti, rezultira velikim brojem nepotrebnih biopsija i detekcijom velikog broja asimptomatskih oblika s niskim rizikom od razvoja klinički značajnog oblika raka prostate. PSA probirom rak prostate je otkriven u više od 60 % asimptomatskih pacijenata čime pacijenti koji nisu životno ugroženi bivaju nepotrebno podvrgnuti liječenju raka prostate, a time i riziku od seksualne, urinarne ili crijevne disfunkcije (43). Da bi se poboljšala osjetljivost PSA, uvedene su različite varijante određivanja koncentracije PSA. PSA gustoća je vrijednost koja se dobije dijeljenjem serumske koncentracije PSA s volumenom prostate, a posebno je korisna kod pacijenata s dvojbenim rezultatima magnetske rezonance. Unaprijeđena verzija PSA gustoće je PSA gustoća prijelazne zone što je zapravo omjer serumske koncentracije PSA i volumena prijelazne zone prostate. Brzina porasta PSA je zapravo godišnji porast vrijednosti serumskog PSA, a vrijeme udvostručenja koncentracije PSA daje informaciju o broju mjeseci potrebnim za udvostručavanje serumskog PSA te se obje vrijednosti koriste u praćenju relapsa i napredovanja raka prostate. Od ostalih varijanti određuje se još f/tPSA, omjer slobodnog i ukupnog PSA u serumu, te cPSA, koncentracija vezanog PSA (15,40).

PSA nije tumor specifičan marker već tkivno specifičan te razina u krvi može biti povećana i u nemalnim bolestima, kao što su BHP i prostatitis, te nakon digitorektalnog pregleda i biopsije (15). Kod samo trećine pacijenata u kojih je indicirana biopsija patohistološki se dijagnosticira rak prostate što znači da je velik broj pacijenata nepotrebno bioptiran, a također se dijagnosticiraju i pacijenti s indolentnim rakom prostate (44,45).

1.4.2 Noviji biomarkeri raka prostate

1.4.2.1 Tkivni biomarkeri

Na tržištu su dostupni različiti testovi bazirani na tkivu ili uzorcima tekućinskih biopsija. Tkivni testovi imaju za cilj predvidjeti ponašanje raka prostate kako bi se donijela odluka o liječenju/praćenju ili ocijeniti da li je rezultat biopsije lažno negativan te je stoga biopsiju potrebno ponoviti (Tablica 6).

Tablica 6. Prikaz dostupnih biomarkera za rak prostate (43,46,47).

Test	Tip molekule	Koje molekule	Svrha/Indikacija
Tkivni testovi			
Prolaris test (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA)	mRNA	31 gen staničnog ciklusa i 15 domaćinskih gena	Procjena agresivnosti.
	klinički podaci	Gleasonov zbroj, serumski PSA	
ConfirmMDx (MDxHealth, Inc, Irvine, CA, USA)	metilacija DNA	<i>RASSF1, GSTP1 i APC</i>	Procjena rizika od raka prostate u pacijenata s negativnom biopsijom.
Oncotype DX GPS test (Genomic Health, Redwood City, CA, USA)	mRNA	12 gena vezanih uz rak (proliferacija, organizacija citoskeleta, signalizacija androgenom, stromalni odgovor) i 5 referentnih gena	Procjena agresivnosti.
Decipher test (GenomeDx, San Diego, CA, USA)	mRNA	22 gena (stanični ciklus, proliferacija, diferencijacija, adhezija, signalizacija androgenom, imunološki odgovor)	Procjena metastaza unutar 5 godina nakon radikalne prostatektomije ili smrtnosti od raka prostate unutar 10 godina.

ProMark (Metamark, Cambridge, MA, USA)	proteini	DERL1, CUL2, SMAD4, PDSS2, HSPA9, FUS, fosforilirani S6 i YBOX1	Procjena agresivnosti.
---	----------	---	------------------------

1.4.2.2 Biomarkeri iz tekućinskih biopsija

Biopsija prostate je invazivna i nelagodna metoda, a ne samo da nosi sa sobom rizik od potencijalnih komplikacija nego je i pristup tumorskom tkivu ograničen, a dobiveni bioptat ne odražava ni intratumorsku heterogenost kao ni pojavu novih klonova stanica nastalih tumorskom evolucijom. Nadalje, postoji mogućnost da tumorsko tkivo u prostati postoji, ali nije uzorkovano biopsijom te je stoga nalaz lažno negativan, a biopsiju je potrebno ponoviti.

Navedene nedostake pokušava unaprijediti novi, minimalno invazivan pristup u dijagnostici tumora - tekućinska biopsija. Razvijeni su različiti testovi bazirani na tekućinskim biopsijama koji imaju za cilj smanjiti nepotrebno bioptiranje uz istovremeno povećano detektiranje klinički značajnih oblika raka prostate na minimalno invazivan način (43). Trenutno dostupni testovi za rak prostate temelje se na detekciji određenih varijanti proteina kalikreina u krvi ili određenih RNA molekula u urinu u kombinaciji s kliničkim podacima ili bez njih (Tablica 7). Urin je lako dostupna tekućina, a uzorkovanju za većinu testova prethodi digitorektalni pregled kako bi se povećalo izlučivanje prostate, a time i stanica raka prostate, u urin (43). Osim minimalnog rizika za zdravlje, testovi iz tekućinskih biopsija puno su financijski pristupačniji od biopsije. Naime, u SAD-u cijena biopsije koja proteče bez komplikacija iznosi 1750 USD, dok je cijena, primjerice, urinskog testa SelectMDx 500 USD (43).

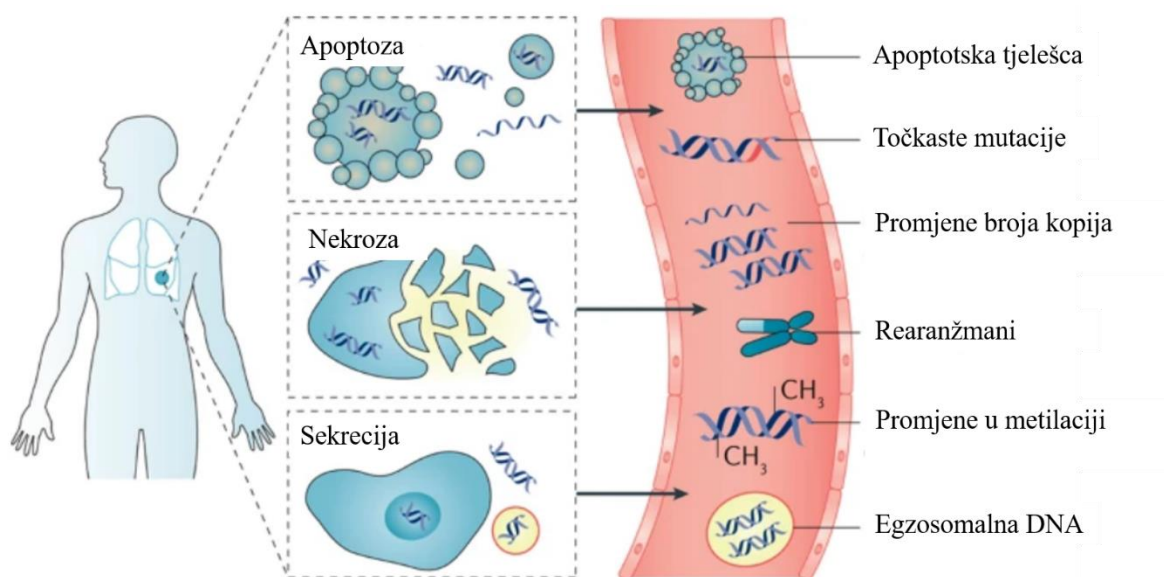
Tablica 7. Prikaz dostupnih tekućinskih biomarkera za rak prostate (43,46,47).

Test	Koje molekule	Svrha/Indikacija	Svrha/Indikacija
Krvni testovi			
Prostate Health Index (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)	proteini	fPSA, tPSA i [-2]proPSA	Pacijenti s serumskim vrijednostima PSA između 4 i 10 ng/mL i urednim digitorektalnim pregledom. Odluka za biopsiju/rebiopsiju. Prognoza agresivnosti.
4K Score (OPKO lab, Miami, FL, USA)	proteini	tPSA, fPSA, intaktni PSA, kalikreinu slična peptidaza 2 (hk2)	Pacijenti sa sumnjivim digitorektalnim pregledom ili vrijednošću PSA.
	klinički podaci	godine, povijest biopsije	Odluka za biopsiju/rebiopsiju.
Urinski testovi			
Progens PCA3 test (Hologic Inc., Marlborough, MA, USA)	RNA	PSA i PCA3	Pacijenti stariji od 50 g s povišenim serumskim vrijednostima PSA i prethodno negativnom biopsijom. Odluka za rebiopsiju.
SelectMDx (MDxHealth, Irvine, CA, USA)	mRNA	<i>DLX1</i> , <i>HOXC6</i> i <i>KLK3</i>	Pacijenti s serumskim vrijednostima PSA između 4 i 10 ng/mL i/ili sumnjivim digitorektalnim pregledom. Odluka za biopsiju i procjena raka
	klinički podaci	digitorektalni pregled, godine, volumen prostate	

			prostate visokog stupnja.
ExoDx prostate Intelliscore (Intelliscore) (Exosome Diagnostics Inc., Cambridge, MA, USA)	RNA	<i>ERG, PCA3 i SPDEF</i>	Pacijenti stariji od 50 godina s vrijednostima serumskog PSA 2-10 ng/mL. Odluka za biopsiju.
	klinički podaci	godine, rasa, obiteljska anamneza, serumski PSA	
Mi-Prostate Score (MPS, LynxDx, Ann Arbor, MI, USA)	protein, RNA	serumski PSA, urinski <i>PCA3</i> i <i>TMPRSS-ERG</i>	Pacijenti sa sumnjivim PSA vrijednostima. Odluka za inicijanu ili ponovljenu biopsiju i procjena rizik od raka prostate visokog stupnja (Gleasonov zbroj > 7)

1.5 Nestanični DNA

U uzorcima tekućinskih biopsija osim proteina i RNA molekula prisutne su i različite druge molekule i strukture npr. cirkulirajuće nukleinske kiseline kao što su nestanična DNA (cfDNA, engl. *cell-free DNA*), cirkulirajuće tumorske stanice, ekstracelularne vezikule i nukleosomi koji su potencijalni biomarkeri raka (48). cfDNA je obećavajući minimalno invazivan biomarker i jedan od najproučavanijih analita u uzorcima tekućinskih biopsija (48). Većina cfDNA u zdravih ljudi podrijetlom je iz hematopoetskih stanica (55 % iz leukocita, 30 % iz eritrocitnih progenitora), a manji dio iz endotelinih stanica (~10 %), neurona (~2 %) i hepatocita (~1 %) (49). Koncentracije cfDNA u krvi zdravih ljudi kreću se između 0 i 100 ng/ml. Uslijed lize stanica, apoptoze, nekroze i aktivnog ispuštanja cfDNA dospijeva u tjelesne tekućine (Slika 5) (50). Poluživot cfDNA u krvi je između 16 min i 2,5 h što omogućava informiranje o trenutnom stanju, a iz krvotoka se eliminira djelovanjem nukleaza, ekskrecijom preko bubrega, degradacijom u makrofazima ili unošenjem u stanice jetre i slezene (48)



Slika 5. Podrijetlo cfDNA u tjelesnim tekućinama te promjene koje je moguće analizirati (Preuzeto i prilagođeno prema Wan JCM i sur., *Nat Rev Cancer*, 2017 (48)).

Koncentracije cfDNA veće su u pacijenata s rakom te se povećavaju sa stadijem i metastazama. Vjeruje se da je povećanje posljedica većeg ispuštanja genetičkog materijala iz tumorskih stanica međutim mogući uzroci su i smanjena sposobnost otklanjanja cfDNA iz cirkulacije. Povećane koncentracije cfDNA u krvi nisu specifične za rak već do povećanja dolazi i uslijed vježbanja, traume, infekcije, dijabetesa, infarkta miokarda, transplantacije, operacije, itd. (48,49,51). cfDNA je molekula pogodna za analize točkastih mutacija, kromosomskih rearanžmana, promjena broja kopija gena i metilacije DNA. cfDNA može se koristiti za dijagnostiku, prognostiku, odabir terapije te praćenje bolesti i to u stvarnom vremenu zbog kratkog poluživota (48).

Prednosti cfDNA su:

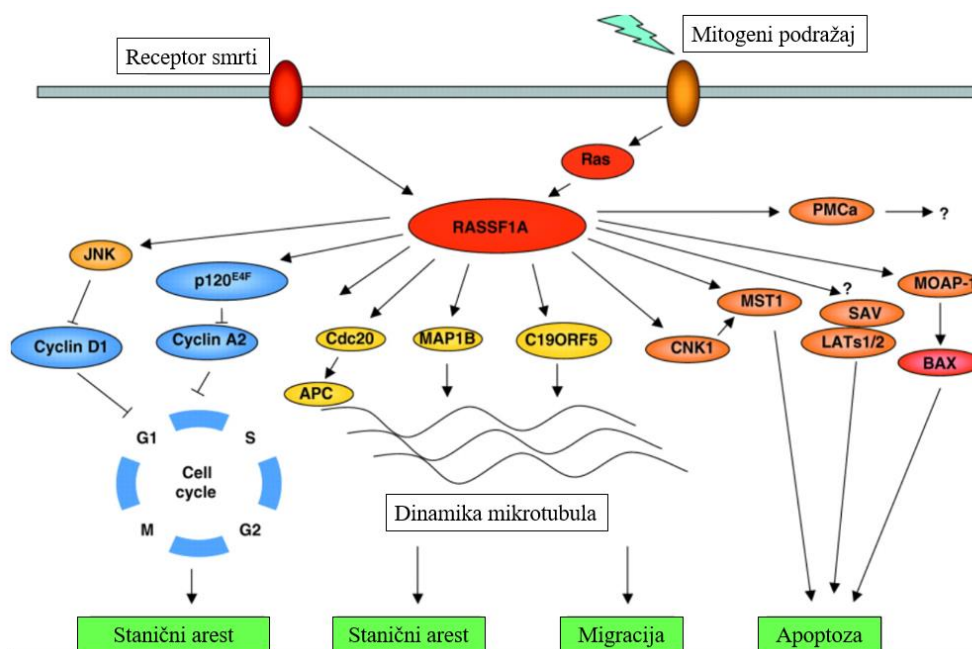
- Uzorkovanje je, za razliku od tkivne biopsije, minimalno invazivno i jeftino.
- Uzorkovanje se može ponavljati i na taj način pratiti promjene tijekom liječenja.
- cfDNA najvjerojatnije odražava genetski profil svih podklonova tumora tj, tumorsku heterogenost, za razliku od tkivne biopsije.

Nedostatci cfDNA su:

- Kratki poluživot.
- Mutacije specifične za tumor su prisutne u malim količinama (52).

1.6 RASSF1

Obitelj RASSF čini deset gena, a ime su dobili zbog posjedovanja Ras-vezujuće domene. Gen *RASSF1* (engl. *Ras association domain family member 1*) ima promotore unutar dva CpG otoka te osam egzona. U prvom CpG otoku nalaze se promotorske regije za varijante A, D, E, F i G, a u drugome za B, C i H (53). Aktivacijom različitih promotora i različitim alternativnim prekrajanjem nastaje osam transkripata gena *RASSF1*. Glavni transkripti su *RASSF1A* i *RASSF1C* i ubikvitarno su eksprimirani u normalnome tkivu te dijele 60 % proteinske sekvence (53). *RASSF1A* djeluje kao tumor supresor na više razina. Kontrolira diobu stanice tako da inhibira akumulaciju ciklina D1 čime zaustavlja stanični ciklus u G1/S fazi te stabilizira p53 (53). Povezuje Ras sa dva glavna proapoptotska signalna puta: Bax i Hippo (54). Bitan je i u aktiviranju apoptoze kao odgovoru na oštećenja DNA. *RASSF1A* sudjeluje u stabilizaciji mikrotubula, organizaciji diobenog vretena te kontroli pokretljivosti i invazije (Slika 6) (53,55). Metilacija prvog CpG otoka je jedan od najčešćih događaja u humanim malignim tumorima, a posljedica je povećane ekspresije *DNMT3B*. Drugi CpG otok u malignim tumorima ostaje nemetiliran te njegova ekspresija nije promijenjena (53).



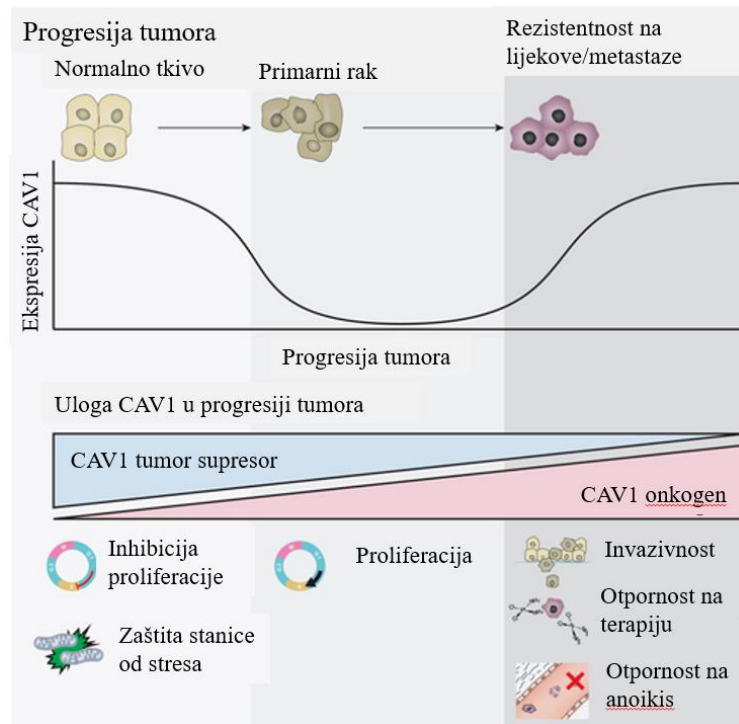
Slika 6. Procesu u kojima sudjeluje *RASSF1A*. (Prilagođeno i preuzeto prema Donniger H i sur. *J Cell Sci.* 2007 (55)).

1.7 CAV1

Obitelj kaveolin gena čine tri gena: *CAV1*, *CAV2* i *CAV3*. *CAV1* i *CAV2* su eksprimirani u različitim tkivima dok je ekspresija gena *CAV3* ograničena na mišićne stanice. Većina studija usmjerena na gene iz ove obitelji u onkologiji napravljena na je genu *CAV1* te je pokazano da ima utjecaja na različite procese u tumoru te je povezan i sa prognozom bolesti. Kaveolin-1 je glavni strukturni protein kaveola, invaginacija membrane promjera 50-100 nm. Za stvaranje kaveola potreban je i protein CAVIN1, ali ako njega nema onda se *CAV1* nalazi u dijelovima membrane zvanim skele (56). Gen *CAV1* se ne nalazi samo u staničnoj membrani već i u membranama nekih organela (Golgijev aparat, endoplazmatski retikulum, mitohondrij, jezgra, lizosomi, peroksisomi), endocitotskim i ekstracelularnim vezikulama te lipidnim kapljicama (57).

CAV1 postoji u dvije izoforme, α i β , od čega je β izoforma kraća od α izoforme za 31 aminokiselinu na N-kraju. *CAV1* čine četiri domene: N-terminalna domena (1. - 81. aminokiselina), skela (engl. *scaffolding*) (82. - 101. aminokiselina), intramembranska (102. - 134. aminokiselina) i C-terminalna domena (135. - 178. aminokiselina) (58). Osim za stvaranje kaveola, *CAV1* je bitan za regulaciju mnogih fizioloških procesa: endocitoze, vezikularnog transporta, transporta lipida, homeostaze kolesterola, rada mitohondrija, proliferacije te provođenja signala (59,60). Preko svoje „scaffolding“ domene *CAV1* stupa u interakciju s proteinima HER2, estrogenskim receptorom, receptorom spregnutim s G proteinom, MAPK, proteinima iz obitelji Src kinaza i H-Ras (61).

CAV1 pokazuje dvojnu ulogu - kao tumor supresor i kao onkoprotein (Slika 7) (62). *CAV1* štiti normalnu stanicu od oštećenja, pomaže održati normalnu staničnu signalizaciju i inhibira pretjeranu proliferaciju (57). Inducira G0/G1 arest (preko p53/p21 i inhibirajući ciklin D1) te inhibirajući ekspresiju survivina, antiapoptotskog faktora, ali samo uz prisustvo E-kadherina. Kad razina *CAV1* padne ispod praga, gubi se i njegov tumorsupresijski učinak, stanica postaje osjetljiva na stres uzrokovan onkogenima te inicira proliferaciju i transformaciju (57). Niska razina ekspresije *CAV1* u tumorskim stanicama pomaže u prevladavanju senescencije inducirane onkogenom (59). Tijekom progresije ili terapije citotoksičnim agensima *CAV1* se može ponovno eksprimirati te se sada *CAV1* ponaša kao onkoprotein pomažući tumorskim stanicama da izbjegnu staničnu smrt, induciraju otpornost na terapiju te metastaziraju (57,62). Ekspresija *CAV1* korelira s metastatskim potencijalom i slabijim preživljenjem pacijenata s rakom prostate (62).



Slika 7. CAV1 tijekom razvoja raka. (Preuzeto i prilagođeno prema Raudenska M i sur. *Int J Cancer*. 2020 (57)).

2. HIPOTEZA

Geni *RASSF1* i *CAV1* u nestaničnoj DNA krvi i ejakulata bolesnika s rakom prostate hipermetilirani su u odnosu na gene *RASSF1* i *CAV1* u nestaničnoj DNA krvi i ejakulata bolesnika s benignom hiperplazijom prostate.

3. SVRHA I CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

Odrediti potencijal obrazaca metilacije nestanične DNA promotorskih regija gena *RASSF1* i *CAV1* u krvi i ejakulatu bolesnika kao biološkog molekularnog biljega raka prostate i/ili benigne hiperplazije prostate

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Identificirati razlike obrasca i stupnja metilacije nestanične DNA gena *RASSF1* i *CAV1* u uzorcima krvi i ejakulata bolesnika sa rakom prostate te bolesnika s BHP.
2. Identificirati razlike obrasca i stupnja metilacije gDNA (genomska DNA) gena *RASSF1* i *CAV1* u tkivu raka prostate i BHP.
3. Odrediti ekspresiju gena *RASSF1* i *CAV1* na proteinskoj razini u tkivu raka prostate i BHP.
4. Usporediti obrazac metilacije gena u tkivu s proteinskom ekspresijom u tkivu i obrascem metilacije u cfDNA krvi i ejakulata unutar i između skupina pacijenata
5. Usporediti dobivene molekularne rezultate s prikupljenim anamnestičkim i kliničkim podacima (dob, preživljenje, Gleason grupa, TNM).

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U ovo istraživanje je bilo uključeno ukupno 80 pacijenata kod kojih je, na osnovi digitorektalnog pregleda i vrijednosti PSA u krvi, postojala sumnja na rak prostate te su stoga upućeni na transrektalnim ultrazvukom vođenu biopsiju prostate. Prije biopsije prostate, u Klinici za urologiju KBC-a Zagreb i KBC-a Sestre milosrdnice svi ispitanici su informirani o istraživanju te su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Nakon informiranja ispitanici su dali uzorke krvi i ejakulata te su pristupili biopsiji. U istraživanje su uključeni ispitanici s dijagnozom raka prostate i BHP-a postavljenom tijekom rutinske obrade pacijenata i patohistološkom analizom potvrđenih dijagnoza, sukladno pravilima struke i tada najnovijoj WHO klasifikaciji (2016.) i 8. izdanju AJCC-a. Sukladno dijagnozi, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: rak prostate ili BHP, a u svakoj skupini je bilo 40 ispitanika.

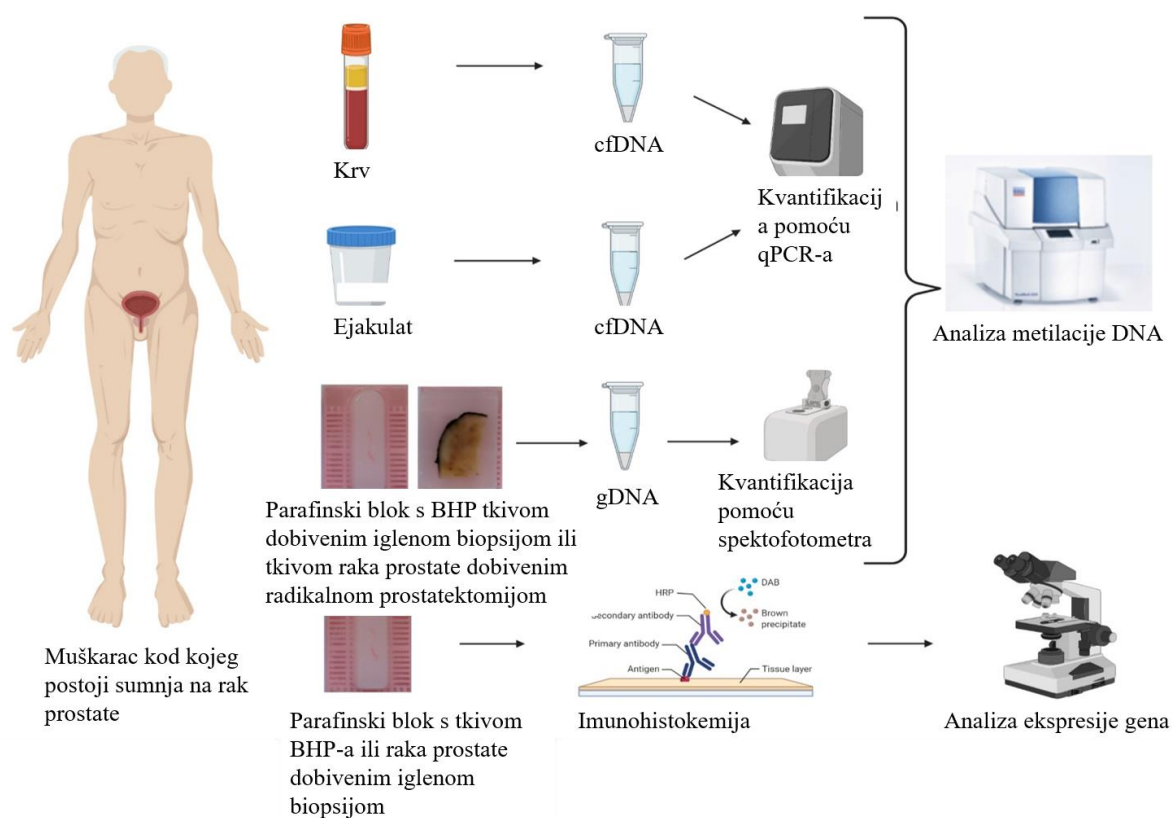
Po završetku svih analiza koje se poduzimaju u dijagnostičke svrhe i postavljanja dijagnoze na Kliničkom zavodu za patologiju KBC-a Zagreb i KBC-a Sestre milosrdnice parafinski blokovi tkiva fiksiranog u formalinu su preuzeti te su skupa s uzorcima krvi i ejakulata transportirani na Zavod za biologiju Medicinskog fakulteta gdje se obavila molekularna analiza prikupljenog biološkog materijala. Osim uzoraka, prikupljeni su klinički i anamnestički podaci o ispitanicima (dob, PSA, Gleason grupa, TNM), a od uzorkovanja do analize podataka prošlo je premalo vremena da bi se donosili zaključci o preživljenju. Od ispitanika s rakom prostate kod kojih je učinjena radikalna prostatektomija za potrebe istraživanja preuzeti su i parafinski blokovi tkiva radikalne prostatektomije fiksiranog u formalinu.

Svi uzorci i podaci o pacijentima su bili kriptirani, a istraživanje je provedeno u skladu sa svim važećim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje postupaka uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju i Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske. Ovo istraživanje je provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Epigenetički biomarkeri raka prostate“ (epiPro, UIP-2017-05-8138) te su sve etičke dozvole dobivene od nadležnih Etičkih povjerenstava: Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa odobrenja 641-01/18-02/01 od 25. siječnja 2018), Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice (broj odobrenja EP-18327/17-2 od 7. prosinca 2017.) i Etičkog povjerenstva KBC Zagreb (klasa odobrenja 8.1-17/213-2, br. 02/21 AG od 11. prosinca 2017.).

4.2 Dizajn studije

Dizajn studije prikazan je na Slici 8, a sastavljen je od sljedećih elemenata:

1. Informiranje pacijenta o svrhi istraživanja te prikupljanje pristanka i uzoraka krvi i ejakulata
2. Obrada uzoraka krvi i ejakulata
3. Preuzimanje parafinskih blokova iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Ljudevit Jurak KBC-a Sestre Milosrdnice i Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb
4. Rezanje parafinskih blokova
5. Hemalaun-eozon (HE) bojanje parafinskih rezova
6. Imunohistokemijsko bojanje parafinskih rezova protutijelima na RASSF1 i CAV1
7. Izolacija i kvantifikacija gDNA iz tkiva
8. Izolacija i kvantifikacija cfDNA iz krvne i sjemene plazme
9. Biulfitna konverzija gDNA i cfDNA
10. PCR i pirosekvenciranje gDNA i cfDNA regija gena *RASSF1A* i *CAV1*
10. Analiza rezultata



Slika 8. Dizajn studije. Kreirano pomoću alata BioRender.

4.3 Prikupljanje i obrada uzoraka tekućinskih biopsija

Periferna venska krv prikupljena je u dvije epruvete s antikoagulansom EDTA (Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria). Odmah po vađenju iz krvi je izdvojena plazma dvostrukim centrifugiranjem (1400 x g, 10 min pa 4500 x g, 10 min) na sobnoj temperaturi) prema protokolu (63).

Uzorak ejakulata prikupljen je u sterilnu čašicu masturbacijom nakon 3 - 5 dana apstinencije. Nakon 30 min likvefakcije na sobnoj temperaturi, sjemeni plazma je izdvojena dvostrukim centrifugiranjem (400 x g, 10 min pa 12000 x g, 10 min) na sobnoj temperaturi) prema protokolu (63).

Sve tri frakcije krvi i ejakulata su transportirane na Zavod za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i pohranjene na – 80 °C do daljnje analize.

4.4 Obrada uzoraka- tkivo

Od ispitanika s dijagnozom BHP uzeta su dva parafinska bloka s tkivom dobivena iglenom biopsijom. Od pacijenata s dijagnozom raka prostate uzet je jedan parafinski blok s tkivom dobivenim iglenom biopsijom, a ukoliko je ispitanik bio podvrgnut radikalnoj prostatektomiji uzet je i jedan blok s tim tkivom. Odabrani su parafinski blokovi koji imaju i tkivo zahvaćeno i nezahvaćeno rakom prostate. Parafinski blokovi tkiva biopsije i radikalne prostatektomije narezani su na kliznom mikrotomu. Od svakog ispitanika s dijagnozom BHP jedan blok s tkivom dobivenim iglenom biopsijom narezan je na debljinu 4 µm te je korišten za analizu ekspresije dok je drugi blok narezan na debljinu 10 µm te je korišten za izolaciju gDNA i analizu metilacije. Od svakog ispitanika s dijagnozom raka prostate jedan blok s tkivom dobivenim iglenom biopsijom narezan je na debljinu 4 µm te je korišten za analizu ekspresije.

Za izolaciju gDNA iz tkiva pacijenata s rakom prostate nije korišteno tkivo dobiveno iglenom biopsijom već radikalnom prostatektomijom jer ono omogućava pouzdano odvajanje tumorskog od okolnog netumorskog tkiva. Parafinski blokovi radikalne prostatektomije narezani su na 4 µm i 10 µm. Tanji rezovi obojani su HE, a iz debljih je izolirana gDNA za analizu metilacije.

4.5. Hemalaun-eozin bojanje parafinskih rezova

Po jedan rez iz svakog parafinskog bloka debljine 4 µm obojan je HE. Ukratko, rezovi su 60 min grijani u termostatu na 55 °C. Potom su deparafinirani u ksilolu (2 puta po 10 min),

rehidrirani u padajućem nizu koncentracije alkohola (2 x 100 % po 5 min, 2 x 96 % po 5 min, 1 x 70 % po 5 min) te potopljani u destiliranoj vodi (1 x 5 min). Rezovi su umočeni u hemalaun (50 s), kratko isprani u destiliranoj pa ispirani pod mlazom vodovodne vode (5 min). Nakon ispiranja u destiliranoj vodi (5 min), rezovi su umočeni u eozin (40 s), kratko isprani u 70 %-tnom alkoholu (3 puta), 95 % alkoholu (2 puta) i 100 % alkoholu (2 puta po 30 s). Nakon dehidracije rezovi su umočeni u ksilol (2 puta po 30 s, 1 put po 15 min), uklopljeni u odgovarajući medij (BioMount DPX Low) te pokriveni pokrovnicom.

4.6 Imunohistokemijsko bojanje parafinskih rezova

Po jedno staklo s rezom debljine 4 µm tkiva dobiven iglenom biopsijom pacijenata s dijagnozom BHP-a i raka prostate obojan je imunohistokemijski s protutijelima protiv RASSF1 i CAV1. Rezovi su grijani u termostatu na 55 °C 60 min. Potom su deparafinirani u ksilolu (2 puta po 10 min), rehidrirani u padajućem nizu koncentracije alkohola (2 x 100 % po 5 min, 2 x 96 % po 5 min, 1 x 70 % po 5 min) te potopljani u destiliranoj vodi (1 x 5 min). Demaskiranje antigena učinjeno je kuhanjem rezova u kuhalu na paru u otopini za demaskiranje antigena (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,05 % Tween 20, pH 9). Rezovi su isprani u TBS puferu (tris-puferirana fiziološka otopina, engl. *tris-buffered saline*, TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) 5 min. Stakla su posušena, a rezovi zaokruženi PAP-PEN olovkom koja ostavlja hidrofobni trag tako da se nanescena tekućina zadrži na rezu. Na rezove je u bunariće napravljene PAP-PEN-om stavljena tekućina za blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela - 5 % goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA, Sigma-Aldrich, SAD) (20 min). Otopina za blokiranje je otresena te je u bunariće nanescena otopina primarnog protutijela razrijeđenog u puferu (0.1 % Tween 20, 1 % BSA/TBS) (Tablica 8). Rezovi su inkubirani u primarnom protutijelu preko noći na 4 °C. Sutradan su rezovi ispirani u TBS-u (5 puta po 5 min) te su blokiranje endogene peroksidaze inkubacijom u 3 % H₂O₂ (20 min u mraku). Nakon ispiranja u TBS-u (3 puta po 5 min) nanesceno je sekundarno protutijelo iz seta (Dako REAL EnVision Detection System, K5007, Agilent Technologies, Njemačka) (60 min, 37 °C). Stakla su isprana TBS-om (3 puta po 5 min) te je signal vizualiziran 3,3-diaminobenzidin tetrahidrokloridom iz seta (DAB, Dako REAL EnVision Detection System, K5007, Agilent Technologies, Njemačka) (6 min u mraku). Nakon ispiranja u destiliranoj vodi (1 puta po 5 min), rezovi su obojani hemalaunom (10 s) te isprani u destiliranoj vodi (kratko) pa pod mlazom vodovodne vode (8 min). Rezovi su umočeni u destiliranu vodu (1 puta po 5 min), provedeni kroz niz koncentracije alkohola (1 puta 70 % , 2 puta 96 % , 2 puta 100 % po 5 min) te umočeni u ksilol (2 puta po

10 min). Rezovi su uklopljeni u odgovarajući medij (BioMount DPX Low), pokriveni pokrovnicom te analizirani pod mikroskopom. Kao pozitivne i negativne biološke kontrole korišteni su rezovi tkiva u kojima su proteini prisutni odnosno odsutni), a kao negativna metodološka kontrola korišteno je tkivo za pozitivnu kontrolu, ali je na njega umjesto primarnog protutijela dodan samo pufer za razrjeđivanje protutijela.

Tablica 8. Primarna protutijela korištena u eksperimentu i njihove kontrole.

Antigen	Šifra protutijela	Proizvedeno u	Razrjeđenje	Pozitivna/ negativna kontrola	Vrijeme demaskiranja antigena
RASSF1	HPA040735 (Atlas antibodies)	Zecu (poliklonalno)	1:200	Bubreg / karcinom bubrega	30 min
CAV1	HPA049326 (Atlas antibodies)	Zecu (poliklonalno)	1:2 500	Bubreg / slezena	20 min

4.7 Analiza imunohistokemijskih preparata

Obojana stakla analizirana su od strane iskusnog uropatologa pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus Bx51). Signal je kvantificiran u tri područja tkiva (BHP, rak prostate, okolno netumorsko tkivo) te u svakom od područja u epitelnim i stromalnim stanicama. Kvantifikacija je obuhvaćala procjenu intenziteta reakcije te postotak imunoreaktivnih stanica svrstanih u kategorije (Tablica 9). Ekspresija gena na proteinskoj razini izražena je semikvantitativno kao imunohistokemijski indeks bojanja (engl. *immunoreactivity score*, IRS), a dobiven je množenjem kategorije intenziteta reakcije i kategorije postotka imunoreaktivnih stanica.

Tablica 9. Kriteriji svrstavanja u kategorije.

Postotak imunoreaktivnih stanica	Kategorija postotka imunoreaktivnih stanica	Intenzitet reakcije	Kategorija intenziteta reakcije
0 %, nema imunoreaktivnih stanica	0	Nema reakcije	0
1 - 10 % imunoreaktivnih stanica	1	Blaga reakcija	1
> 10 - 50 % imunoreaktivnih stanica	2	Umjerena reakcija	2
> 50 - 80 % imunoreaktivnih stanica	3	Jaka reakcija	3
> 80 % imunoreaktivnih stanica	4		

4.8 Izolacija i kvantifikacija gDNA iz parafinskih blokova

gDNA izolirana je iz rezova 40 parafinskih blokova s tkivom iglene biopsije pacijenata s BHP-om te 29 parafinskih blokova s tkivom radikalne prostatektomije. Prije izolacije gDNA iz rezova radikalne prostatektomije, jedan rez je obojan HE kako bi patolog na staklu markerom označio tumorsko i okolno netumorsko tkivo. Temeljem HE predloška tumorsko tkivo i okolnog netumorsko tkivo je odvojeno te je gDNA izolirana odvojeno iz navedenih područja. Pojedini prerezi nisu imali dovoljno okolnog netumorskog tkiva da bi se moglo sa sigurnošću odvojiti od tumorskog te je konačan broj uzoraka okolnog netumorskog tkiva bio 23.

gDNA je izolirana prema kućnom protokolu koji se temelji na isoljavanju DNA te daje dobar prinos i kvalitetu DNA (64). Rezovi su provedeni kroz ksilol (2 x 10 min) i padajući niz koncentracije alkohola (2 x 100 % po 5 min, 2 x 96 % po 5 min, 1 x 70 % po 5 min) do destilirane vode (1 x 5 min) nakon čega su potopljeni u TBS puferu 72 h. Tkivo sa stakala je nožićem sastrugano u epruveticu s 500 µL TES pufera (50 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1 % SDS) i 50 µL proteinaze K (10 mg/mL) te su stavljeni u termoblok na 56 °C preko noći kako bi se tkivo razgradilo. Sljedećeg dana je u uzorke koji se nisu razgradili u cijelosti dodano još 50 µL proteinaze K te je nakon potpune razgradnje nastavljeno s izolacijom. U uzorke je dodano 200 µL natrijevog klorida (6 M) pa su uzorci promiješani i centrifugirani (13 000 rpm, 10 min). Supernatant je prebačen u novu epruveticu, dodano mu je 500 µL izopropanola te je sve dobro promiješano (2 min) te centrifugirano (13 000 rpm, 15 min). Supernatant je izliven, a na talog je dodano 500 µL 70 %-tnog etanola. Epruvetica je nekoliko puta prolupkana kako bi se isprao talog, a potom je uzorak centrifugiran (13 000 rpm, 15 min).

Supernatant je oprezno izliven, a epruvetica okrenuta naopako i tako položena na papir kako bi se talog DNA osušio (30 min). Na posušeni talog dodana je MiliQ voda i to 50 µL na DNA iz uzoraka iglenih biopsija te 100 µL na DNA iz uzoraka radikalnih prostatektomija. Kako bi se otopila DNA, uzorak je inkubiran 60 min u termoblok na 40 °C. Koncentracija i kvaliteta izolirane gDNA izmjerena je spektrofotometrijski na uređaju Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, SAD). Izolirana DNA je pohranjena na -80 °C do daljnje analize.

4.9 Izolacija i kvantifikacija cfDNA iz krvne i sjemenske plazme

Izolacija cfDNA iz uzoraka tekućinskih biopsija napravljena je uz pomoć dva kita bazirana na silika kolonicama proizvođača Macherey-Nagel. Princip izolacije je isti u oba kita, samo što je jedan kit namijenjen izolaciji iz plazme volumena iznad 1 mL, a drugi manjim volumenima. Za volumene plazme veće od 1 mL (svi uzorci krvne plazme i dio uzoraka sjemenske plazme) korišten je NucleoSnap cfDNA kit (Macherey-Nagel, Njemačka) te QIAvac 24 Plus vakuum stanica (Qiagen, Njemačka). Za volumene plazme manje od 1 mL korišten je NucleoSpin cfDNA kit (Macherey-Nagel, Njemačka) bez vakuum stanice.

Izolacija je napravljena prema uputama proizvođača uz dvije modifikacije kako bi se povećao prinos DNA: povećana je količina proteinaze K s 15 µL na 20 µL po mL plazme te je produljeno vrijeme digestije na 55 °C (preko noći). Sjemeni plazma je prije izolacije dodatno centrifugirana 10 min na 20 000 x g kako bi se uklonili ostatci stanica koji bi u suprotnome blokirali prolaz tekućine kroz kolonicu.

Uzorku plazme je dodana proteinaza K, a nakon 5 min i pufer VL te je sve dobro promiješano i stavljeno na digestiju preko noći na 55 °C. U uzorak je dodan 100 %-tni etanol te je nakon miješanja uzorak prebačen na kolonu na vakuum stanici. Vakuum je povukao tekućinu iz kolonice, a DNA je ostala vezana za kolonicu. Kolonica se isprala dva puta komercijalnim puferima VW1 i WB te je prebačena u kolekcijsku epruveticu i centrifugirana na velikoj brzini kako bi se osušila. DNA je elutirana s kolonice dvostrukim centrifugiranjem (2 000 x g, 1 min), a ukupni volumen eluata je bio 100 µL u slučaju da je početni volumen plazme bio veći od 1 mL te 50 µL ako je početni volumen bio manji od 1 mL. Izolirana cfDNA spremljen je na -80 °C do daljnje analize.

cfDNA je kvantificirana pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time or Quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) koristeći početnice za 82 pb dugu LINE-1 (engl. *Long Interspersed Element-1*) regiju preuzete iz literature (65). Ukupni volumen reakcijske smjese je bio 20 µL, a sastojala se od 10 µL 1 x reagensa za umnožavanje

SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Njemačka), 0,5 µL 250 nM uzvodne početnice (TCACTCAAAGCCGCTCAACTAC), 0,5 µL 250 nM nizvodne početnice (TCTGCCTTCATTTCGTTATGTACC), 8 µL vode bez nukleaza i 1 µL izolirane cfDNA. Svaki uzorak je rađen u triplicatu, a negativna kontrola je umjesto DNA sadržavala vodu bez nukleaza. Krivulja razrjeđenja napravljena je od komercijalne ljudske genomske DNA (Human Genomic DNA: Male, G1471, Promega, SAD) te je ona služila za apsolutnu kvantifikaciju cfDNA. Umnažanje qPCR-om je provedeno na uređaju CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Njemačka) (Tablica 10). Analiza je napravljena u CFX Maestro Software-u (Bio-Rad Laboratories, Njemačka).

Tablica 10. Uvjeti qPCR reakcije.

Koraci	T (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98 °C	3 min	1
Denaturacija	98 °C	10 sec	40
Prijanjanje početnica	60 °C	30 sec	

4.10 Bisulfitna konverzija izoliranih i kvantificiranih cfDNA i gDNA

Kako bi se metilirani citozini mogli razlikovati od nemetiliranih, izolirane cfDNA i gDNA su bisulfitno konvertirane. Bisulfitna konverzija bazira se na inkubaciji DNA u otopini visoke koncentracije natrijevog bisulfita, niskog pH na visokoj temperaturi pri čemu dolazi do pretvaranja nemetiliranih citozina u uracile, a metilirani citozini ostaju nepromijenjeni. Za bisulfitnu konverziju korišten je set EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen, Njemačka), a sve je rađeno prema uputama proizvođača.

Prvo su pripremljene radne otopine: u pufere BD i BL dodan je 100 %-tni alkohol, *carrier* RNA i bisulfitna smjesa su otopljene u vodi bez RNaza, otopljena *carrier* RNA je dodana u pufer BL. U PCR epruvetice smiješana je reakcijska smjesa koja se sastojala od: bisulfitne smjese, DNA zaštitnog pufera (engl. *DNA protect buffer*), vode bez RNaza i DNA. Količina DNA koja se može konvertirati ograničena je masom (ne više od 500 ng) i volumenom (ne više od 40 µL) te su se ta ograničenja poštovala pri pripremi reakcijske smjese. PCR tubica je promiješana, centrifugirana te stavljena u uređaj CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Njemačka) (Tablica 11).

Tablica 11. PCR uvjeti za bisulfitnu konverziju.

Korak	Vrijeme	Temperatura
Denaturacija	5 min	95 °C
Inkubacija	25 min	60 °C
Denaturacija	5 min	95 °C
Inkubacija	85 min	60 °C
Denaturacija	5 min	95 °C
Inkubacija	175 min	60 °C
Inkubacija	∞	20 °C

Nakon završene PCR reakcije, PCR epruvetica je centrifugirana, a sadržaj prebačen u epruveticu te je dodan pufer BL. Epruvetica je promiješana i centrifugirana, dodan je 100 %-tni etanol, a nakon miješanja i centrifugiranja sadržaj epruvetice je prebačen na MinElute DNA spin kolonu u kolekcijskoj epruvetici. Nakon centrifugiranja (1 min na 20 000 x g), filtrat je bačen, na kolonu je dodan pufer za ispiranje BW te je kolona centrifugirana (1 min na 20 000 x g). Filtrat je bačen, na kolonu je dodan desulfonacijski pufer BD te su uzorci inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi. Kolona je dva puta isprana s puferom BW, a svaki put je bacan filtrat. Na kolonu je dodan 100 %-tni etanol, a nakon centrifugiranja (1 min na 20 000 x g), kolona je prebačena u novu kolekcijsku epruveticu te centrifugirana (1 min na 20 000 x g). Kolona je prebačena u novu epruveticu, dodan je pufer za eluciju EB te je kolonica centrifugirana (1 min na 15 000 x g). Volumen elucije prilagođen je početnoj količini DNA, a iznosio je između 10 i 100 µL. Bisulfitno konvertirana DNA pohranjena je na - 80 °C do daljnje analize.

4.11 Lančana reakcija polimerazom nakon bisulfitne konverzije

Određene regije bisulfitno konvertirane DNA umnožene su PCR-om. U slučaju gena *RASSF1A* umnažana regija obuhvaćala je 9 CpG mjesta (hg38; chr3:50,340,800-50,340,862). Početnice za gen *RASSF1A* preuzete su iz literature (66).

U slučaju gena *CAV1* umnažana regija bila je dužine 140 pb, obuhvaćala 9 CpG mjesta, a nalazi se u promotoru gena (hg38; chr7:116,524,607-116,524,746). Početnice za gen *CAV1* dizajnirane su u programu PyroMark® Assay Design Software 2.0 (Qiagen, Njemačka) (Tablica 12).

Tablica 12. Sekvence početnica i analiziranih sekvenci.

<i>RASSF1A</i>	Uzvodna početnica	AGTTTGGATTTTGGGGGAGG
	Nizvodna početnica	Biotin-CAACTCAATAAACTCAAACCTCCCC
	Početnica za sekvenciranje	GGGTTAGTTTTGTGGTTT
	Sekvenca analizirana pirosekvenciranjem	YGTITYGGTTYGYGTTTGTTAGYGTTTAAA GTTAGYGAAGTAYGGGTTTAATYGGGTTATGT YG
<i>CAV1</i>	Uzvodna početnica	GTTTAGGATAGGGTAGGATTGTG
	Nizvodna početnica	Biotin - ACCTAAAACAACATTTTCCCTACT
	Početnica za sekvenciranje	GGGTAGGATTGTGGAT
	Sekvenca analizirana pirosekvenciranjem	TGTTTTTGTY GTTTTGGTTG TTTATATTGG GTATTTTTGT AGGYGYGTYG GTTTTTTTTA TTTTTGTTGA GATGATGTAT TGYGAAAATA TTYGTTTTTT TYGGGAYGTT TTTYGGTGGT TTAGAGTAGG GAAAATGTTG

Za PCR korišten je komercijalni set PyroMark® PCR Kit (Qiagen, Njemačka) te je prema uputama proizvođača smiješana reakcijska smjesa: 12,5 µL Master Mix-a, 2,5 µL CoralLoad-a, 0,5 µL 10 µM uzvodne početnice, 0,5 µL 10 µM nizvodne početnice te vode bez nukleaza i uzorka bisulfitno konvertirane DNA do ukupnog volumena 9 µL. S obzirom da je prethodnom optimizacijom utvrđena najbolja količina DNA te najpogodniji uvjeti PCR reakcije, za umnažanje gena *RASSF1A* korišteno je 5 ng DNA, a za umnažanje gena *CAV1* 2,5 ng DNA te je prema tome prilagođen i volume vode. PCR epruvetice s reakcijskom smjesom stavljene su uređaj C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Njemačka) te je umnažanje provedeno na uvjetima navedenim u Tablici 13. Kao kontrolni uzorci korištene su komercijalno dostupne bisulfitno konvertirane ljudske DNA (100 % metilirana i 0 % metilirana) (EpiTect PCR Control DNA Set, Qiagen, Njemačka). Reakcijska smjesa u kojoj je volumen DNA zamijenjen vodom služio je za provjeru kontaminacije kemikalija.

Tablica 13. Uvjeti PCR-a korišteni za umnažanje regija gena *RASSF1A* i *CAV1*.

Koraci	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95 °C	15 min	1
Denaturacija	94 °C	30 s	45
Sparivanje početnica	RASSF1A: 65 °C	30 s	
	CAV1: 52.5 °C		
Produljivanje	72 °C	30 s	
Konačno produljivanje	72 °C	10 min	1

4.12 Pirosekvenciranje

Produkti PCR reakcija su sekvencirani pirosekvencerom Pyromark Q24 Advanced (Qiagen, Njemačka), a za to je korišten set kemikalija PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen, Njemačka). U programu PyroMark Q24 Advanced Software (Qiagen) za svaki analizirani gen je napravljen esej prema kome pirosekvencer dodaje nukleotide u reakcijsku smjesu potrebne za sekvenciranje sintezom. U PCR pločicama produkti PCR reakcija (20 µL) pomiješani su s streptavidinom obloženim sefarnim kuglicama (Streptavidin Sepharose® High Performance, GE Healthcare, Švedska) (1 µL), puferom za vezanje (40 µL) i MiliQ vodom (19 µL), a potom je PCR pločica zalijepljena folijom i stavljena na tresilicu (1400 rpm, minimalno 10 min) kako bi se DNA vezala za kuglice. Za to vrijeme PyroMark Q24 pločica je napunjena početnicama za sekvenciranje (0,75 µL) (Tablica 12) razrijeđenim s puferom za prijanjanje (19,25 µL) te je napunjen spremnik za pirosekvenciranje (PyroMark® Q24 Cartridge, Qiagen, Njemačka) kemikalijama potrebnim za pirosekvenciranje: enzim (DNA polimeraza, ATP sulfurilaza, apiraza i luciferaza), substrat (luciferin i adenzin 5' fosfosulfat) i nukleotidi (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Kadice na radnoj postaji PyroMark® Q24 Vacuum Workstation napunjene su odgovarajućim otopinama, redom: 70 %-tnim etanolom, denaturacijskim puferom i puferom za ispiranje. Nakon pripreme, PCR pločica s tresilice premještena je na radnu postaju, a u nju su spuštene iglice vakuum sisaljke koje su propustile tekućinu, a zadržale kuglice s vezanom DNA. Iglice s vezanom DNA su uranjane u otopine na radnoj ploči kako bi se biotinizirani lanac DNA odvojio od denaturiranog i prenio do PyroMark Q24 pločice sa početnicama za sekvenciranje. PyroMark Q24 pločice se 3 min grijala na 80 °C, a zatim je prenesena u pirosekvencer te je pokrenut esej.

4.13 Analiza rezultata pirosekvenciranja

Dobiveni rezultati pirosekvenciranja analizirani su u programu PyroMark Q24 Advanced Software 3.0.1. Rezultat pirosekvenciranja je prikazan kao pirogram, a on sadrži informacije o postotku metilacije pojedinog CpG mjesta u uzorku te intenzitet svjetlosnog signala koji je proporcionalan broju ugrađenih nukleotida. Rezultat pirosekvenciranja pojedinog uzorka je smatran zadovoljavajućim ako je intenzitet svjetlosnog signala bio veći od 150 RLU (engl. *relative light units*), ako je uzorak prošao kontrolu bisulfitne konverzije, ako nema pikova u uzorku negativne kontrole te ako su rezultati metilacije komercijalne DNA slični pravim vrijednostima (100 % metilirana i 0 % metilirana DNA). Iz vrijednosti metilacije svih 9 CpG mjesta izračunata je prosječna metilacija analizirane regije pojedinog gena.

4.14 Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka rađena je u računalnom programu GraphPad Prism v5.00 (GraphPad software, San Diego, USA) (broj licence GPW6-278912-RLMU-966F4). Zbog malog broja uzoraka, korišteni su neparametrijski statistički testovi. Za usporedbu kvantitativnih vrijednosti između dvije nezavisne skupine korišten je Mann-Whitney U test, a između više od dvije skupine Kruskal-Wallisov test. Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova (engl. *Wilcoxon matched-pair signed rank test*) korišten je za uspoređivanje kvantitativnih vrijednosti koje su u paru. Povezanost ispitivanih varijabli procijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (ρ). Varijable su prikazane medijanom s interkvartilnim rasponom. Rezultati statističke obrade su grafički prikazani koristeći medijan s interkvartilnim rasponom, a sve p-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Dijagnostička točnost metilacije CpG mjesta značajne različitosti među skupinama ispitana je analizom krivulje odnosa specifičnosti i osjetljivosti (ROC, engl. *receiver operating characteristics*) krivulje u program GraphPad Prism v5.00, a za dijagnostičku točnost kombinacije metilacije s kliničkim podacima korišten je program MedCalc® Statistical Software version 20.110 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija).

5. REZULTATI

5.1. Klinički i patohistološki podaci ispitanika

U ovu studiju je ukupno bilo uključeno 80 ispitanika od čega 40 s rakom prostate i 40 s BHP-om. Njihove kliničke i patohistološke značajke prikazane su u Tablici 14. Dvije skupine ispitanika vrlo su sličnog medijana i raspona dobi te se po dobi statistički ne razlikuju ($p = 0,820$, Mann-Whitney U test). Medijan serumskog predbiopsijskog tPSA je nešto veći u BHP skupini (7,360 ng/mL) od skupine s rakom prostate (6,660 ng/mL) što nije statistički značajna razlika ($p = 0,795$, Mann-Whitney U test). Ispitanici s rakom prostate nisu jednoliko raspoređeni po skupinama gradusa. Više od polovine ispitanika s rakom prostate (26/40) imala je rak prostate skupine gradusa 2, dok je manji broj ispitanika imao rak prostate skupine gradusa 1 (7/40) i 3 (6/40). Samo jedan ispitanik imao je rak prostate skupine gradusa 5 (Gleasonov zbroj 4 + 5). Svi ispitanici iz skupine raka prostate imali su lokaliziranu ili lokalno uznapredovalu bolest osim jednog koji je imao metastatsku bolest.

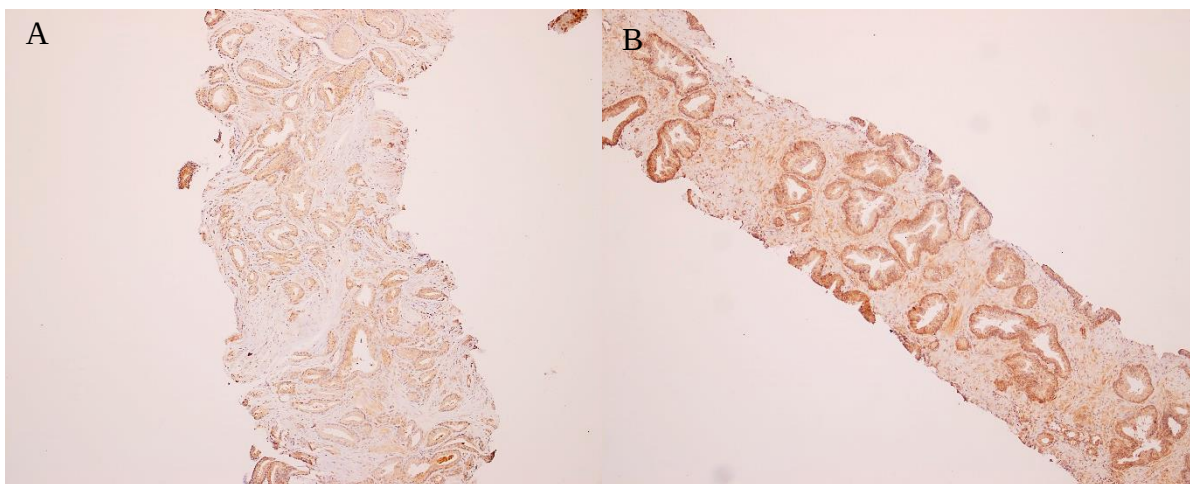
Tablica 14. Kliničke i patohistološke značajke ispitanika.

		Rak prostate (N = 40)	BHP (N = 40)	p- vrijednost
Dob (godine)	Medijan (raspon)	61 (44 - 73)	60 (46 - 72)	0,820
	≤ 49	4	3	
	50 - 59	15	15	
	60 - 64	11	14	
	65 - 69	8	4	
	≥ 70	2	4	
tPSA prije biopsije (ng/mL)	Medijan (raspon)	6,660 (1,81 - 63,16)	7,360 (2,4 - 21,57)	0,795
Skupina gradusa	1 (Gleasonov zbroj 3+3)	7		
	2 (Gleasonov zbroj 3+4)	26		
	3 (Gleasonov zbroj 4+3)	6		
	5 (Gleasonov zbroj 4+5)	1		

5.2 Ekspresija i metilacija gena *RASSF1*

5.2.1 Ekspresija gena *RASSF1* na proteinskoj razini

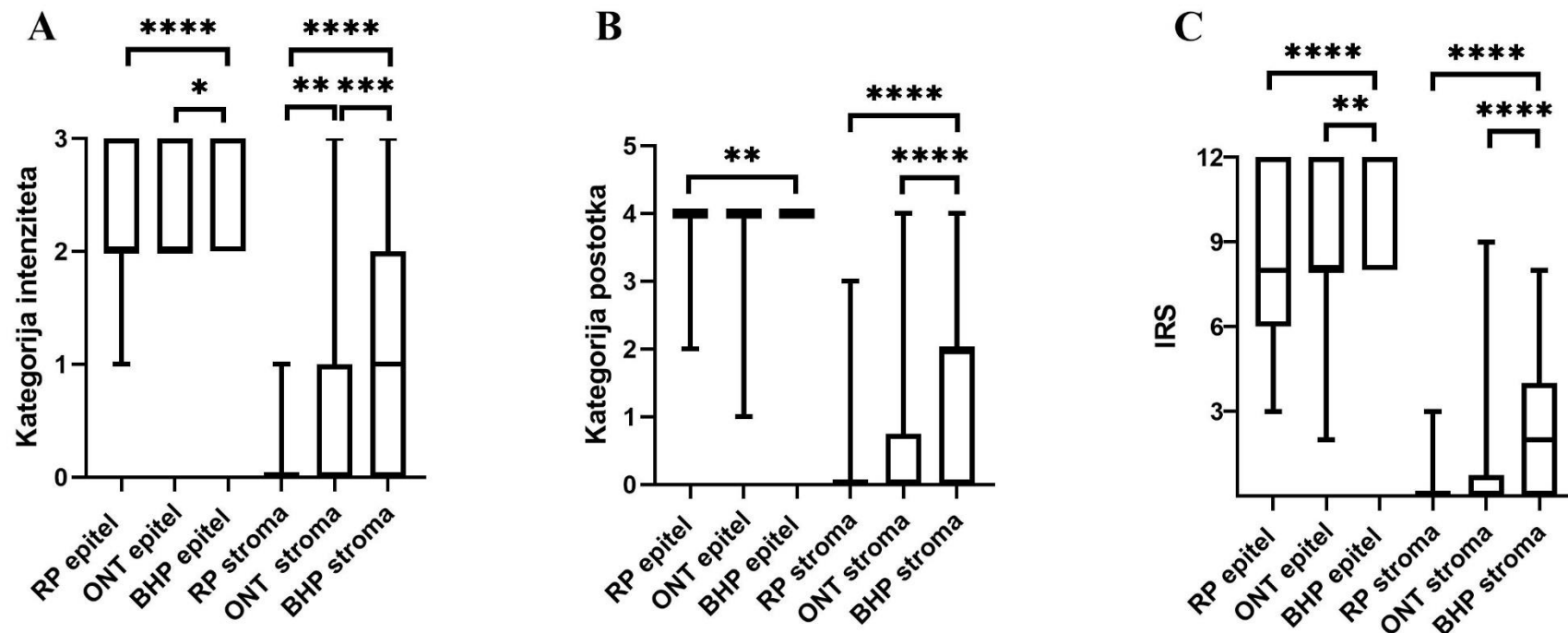
Primjer ekspresije gena *RASSF1* u na proteinskoj razini u tkivu dobivenim iglenom biopsijom iz pacijenata s rakom prostate i BHP-om prikazan je na slici 9, a rezultati analize ekspresije gena *RASSF1* prikazani su na slici 10.



Slika 9. Imunohistokemijsko bojanje na RASSF1 cilindra raka prostate (A) i BHP-a (B). 100 x.

Ekspresija *RASSF1* je općenito veća u epitelu nego u stromi (Slika 10). U epitelu, intenzitet reakcije, postotak i IRS statistički su značajno veći u BHP tkivu nego u tkivu raka prostate ($p < 0,0001$, $p = 0,0043$, $p < 0,0001$, Mann-Whitney U test). Intenzitet reakcije i IRS u epitelu statistički su značajno veći u BHP tkivu nego u okolnom netumorskom tkivu ($p = 0,013$, $p = 0,010$, Mann-Whitney U test). Intenzitet reakcije, postotak i IRS u epitelu raka prostate se ne razlikuje značajno od okolnog netumorskog tkiva unutar istog pacijenta.

U stromi, intenzitet reakcije, postotak i IRS statistički su značajno veći u BHP tkivu nego u tkiva raka prostate ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, Mann-Whitney U test) i okolnome netumorskome tkivu ($p = 0,0002$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova). U istog pacijenta, intenzitet reakcije je značajno jači u okolnom netumorskom tkivu nego u tkivu raka prostate ($p = 0,008$, Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova) dok razlike u postotku i IRS-u nisu statistički značajne.



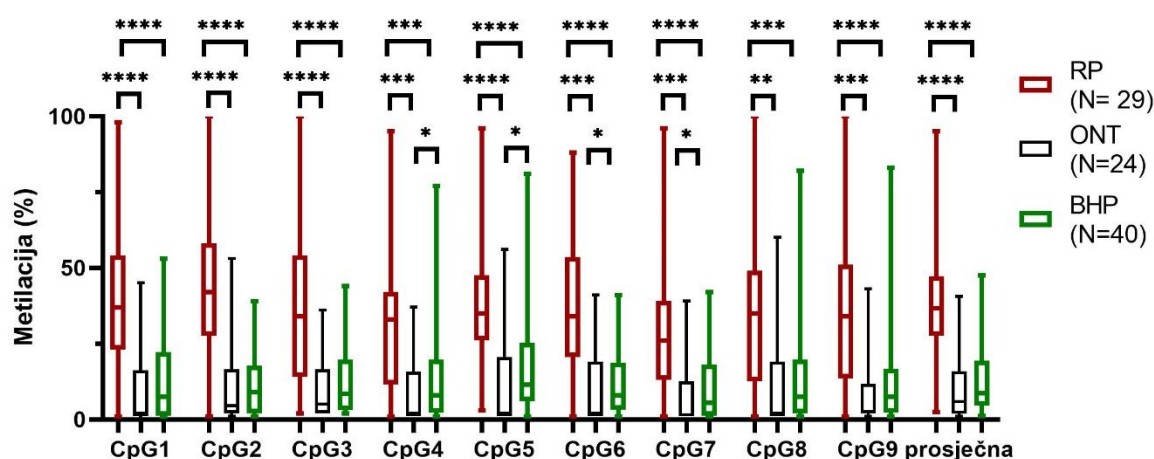
Slika 10. Intenzitet reakcije (A), postotak imunoreaktivnih stanica (B) i IRS (C) u epitelu i stromi tkiva raka prostate, okolnog netumorskog tkiva i BHP-a za imunohistokemijsko bojanje na RASSF1. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* p-vrijednost < 0,05, ** p-vrijednost ≤ 0,01, *** p-vrijednost ≤ 0,001, **** p-vrijednost ≤ 0,0001). Mann-Whitney U test, Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova. RP - rak prostate, ONT - okolno netumorsko tkivo, BHP - benigna hiperplazija prostate.

5.2.2 Metilacija gena *RASSF1A* u tkivu

Rezultati analize metilacije dijela prvog CpG otoka gena *RASSF1A* u tkivu zahvaćenom BHP-om, tumorskom i okolnom netumorskom tkivu prikazani su na Slici 11.

Statistički značajne razlike u metilaciji pronađene su u na svim analiziranim CpG mjestima te u prosječnoj metilaciji (Slika 11).

Analizirana regija gena *RASSF1A* je statistički značajno više metilirana u tkivu raka prostate od pripadajućeg okolnog netumorskog tkiva i od tkiva BHP-a i to na svakom CpG mjestu i prosječnoj metilaciji. Medijan prosječne metilacije tkiva raka prostate iznosi 36,67 %, a tkiva BHP-a 8,67 %. Puno manja, ali i dalje statistički značajna, je razlika u metilaciji između BHP-a i okolnog netumorskog tkiva, ali samo na četiri CpG mjesta (CpG4, CpG5, CpG6, CpG7) gdje je metilacija veća u tkivu BHP-a.



Slika 11. Postotak metilacije gDNA gena *RASSF1A* u tkivu po CpG mjestima te prosječna metilacija u pacijenata s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* p-vrijednost < 0,05, ** p-vrijednost ≤ 0,01, *** p-vrijednost ≤ 0,001, **** p-vrijednost ≤ 0,0001). Mann-Whitney U test, Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova. RP - rak prostate, ONT - okolno netumorsko tkivo, BHP - benigna hiperplazija prostate.

5.2.3 Povezanost metilacije s ekspresijom gena *RASSF1* u tkivu

Spearmanova korelacijska analiza povezanosti ekspresije gena *RASSF1* i njegove metilacije u tkivu pokazala je da ekspresija gena nije povezana ni s prosječnom metilacijom niti s metilacijom pojedinog CpG mjesta (Tablica 15).

Tablica 15. Spearmanova korelacijska analiza ekspresije i metilacije gena *RASSF1* u tkivu.

Prikazani su Spearmanovi korelacijski koeficijenti i njihove p-vrijednosti.

		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	prosječna
IRS epitel	r	-0,14	-0,12	-0,12	-0,18	-0,19	-0,21	-0,20	-0,19	-0,21	-0,20
	p	0,624	0,437	0,978	0,894	0,950	0,451	0,864	0,630	0,299	0,525
IRS stroma	r	-0,17	-0,14	-0,13	-0,05	-0,06	-0,15	-0,18	-0,04	-0,05	-0,12
	p	0,117	0,179	0,213	0,607	0,567	0,149	0,097	0,717	0,623	0,280

5.2.4 Metilacija i ekspresija gena *RASSF1* u tkivu i kliničke značajke

Spearmanova korelacijska analiza pokazala je da nema povezanosti između metilacije ili ekspresije gena *RASSF1* u tkivu s kliničkim značajkama ispitanika (Tablica 16). Metilacije pojedinačnih CpG mjesta međusobno pozitivno koreliraju. Skupina gradusa pozitivno korelira s T-om ($r = 0,53$, $p = 0,01$, Spearmanov koeficijent korelacije).

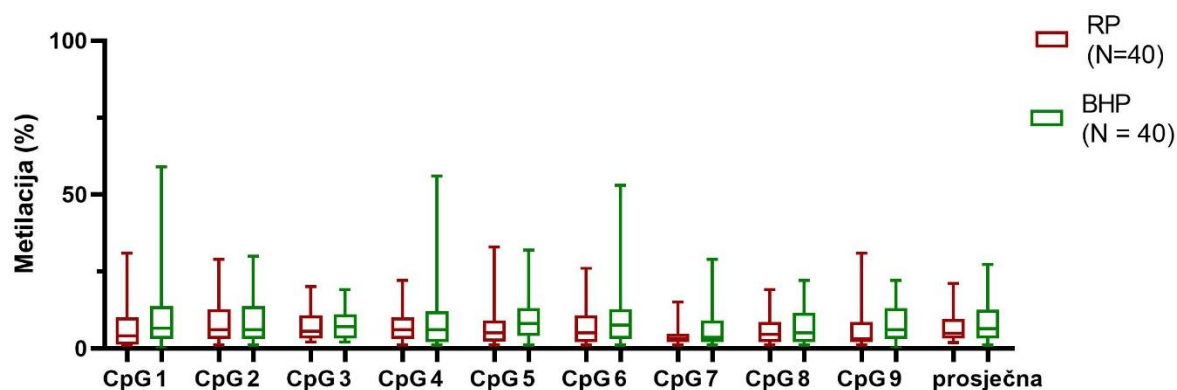
Tablica 16. Rezultati Spearmanove korelacijske analize metilacije i ekspresije gena *RASSF1* u tkivu s kliničkim značajkama. Polja sa Spearmanovim korelacijskim koeficijentom su bijela, a polja s p-vrijednostima siva. Crveno su označene p-vrijednosti < 0,05, a crveno pripadajuće r-vrijednosti parametara koji pokazuju korelaciju. GS - skupina gradusa, T - anatomska proširenost primarnog tumora.

p/r	IRS stroma	IRS epitel	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9	prosječna	tPSA	dob	GS	T
IRS stroma	1,00	0,42	-0,30	-0,35	-0,26	-0,17	-0,21	-0,33	-0,29	-0,16	-0,19	-0,30	0,04	0,02	0,00	-
IRS epitel	<0,001	1,00	-0,24	-0,31	-0,21	-0,29	-0,32	-0,32	-0,32	-0,27	-0,33	-0,33	0,16	0,03	0,26	-
CpG1	0,013	0,057	1,00	0,76	0,68	0,63	0,76	0,88	0,79	0,73	0,69	0,89	-0,13	-0,13	0,06	-0,17
CpG2	0,004	0,010	<0,001	1,00	0,65	0,73	0,54	0,84	0,68	0,64	0,60	0,78	-0,07	-0,05	0,11	-0,04
CpG3	0,032	0,083	<0,001	<0,001	1,00	0,66	0,66	0,75	0,80	0,71	0,69	0,76	-0,03	0,01	-0,11	-0,14
CpG4	0,180	0,020	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,74	0,73	0,67	0,78	0,66	0,79	-0,02	0,10	-0,15	-0,25
CpG5	0,084	0,009	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,69	0,73	0,81	0,71	0,87	-0,10	-0,05	-0,27	-0,15
CpG6	0,006	0,009	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,79	0,69	0,74	0,89	-0,19	-0,06	-0,06	-0,18
CpG7	0,018	0,008	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,77	0,75	0,81	-0,14	0,04	-0,26	-0,33
CpG8	0,212	0,026	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,75	0,84	-0,13	0,02	-0,06	0,03
CpG9	0,118	0,007	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,87	-0,12	0,04	-0,21	-0,16
prosječna	0,016	0,008	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	-0,12	0,01	-0,12	-0,6
tPSA	0,704	0,177	0,290	0,555	0,808	0,855	0,424	0,114	0,265	0,291	0,338	0,309	1,00	0,13	0,36	0,17
dob	0,834	0,807	0,290	0,671	0,967	0,421	0,710	0,641	0,735	0,887	0,737	0,942	0,251	1,00	0,13	-0,07
GS	1,000	0,116	0,749	0,556	0,556	0,438	0,154	0,767	0,179	0,773	0,283	0,545	0,026	0,439	1,00	0,53
T	0,510	0,435	0,385	0,819	0,474	0,197	0,433	0,340	0,081	0,884	0,419	0,289	0,325	0,675	0,01	1,00

5.2.5 Metilacija gena *RASSF1A* u krvnoj plazmi

Medijan prosječne metilacije cfDNA u krvnoj plazmi ispitanika s rakom prostate iznosio je 4,84 % te 6,34 % u ispitanika s BHP-om.

Statističkom analizom razine metilacije cfDNA gena *RASSF1A* u krvnoj plazmi utvrđeno je da ne postoji značajna razlika između ispitanika s rakom prostate i ispitanika s BHP-om u prosječnoj metilaciji regije gena *RASSF1A* niti u postotku metilacije na pojedinačnim CpG mjestima (Slika 12).

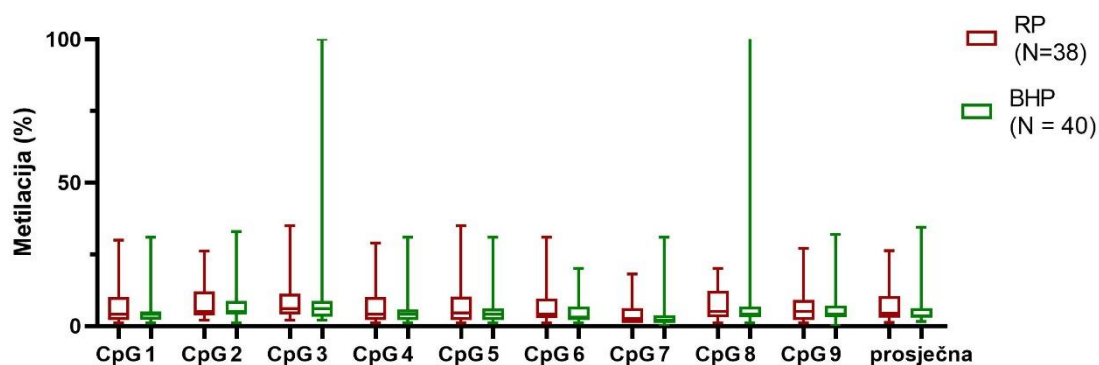


Slika 12. Postotak metilacije cfDNA gena *RASSF1A* u krvnoj plazmi po CpG mjestima te prosječna metilacija u pacijenata s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Mann-Whitney U test. RP - rak prostate, BHP - benigna hiperplazija prostate.

5.2.6 Metilacija gena *RASSF1A* u sjemennoj plazmi

Medijan prosječne metilacije cfDNA u sjemennoj plazmi ispitanika s rakom prostate iznosio je 4,44 % te 3,62 % u ispitanika s BHP-om.

Statističkom analizom razine metilacije cfDNA gena *RASSF1A* u sjemennoj plazmi utvrđeno je da ne postoji značajna razlika između ispitanika s rakom prostate i ispitanika s BHP-om u prosječnoj metilaciji regije gena *RASSF1A* niti u postotku metilacije na pojedinačnim CpG mjestima (Slika 13).



Slika 13. Postotak metilacije cfDNA gena *RASSF1A* u sjemenjnoj plazmi po CpG mjestima te prosječna metilacija u pacijenata s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Mann-Whitney U test. RP - rak prostate, BHP - benigna hiperplazija prostate.

5.2.7 Metilacija gena *RASSF1A* u tekućinskim biopsijama i kliničke značajke

Spearmanova korelacijska analiza povezanosti metilacije gena *RASSF1A* u uzorcima tekućinskih biopsija i kliničkih značajki (dob, tPSA, skupina gradusa, T) nije pokazala nikakvu povezanost (Tablica 17). Također, nema povezanosti između metilacije gena *RASSF1A* u cfDNA krvne plazme i T-a. Ipak, dokazana je pozitivna povezanost T-a s metilacijom sedam CpG mjesta te prosječnom metilacijom u sjemenjnoj plazmi od čega najveća između metilacije CpG2 i T-a ($r = 0,48$, $p = 0,018$, Spearmanov koeficijent korelacije).

Tablica 17. Rezultati Spearmanove korelacijske analize metilacije gena *RASSF1A* u uzorcima tekućinskih biopsija i kliničkih značajki. Žutom bojom označen je statistički značajan rezultat.

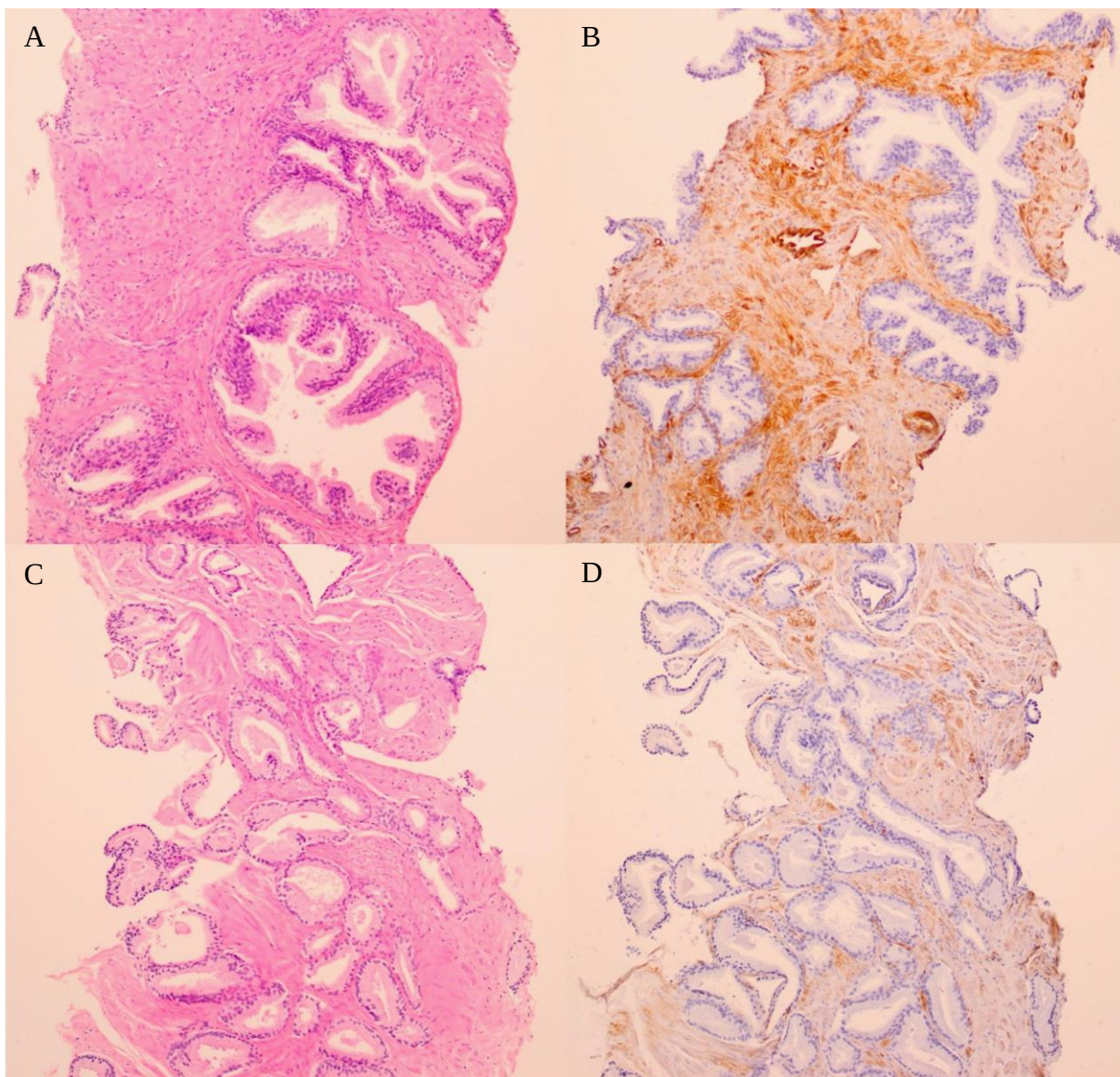
T - anatomska proširenost primarnog tumora.

		Dob		tPSA		Skupina gradusa		T	
Metilacija		r	p	r	p	r	p	r	p
Krvna plazma	CpG1	-0,13	0,251	-0,04	0,757	0,07	0,678	0,11	0,526
	CpG2	0,03	0,785	-0,08	0,494	-0,12	0,447	-0,04	0,808
	CpG3	-0,03	0,795	-0,04	0,718	-0,09	0,581	-0,09	0,591
	CpG4	0,05	0,639	-0,01	0,959	0,16	0,336	-0,09	0,629
	CpG5	0,03	0,818	0,05	0,651	0,00	0,989	-0,13	0,466
	CpG6	0,02	0,888	-0,02	0,858	0,03	0,875	0,13	0,458
	CpG7	0,10	0,396	0,04	0,699	0,11	0,494	-0,17	0,334
	CpG8	0,12	0,309	-0,02	0,855	0,14	0,395	0,16	0,350
	CpG9	0,08	0,515	0,17	0,145	0,13	0,459	-0,06	0,757
	prosječna	0,02	0,893	-0,03	0,782	0,00	0,984	0,02	0,926
Sjemena plazma	CpG1	0,10	0,370	0,02	0,839	0,00	0,997	0,40	0,879
	CpG2	-0,04	0,745	0,14	0,234	0,20	0,224	0,48	0,018
	CpG3	-0,01	0,963	0,08	0,493	0,17	0,317	0,35	0,004
	CpG4	0,05	0,673	0,06	0,627	0,09	0,588	0,35	0,042
	CpG5	0,11	0,353	0,13	0,265	0,05	0,762	0,41	0,041
	CpG6	0,14	0,226	0,04	0,728	0,10	0,532	0,42	0,017
	CpG7	-0,11	0,338	0,00	0,991	0,10	0,533	0,42	0,014
	CpG8	0,03	0,800	0,03	0,810	0,14	0,411	0,28	0,014
	CpG9	0,03	0,791	0,01	0,938	0,32	0,082	0,30	0,109
	prosječna	0,04	0,738	0,01	0,933	0,07	0,674	0,39	0,024

5.3 Ekspresija i metilacija gena *CAV1*

5.3.1 Ekspresija gena *CAV1* na proteinskoj razini

Primjer ekspresije gena *CAV1* u na proteinskoj razini u tkivu dobivenim iglenom biopsijom iz pacijenata s rakom prostate i BHP-om prikazan je na slici 14, a rezultati analize ekspresije gena *RASSF1* prikazani su na slici 15.



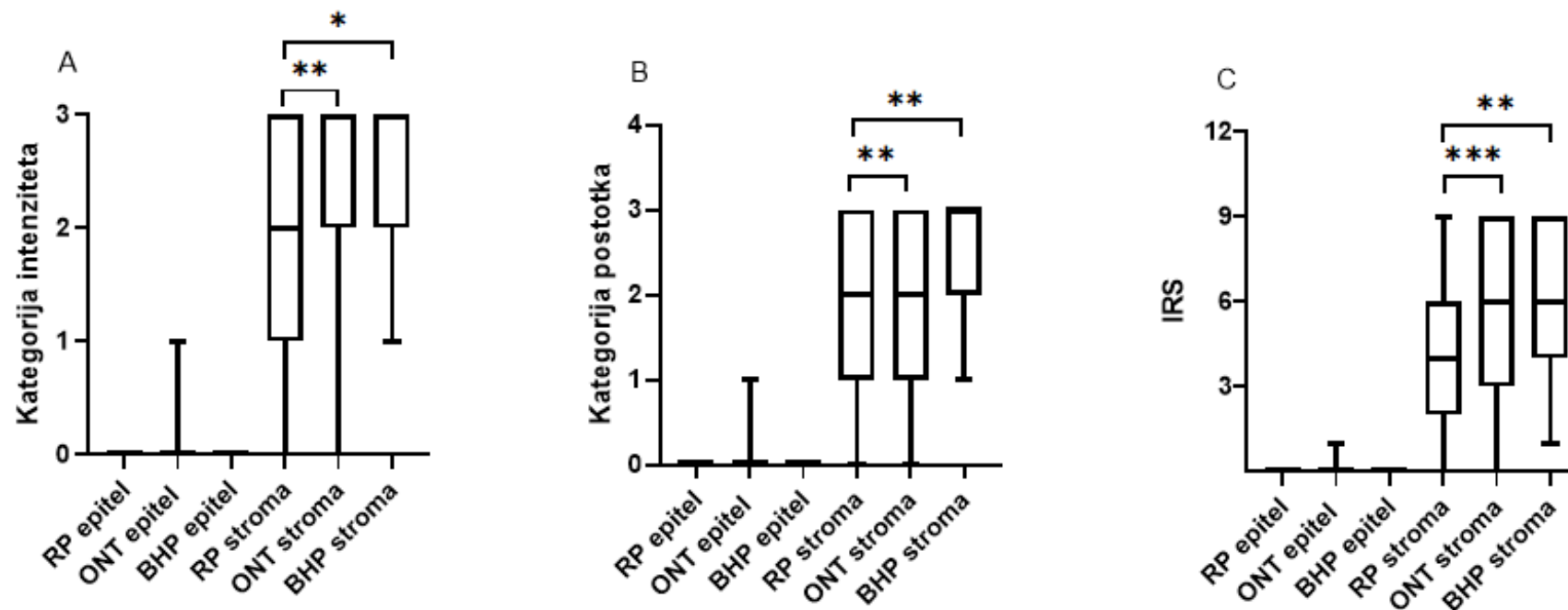
Slika 14. HE bojanje (A, C) i imunohistokemijsko bojanje na CAV1 (B, D) cilindra BHP-a (A, B) i raka prostate (C, D). 100 x.

Osim u jednom uzorku okolnog netumorskog tkiva, *CAV1* nije eksprimiran u epitelu prostate, neovisno o području tkiva (Slika 15).

Intenzitet reakcije, postotak i IRS statistički su značajno veći u stromi BHP tkiva nego u stromi tkiva raka prostate ($p = 0,046$, $p = 0,008$, $p = 0,002$, Mann-Whitney U test).

U istog pacijenta intenzitet reakcije, postotak i IRS u stromi okolnog netumorskog tkiva i tkiva raka prostate se značajno razlikuju ($p = 0,002$, $p = 0,010$, $p = 0,001$, Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova). Nadalje, *CAV1* je više eksprimiran u stromi okolnog netumorskog tkiva temeljem snažnijeg intenziteta reakcije.

Intenzitet reakcije, postotak i IRS u stromi okolnog netumorskog tkiva nisu se značajno razlikovali od tkiva BHP-a.



Slika 15. Intenzitet reakcije, postotak imunoreaktivnih stanica i IRS u epitelu i stromi tkiva raka prostate, okolnog netumorskog tkiva i BHP-a za imunohistokemijsko bojanje na CAV1. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* p-vrijednost < 0,05, ** p-vrijednost ≤ 0,01, *** p-vrijednost ≤ 0,001). Mann-Whitney U test. Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova. RP - rak prostate, ONT - okolno netumorsko tkivo, BHP - benigna hiperplazija prostate.

5.3.2 Metilacija gena *CAV1* u tkivu

Rezultati analize metilacije gDNA gena *CAV1* u tkivu zahvaćenom BHP-om, tumorskom i okolnom netumorskom tkivu prikazani su na slici 16.

Statistički značajne razlike u metilaciji pronađene su u na CpG mjestima 1, 2 i 3 te u prosječnoj metilaciji.

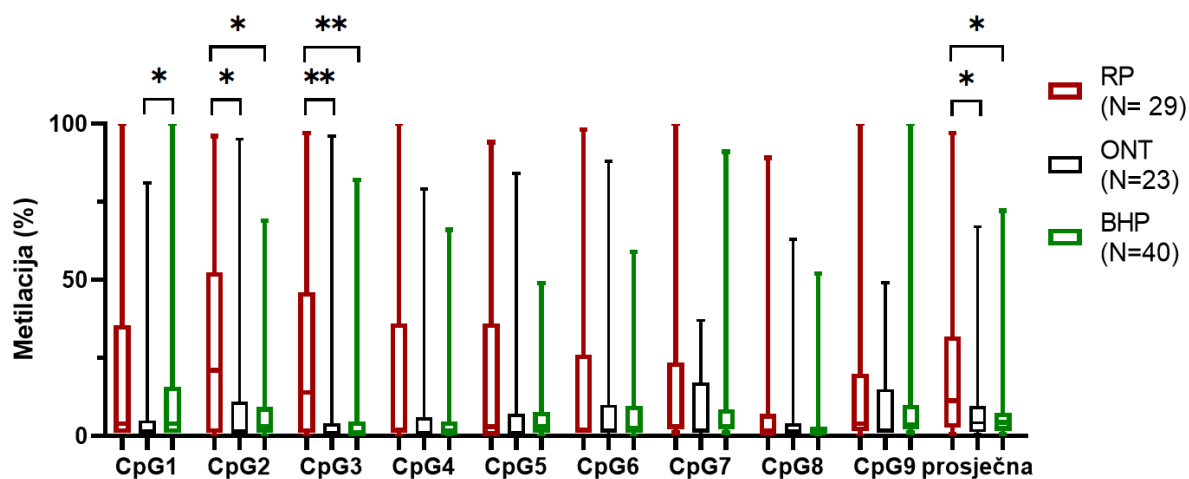
Medijan metilacije gena *CAV1* na mjestu CpG1 iznosi 4 % u tkivu BHP-a i raka prostate dok je medijan metilacije tog CpG-a u okolnom netumorskom tkivu bio 1 %. Metilacija CpG1 statistički je značajno veća u tkivu BHP-a od okolnog netumorskog tkiva ($p = 0,030$, Mann-Whitney U test). Ipak metilacija CpG1 gena *CAV1* u tkivu raka prostate ne razlikuje se značajno od metilacije u okolnom tkivu u istog pacijenta, a također metilacija CpG1 gena *CAV1* tkiva raka prostate ne razlikuje se značajno ni od njegove metilacije u BHP tkivu.

Medijan metilacije gena *CAV1* na mjestu CpG2 najveći je u tkivu raka prostate (21 %), a u BHP tkivu iznosi 3 % te u okolnom netumorskom 1 %. S tim u vezi, statistički je značajno veća metilacija CpG2 gena *CAV1* u tkivu raka prostate od metilacije u okolnome tkivu ($p = 0,015$, Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova) i tkivu BHP-a ($p = 0,011$, Mann-Whitney U test) dok se metilacija CpG2 gena *CAV1* u tkivu BHP-a i okolnom netumorskom tkivu ne razlikuje značajno.

Medijan metilacije gena *CAV1* na mjestu CpG3 najveći je u tkivu raka prostate (14 %) dok je u ostalim tkivima bio 1 %. Statistički je značajno veća metilacija CpG3 gena *CAV1* u tkivu raka prostate od metilacije u okolnome tkivu ($p = 0,002$, Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova) i tkivu BHP-a ($p = 0,010$ Mann-Whitney U test) dok se metilacija CpG3 gena *CAV1* tkiva BHP-a ne razlikuje od okolnog netumorskog tkiva.

Medijan prosječne metilacije gena *CAV1* bio je najveći u tkivu raka prostate (11,33 %), a medijan prosječne metilacije gena *CAV1* okolnog netumorskog tkiva (4,22 %) i tkiva BHP-a (4,34 %) bio je sličan. S tim u vezi, prosječna metilacija gena *CAV1* tkiva raka prostate se statistički značajno razlikovala od metilacije u okolnom netumorskom tkivu ($p = 0,040$, Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova) i tkivu BHP-a ($p = 0,027$, Mann-Whitney U test).

Metilacija gena *CAV1* na ostalim CpG mjestima (CpG4, CpG5, CpG6, CpG7, CpG8, CpG9) nije bila statistički značajno različita između tkiva raka prostate, tkiva BHP-a i okolnog netumorskog tkiva.



Slika 16. Postotak metilacije gDNA gena *CAV1* u tkivu po CpG mjestima te prosječna metilacija u pacijenata s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* p-vrijednost < 0,05, ** p-vrijednost ≤ 0,01). Mann-Whitney U test, Wilcoxonov test na osnovi ekvivalentnih parova. RP - rak prostate, ONT - okolno netumorsko tkivo, BHP - benigna hiperplazija prostate.

5.3.3 Povezanost metilacije s ekspresijom gena *CAV1*

Spearmanova korelacijska analiza povezanosti ekspresije gena *CAV1* u stromi i njegove metilacije u tkivu pokazala je da ekspresija odabrane regije nije povezana ni s prosječnom metilacijom odabrane regije ni s pojedinim CpG mjestom (Tablica 18). S obzirom da *CAV1* nije eksprimiran u epitelu, nije imalo smisla ispitivati povezanost njegove metilacije i ekspresije u epitelu.

Tablica 18. Spearmanova korelacijska analiza ekspresije i metilacije gena *CAV1*. Prikazani su Spearmanovi korelacijski koeficijenti i njihove p-vrijednosti.

IRS stroma		CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9	prosječna
	r	0,05	0,08	0,00	0,01	-0,01	-0,08	-0,02	0,05	0,11	0,07
	p	0,624	0,437	0,978	0,894	0,950	0,451	0,864	0,630	0,299	0,525

5.3.4 Metilacija i ekspresija gena *CAV1* u tkivu i kliničke značajke

Rezultati Spearmanove korelacijske analize povezanosti metilacije i ekspresije gena *CAV1* u tkivu s kliničkim značajkama ispitanika prikazani su u tablici 19. Metilacija CpG8 u gDNA

gena *CAV1* pozitivno korelira s tPSA ($r = 0,31$, $p = 0,010$, Spearmanov koeficijent korelacije) dok metilacija CpG5 gena *CAV1* negativno i slabo korelira s dobi ($r = -0,24$, $p = 0,046$, Spearmanov koeficijent korelacije). Nije nađena povezanost metilacije ostalih CpG mjesta s kliničkim značajkama. Metilacije pojedinačnih CpG mjesta gDNA gena *CAV1* međusobno pozitivno koreliraju. Skupina gradusa pozitivno korelira s T-om ($r = 0,53$, $p = 0,01$, Spearmanov koeficijent korelacije).

Tablica 19. Rezultati Spearmanove korelacijske analize metilacije i ekspresije gena *CAV1* u tkivu s kliničkim značajkama. Polja sa Spearmanovim korelacijskim koeficijentom su bijela, a polja s p-vrijednostima siva. Crveno su označene p-vrijednosti < 0,05, a crveno njihove pripadajuće r-vrijednosti parametara koji pokazuju korelaciju. GS - Skupina gradusa, T - anatomska proširenost primarnog tumora

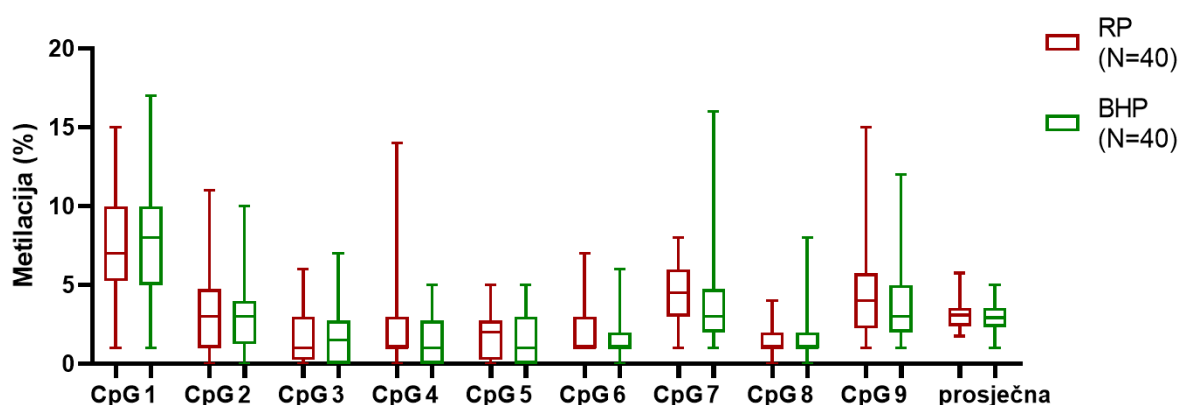
p / r	IRS stroma	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9	prosječna metilacija	tPSA	dob	GS	T
IRS stroma	1,00	0,05	0,08	0,00	0,01	-0,01	-0,08	-0,02	0,05	0,11	0,07	-0,01	-0,17	-0,04	-0,18
CpG1	0,624	1,00	0,56	0,62	0,66	0,65	0,59	0,66	0,56	0,41	0,66	0,05	-0,01	0,06	0,01
CpG2	0,437	<0,001	1,00	0,83	0,69	0,77	0,57	0,45	0,60	0,36	0,75	0,07	-0,12	0,05	-0,19
CpG3	0,978	<0,001	<0,001	1,00	0,78	0,73	0,56	0,51	0,60	0,55	0,79	0,10	-0,10	0,12	0,05
CpG4	0,894	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,73	0,58	0,55	0,56	0,53	0,73	0,14	-0,01	0,00	-0,04
CpG5	0,950	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,72	0,58	0,65	0,47	0,73	0,07	-0,24	-0,08	-0,06
CpG6	0,451	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,65	0,64	0,53	0,71	0,10	-0,02	-0,01	0,13
CpG7	0,864	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,65	0,54	0,58	0,18	-0,03	0,15	0,13
CpG8	0,630	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,48	0,61	0,31	-0,15	0,12	0,10
CpG9	0,299	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,67	0,07	0,04	0,13	0,10
prosječna metilacija	0,525	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,12	-0,03	0,06	0,06
tPSA	0,907	0,693	0,572	0,433	0,249	0,559	0,410	0,133	0,010	0,589	0,320	1,00	0,13	0,36	0,17
dob	0,125	0,967	0,310	0,405	0,946	0,046	0,896	0,777	0,217	0,767	0,788	0,251	1,00	0,13	-0,07
GS	0,831	0,776	0,813	0,549	0,991	0,680	0,967	0,435	0,553	0,517	0,770	0,026	0,439	1,00	0,53
T	0,943	0,952	0,334	0,814	0,837	0,740	0,508	0,519	0,626	0,596	0,748	0,325	0,675	0,001	1,00

5.3.5 Metilacija gena *CAV1* u krvnoj plazmi

Rezultati analize metilacije cfDNA gena *CAV1* u krvnoj plazmi ispitanika s rakom prostate i ispitanika s BHP-om u prikazani su na slici 17.

Medijan prosječne metilacije cfDNA gena *CAV1* u krvnoj plazmi iznosio je 3 % u obje skupine ispitanika.

Statistička analiza pokazala je da se dvije skupine ispitanika ne razlikuju značajno ni u prosječnoj metilaciji regije gena *CAV1* niti u jednom CpG mjestu.



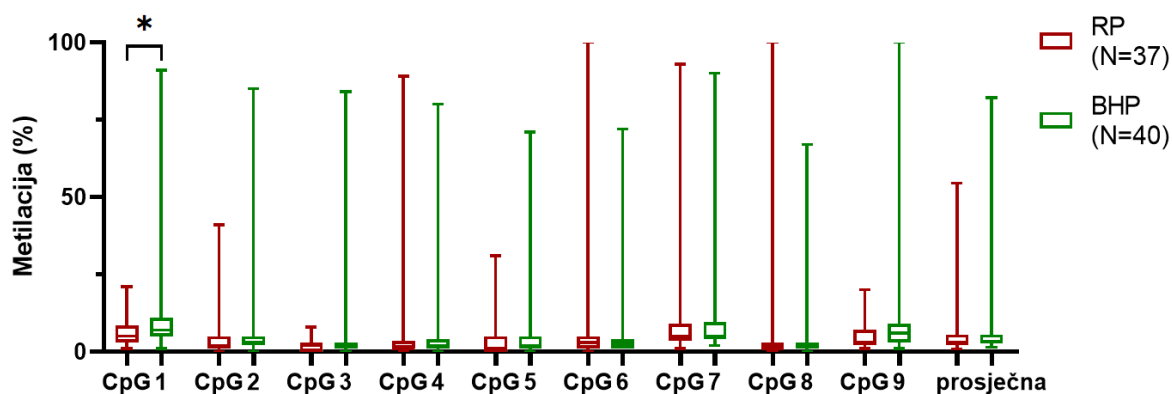
Slika 17. Postotak metilacije cfDNA gena *CAV1* u krvnoj plazmi po CpG mjestima te prosječna metilacija u pacijenata s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Mann-Whitney U test. RP - rak prostate, BHP - benigna hiperplazija prostate.

5.3.6 Metilacija gena *CAV1* u sjemennoj plazmi

Rezultati analize metilacije cfDNA gena *CAV1* u sjemennoj plazmi ispitanika s rakom prostate i ispitanika s BHP-om u prikazani su na slici 18.

Analiza prosječne metilacije cfDNA gena *CAV1* u sjemennoj plazmi pokazala je da nema razlike između ispitivanih skupina. Medijan prosječne metilacije gena *CAV1* u cfDNA u sjemene plazme ispitanika iznosio je 3 % u obje skupine ispitanika.

Statistička analiza pokazala je da se dvije skupine ispitanika značajno razlikuju u metilaciji prvog CpG mjesta ($p = 0,043$, Mann-Whitney U test). Medijan metilacije na tom mjestu kod ispitanika s rakom prostate iznosio je 5 %, a kod ispitanika s BHP-om 7 %. Metilacija ostalih 8 CpG mjesta bila je slična u obje ispitivane skupine.



Slika 18. Postotak metilacije cfDNA gena *CAV1* u sjemenjnoj plazmi po CpG mjestima te prosječna metilacija u pacijenata s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* p-vrijednost < 0,05). Mann-Whitney U test. RP - rak prostate, BHP - benigna hiperplazija prostate.

5.3.7 Metilacija gena *CAV1* u tekućinskim biopsijama i kliničke značajke

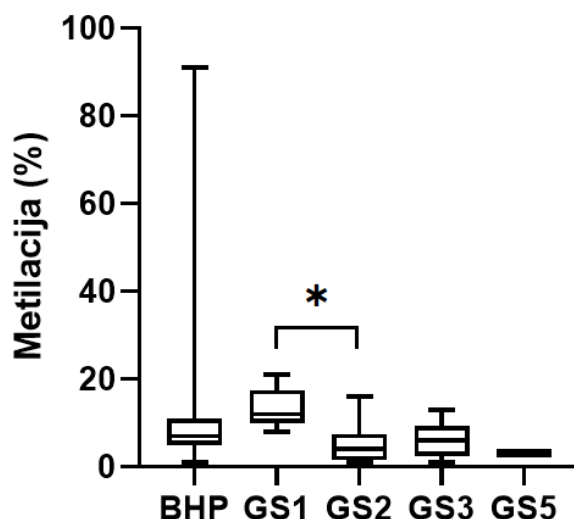
Spearmanova korelacijska analiza povezanosti metilacije gena *CAV1* u uzorcima tekućinskih biopsija i kliničkih značajki (dob, tPSA, skupina gradusa, T) pokazala je slabu negativnu povezanost između metilacije CpG7 u sjemenjnoj plazmi i skupine gradusa ($r = -0,37$, $p = 0,025$, Spearmanov koeficijent korelacije). Nije pronađena nikakva povezanost između drugih parametara (Tablica 20).

Tablica 20. Rezultati Spearmanove korelacijske analize metilacije gena *CAV1* u uzorcima tekućinskih biopsija i kliničkih značajki. Žutom bojom označen je statistički značajan rezultat.

T - anatomska proširenost primarnog tumora

		Dob		tPSA		Skupina gradusa		T	
Metilacija		r	p	r	p	r	p	r	p
Krvna plazma	CpG1	-0,02	0,827	-0,01	0,926	0,02	0,913	-0,08	0,640
	CpG2	0,02	0,867	0,11	0,314	0,09	0,596	0,04	0,823
	CpG3	0,10	0,392	0,13	0,241	0,23	0,160	-0,02	0,912
	CpG4	0,13	0,236	0,04	0,698	0,11	0,480	0,18	0,304
	CpG5	0,09	0,438	-0,05	0,681	-0,21	0,204	-0,17	0,339
	CpG6	0,00	0,992	-0,05	0,663	0,03	0,877	0,20	0,249
	CpG7	0,11	0,324	0,14	0,230	-0,17	0,301	-0,11	0,514
	CpG8	0,09	0,418	0,09	0,424	-0,02	0,913	-0,12	0,505
	CpG9	-0,07	0,515	0,09	0,435	0,06	0,722	0,21	0,231
	prosječna	0,08	0,460	0,14	0,224	0,14	0,386	0,16	0,369
Sjemena plazma	CpG1	-0,08	0,503	-0,09	0,446	-0,31	0,061	0,16	0,376
	CpG2	-0,10	0,385	-0,07	0,525	-0,08	0,647	0,11	0,547
	CpG3	0,09	0,418	0,02	0,862	-0,16	0,351	-0,06	0,724
	CpG4	-0,02	0,869	0,00	0,979	0,08	0,653	0,27	0,136
	CpG5	-0,04	0,714	0,08	0,510	-0,21	0,208	0,03	0,850
	CpG6	0,04	0,744	0,11	0,339	-0,21	0,206	0,16	0,364
	CpG7	-0,13	0,268	-0,09	0,458	-0,37	0,025	-0,04	0,839
	CpG8	-0,01	0,919	-0,04	0,704	-0,08	0,651	0,05	0,797
	CpG9	-0,05	0,673	-0,11	0,352	-0,14	0,414	0,09	0,626
	prosječna	-0,11	0,325	0,00	0,982	-0,28	0,099	0,11	0,528

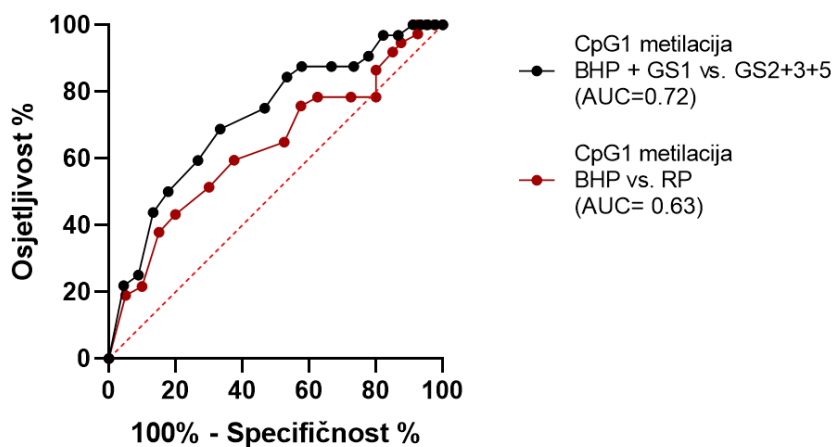
Metilacija CpG1 mjesta gena *CAV1* u sjemennoj plazmi značajno se razlikovala između pacijenata skupine gradusa 1 i 2 ($p = 0,012$, Kruskal-Wallisov test) dok između ostalih skupina nije bilo značajnih razlika (Slika 19).



Slika 19. Distribucija metilacije CpG1 mjesta u cfDNA gena *CAV1* u sjemenjnoj plazmi po podskupinama ispitanika. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* p-vrijednost < 0,05). Kruskal-Wallisov test. BHP - benigna hiperplazija prostate, GS - skupina gradusa.

5.3.8 Karakteristike metilacije cfDNA gena *CAV1* kao biomarkera

S obzirom da se metilacija cfDNA gena *CAV1* na CpG1 mjestu u sjemenjnoj plazmi statistički značajno razlikuje u dvije ispitivane skupine, napravljena je analiza ROC krivulje. Za ispitivani biomarker površina ispod krivulje (engl. *area under curve*, AUC) iznosi 0,63 (p = 0,044). Izračunavanjem Youdenovog indeksa dobivena je „cut-off“ vrijednost metilacije od 4,5 % za koju je osjetljivost 43,24 %, a specifičnost 80 % (Slika 20).

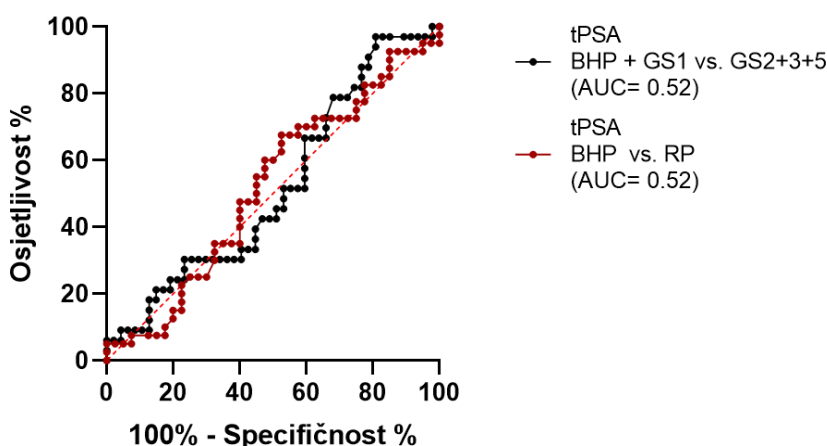


Slika 20. ROC krivulja za metilaciju cfDNA gena *CAV1* na CpG1 u sjemenjnoj plazmi.

RP - rak prostate, BHP - benigna hiperplazija prostate, GS - skupina gradusa.

Kako bi se ispitao potencijal metilacije cfDNA gena *CAV1* na CpG1 mjestu u sjemennoj plazmi za razlikovanje pacijenata s BHP-om i rakom prostate skupine gradusa 1 od pacijenata s rakom prostate skupine gradusa većeg od 1, napravljena je analiza ROC krivulje. Površina ispod krivulje iznosila je 0,72 ($p = 0,001$), a za „cut-off“ vrijednost 6,5 % osjetljivost je iznosila 68,75 %, a specifičnost 66,67 % (Slika 20).

Napravljena je i analiza ROC krivulje tPSA, trenutnog markera za rak prostate. Uzimajući u izračun vrijednosti tPSA prije biopsije za razlikovanje raka prostate od BHP-a, površina ispod krivulje iznosila je 0,52 ($p = 0,777$). Za „cut-off“ vrijednost 7,76 ng/mL osjetljivost je iznosila 67,5 %, a specifičnost 47,5 %. Za razlikovanje ispitanika s BHP-om i rakom prostate skupine gradusa 1 od pacijenata s rakom prostate skupine gradusa većeg od 1 na temelju vrijednosti tPSA izračunata površina ispod krivulje je 0,52 ($p = 0,762$). Za „cut-off“ vrijednost 4,53 ng/mL osjetljivost je iznosila 19,15 %, a specifičnost 47,5 % (Slika 21).



Slika 21. ROC krivulja za tPSA prije biopsije pacijenata uključenih u istraživanje.

RP - rak prostate, BHP - benigna hiperplazija prostate, GS - skupina gradusa.

S obzirom na to da je jedino metilacija gena *CAV1* na poziciji CpG1 u ejakulatu pokazala statistički značajnu razliku između BHP skupine i skupine s rakom prostate, kombiniranje s drugim pozicijama metilacije u uzorcima tekućinskih biopsija nije imalo smisla već je ispitana sposobnost diskriminacije dvije skupine na temelju kombinacije metilacije značajnog CpG mjesta s tPSA i dobi. Kombiniranje metilacije CpG1 mjesta gena *CAV1* u ejakulatu s tPSA ili dobi ili jednim i drugim nije značajno doprinijelo razlučivanju ispitanika s BHP-om od ispitanika s rakom prostate (AUC 0,64, $p = 0,082$; 0,63, $p = 0,101$; 0,64, $p = 0,171$) niti razlučivanju ispitanika s BHP-om i rakom prostate skupine gradusa 1 od ispitanika s rakom prostate skupine gradusa ≥ 2 (AUC 0,74, $p = 0,001$; 0,72, $p = 0,003$; 0,74, $p = 0,003$).

6. RASPRAVA

Rak prostate drugi je najčešće dijagnosticirani rak kod muškaraca u svijetu te prvi u Republici Hrvatskoj. Ovaj rak je biološki i klinički vrlo varijabilan te može biti indolentan s niskim rizikom progresije i metastaziranja ili klinički značajan i pokazivati agresivan tijek bolesti (67). Posebice u ranijim razvojnim fazama, rak prostate ne pokazuje nikakve specifične simptome dok su kod manjeg broja pacijenata prisutni simptomi slični onima kod BHP-a te se dijagnostika temelji na biopsiji prostate indiciranom vrijednošću serumskog PSA i/ili nalazom digitorektalnog pregleda (3). Kod samo trećine pacijenata u kojih je indicirana biopsija patohistološki se dijagnosticira rak prostate (u > 95 % adenokarcinom koji se obično nalazi u perifernoj zoni) (44) što postavlja pitanje opravdanosti brojnih biopsija, a također i broja otkrivenih slučajeva s indolentnim rakom (45).

Biopsija prostate je invazivna i nelagodna metoda, a ne samo da sa sobom nosi rizik od potencijalnih komplikacija nego je i pristup tumorskom tkivu ograničen, a dobiveni bioptat često ne odražava ni intratumorsku heterogenost kao ni pojavu novih klonova stanica nastalih tumorskom evolucijom (49). Nadalje, postoji mogućnost da tumorsko tkivo u prostati postoji, ali nije uzorkovano biopsijom te je stoga nalaz lažno negativan, a biopsiju je potrebno ponoviti (46). Zbog svega navedenoga, neupitna je potreba za novijim biomarkerima koji bi na manje invazivan način i s većom specifičnošću razlučili rak prostate od BHP-a ili identificirali klinički značajan rak prostate. Rješenje znanstvenici traže u uzorcima tekućinskih biopsija, prvenstveno krvi i urinu, koji su izvor mnogih potencijalnih ciljnih molekula.

Promjene u metilacijskim obrascima pojedinih gena svojstvene su raku te su ujedno i stabilne promjene što ih čini pogodnim molekulama za biomarker. S obzirom da su stanice u okolini raka prostate također epigenetički promijenjene, analiza metilacije DNA gena *RASSF1*, *APC* i *GSTP1* već je dio komercijalno dostupnog testa za rak prostate ConfirmMDx (MDxHealth, Inc, Irvine, CA, USA). Svrha ovog testa je procijeniti potrebu za ponovnom biopsijom pacijenata s prethodno negativnom biopsijom, ali kod kojih još uvijek postoji sumnja na rak prostate (37,68). Naspram ovom tkivnom testu, postoje i komercijalno dostupni testovi iz krvi i urina, a oni su fokusirani na proteine i RNA molekule (43,46,47). Ovo istraživanje pokušava promjene u metilaciji DNA u tkivu pronaći u uzorcima tekućinskih biopsija - krvi kao dobro poznatoj dijagnostičkoj tekućini te ejakulatu kao rijetko istraživanom izvoru molekularnih markera. Od 50 često hipermetiliranih gena u raku prostate za istraživanje u sklopu ove doktorske disertacije odabrani su geni *RASSF1* i *CAV1* (38).

6.1 Ekspresija i metilacija gena *RASSF1*

Imunohistokemijska analiza pokazala je da je gen *RASSF1* na proteinskoj razini značajno više eksprimiran u epitelu i stromi BHP-a što je očekivano s obzirom da je *RASSF1* tumor supresor (46). Nije pronađen podatak o ekspresiji gena *RASSF1* na proteinskoj razini u tkivu raka prostate, ali postoje studije o njegovoj ekspresiji u drugim karcinomima te su rezultati slični dobivenima pri izradi ove disertacije. *RASSF1* je manje eksprimiran u tkivu duktalnog adenokarcinoma gušterače, karcinoma endometrija, karcinoma mokraćnog mjehura te karcinoma bubrega od zdravog ili okolnog netumorskog tkiva (69-72).

Za rak prostate dostupni su podaci o ekspresiji na razini mRNA. Podaci o ekspresiji *RASSF1* na mRNA razini dobiveni u studiji GTEx (engl. *The Genotype-Tissue Expression*) javno su raspoloživi na Xena platformi te pokazuju da je gen *RASSF1* više eksprimiran u zdravom tkivu prostate nego u tumorskome ili okolnome netumorskom s time da je ekspresija u okolnome netumorskome tkivu niža od one u tumorskome (73-75). U ovom istraživanju ekspresija na proteinskoj razini je veća u okolnom naspram tumorskom tkivu što se razlikuje od rezultata na mRNA razini, ali isto tako se zna da se promjene na razini mRNA ne odražavaju nužno na razinu proteina (76).

Metilacija gena *RASSF1* sastavni je dio epigenetičkog testa ConfirmMDx (MDxHealth, Irvine, CA) koji detektira prisutnost raka prostate u netumorskom tkivu u okolini tumorskoga qMSP metodom (kvantitativna lančana reakcija polimerazom specifična za metilaciju, engl. *quantitative methylation-specific polymerase chain reaction*). Negativna prediktivna vrijednost tog testa iznosi 90 % stoga je nedvojbeno da se metilacija u tkivu raka prostate razlikuje od tkiva BHP-a (77). Analizirana regija pokazuje da je tumorsko tkivo hipermetilirano u odnosu na tkivo BHP-a i okolno netumorsko tkivo na svih devet CpG mjesta te u prosječnoj metilaciji, što je i očekivano. Okolno netumorsko tkivo pokazalo je značajno nižu metilaciju od tkiva BHP-a na četiri CpG mjesta (CpG4, CpG5, CpG6, CpG7). S obzirom da je točna lokacija *RASSF1* regije koja se analizira ConfirmMDx testom nepoznata već se samo zna da je dio promotora, vjerojatno se regija analizirana u ovome istraživanju ne poklapa s njom.

Ekspresija gena *RASSF1* u ovom radu ne korelira s metilacijom što je već i pokazano u studiji Koch i sur. (78).

U ovom istraživanju nije nađena nikakva povezanost metilacije *RASSF1A* u tkivu sa skupinom gradusa ili vrijednošću tPSA što se ne poklapa s rezultatima drugih studija koje su pokazale pozitivnu povezanost (79). Uzrok neslaganju dobivenih rezultata s rezultatima prijašnjim istraživanja može biti mali broj uzoraka neravnomjerno raspoređenih po skupinama gradusa,

ali i korištena metodologija analize metilacije. Također, meta-analiza rezultirala je različitim zaključcima o povezanosti metilacije gena *RASSF1A* u tkivu i kliničkih podataka ovisno o metodologiji korištenoj u istraživanju pa su tako studije bazirane na MSP metodologiji (lančana reakcija polimerazom specifična za metilaciju, engl. *methylation-specific polymerase chain reaction*) pokazale pozitivnu korelaciju metilacije s Gleasonovim zbrojem, PSA i stadijem tumora dok su studije bazirane na qMSP metodologiji pokazale negativnu korelaciju metilacije s PSA te nikakvu korelaciju s Gleasonovim zbrojem i stadijem tumora (79). Nadalje, studije su pokazale da su rezultati analize metilacije ovakvim metodama viši od rezultata analize metilacije pirosekvenciranjem stoga nije moguće u potpunosti uspoređivati rezultate dobivene različitim metodama (80). Nadalje, pirosekvenciranje je manje korištena metoda jer je vremenski i cjenovno zahtjevnija te se velika većina studija bazira na MSP i qMSP metodama (81,82). Pronađena je samo jedna publikacija autora Vasiljević i sur. koja je pirosekvenciranjem analizirala metilaciju *RASSF1* gena u tkivu i pokazala je da je ovaj gen hipermetiliran u raku prostate naspram BHP-a. Ta studija je rađena na gDNA iz svježe smrznutih uzoraka, a vrsta uzorka također ima utjecaja na rezultat analize metilacije pošto je gDNA iz parafina fragmentirana te dolazi do modifikacije baza od čega je jedna mogućnost deaminacija citozina čime na tom mjestu nastaje uracil (83,84). Na temelju svega navedenoga može se zaključiti da na rezultate metilacije utječe više faktora, ali unatoč tome zasigurno je gen *RASSF1* u tkivu raka prostate više metiliran nego u tkivu BHP-a.

U uzorcima tekućinskih biopsija dostupni su podaci o metilaciji gena *RASSF1* u krvi i urinu. Roupret i sur. su istraživali metilaciju gena *RASSF1A* u uzorcima pune krvi te su pokazali da pacijenti s rakom prostate u trenutku dijagnosticiranja imaju veću razinu metilaciju od kontrolne skupine, a i da metilacija dodatno raste ukoliko dođe do relapsa (85). Bastian i sur. određivali su metilaciju gena *RASSF1* DNA iz seruma pacijenata te su pokazali da DNA nije hipermetilirana u pacijenata bez raka prostate ili s lokaliziranim rakom prostate, a da je hipermetilirana u nekih pacijenata s metastatskim rakom prostate otpornim na kastraciju (3/18) (86). Navedeno dovodi do mogućeg zaključka da u ranijim stadijima dolazi do promjene u metilaciji gena *RASSF1* i u gDNA krvnih stanica i da te promjene količinski nadvladavaju promjene metilacije cfDNA. U skladu s time, moguće je da bi za ranu detekciju raka prostate pogodnije bilo gledati metilaciju *RASSF1A* DNA iz pune krvi nego metilaciju samo u cfDNA. U prilog tome govore i rezultati naše studije jer, unatoč velikim razlikama primijećenim u tkivu, u cfDNA iz krvne plazme nisu nađene nikakve razlike u metilaciji cfDNA gena *RASSF1A*, a

gotovo svi pacijenti s rakom prostate osim jednog su imali lokalizirani ili lokalno uznapredovali oblik.

Haluskova i sur. istraživali su metilaciju ovog gena u DNA iz urina (ukupna DNA) te su pokazali su da je gen *RASSF1A* bio hipermetiliran u 3 od 5 pacijenata s rakom prostate, ali i u 3 od 4 pacijenta bez raka prostate (87). U toj studiji rak prostate svih pacijenata bio je Gleason zbroja 6. Dobiveni rezultati metilacije dosta su slični iako se radi o dvije različite dijagnoze, a opet dosta različiti s obzirom da bi ih se sve moglo promatrati i kao nekarcinomske pacijente. Naime, zbog nemogućnosti invazije u susjedne strukture i metastaziranja, predlaže se preimenovanje raka prostate Gleason zbroja 6 na način da se izostavi riječ „rak“ i naglasi da se radi o premalignoj leziji (88). Sama metilacija gena *RASSF1* ukupne DNA iz urina uzorkovanog bez prethodne masaže prostate nije dobar materijal, ali kombiniranje više markera u panel i/ili masaža prostate prije uzorkovanja djeluju obećavajuće. Metilacija gena *RASSF1* u urinu pokazala je bolju uspješnost kao biomarkera u kombinaciji s metilacijom nekih drugih gena gdje se osjetljivost kreće od 86 % do 100 %, a specifičnost od 89 % do 100 % (89).

Ejakulat je općenito slabo istražen izvor biomarkera. Malobrojne studije fokusirane su uglavnom na količinu i fragmentaciju DNA ili na proteom (90,91). Međutim, postoje i dvije studije o metilaciji gena *GSTP1* u ejakulatu u svrhi rane detekcije raka prostate osjetljivosti od 46 % do 50 %, a specifičnosti do 100 % (89). Nije pronađena studija o metilaciji gena *RASSF1* u ejakulatu s kojom bi mogli usporediti dobivene rezultate. Naspram velikih razlika u metilaciji tkiva, u cfDNA iz sjemene tekućine nije nađena nikakva razlika među skupinama što se tiče *RASSF1A*. Uzrok tome može biti premalo cfDNA iz prostate te bi zbog toga uzorkovanje bilo dobro napraviti nakon masaže prostate, ali i istražiti metilaciju u čitavim stanicama u ejakulatu nakon odvajanja spermija.

Obzirom na sve prethodno navedeno, metilacija gena *RASSF1A* u tkivu obećava, ali kako bismo ju iskoristili za dijagnostiku u tekućinskim biopsijama, treba uzeti u obzir vrstu i obradu uzorka, broj i distribuciju pacijenata po stadijima i regiju gena.

6.2 Ekspresija i metilacija gena *CAV1*

Gen *CAV1* je statistički značajno manje eksprimiran u stromi raka prostate od BHP-a, dok je ekspresija u stromi okolnog tkiva slična ekspresiji u tkivu BHP-a. Rezultati su u skladu s rezultatima Visio i sur. koji je i pokazao da ekspresija u stromi negativno korelira s ekspresijom u epitelu te Gleasonovim zbrojem (92,93). Na našem uzorku ispitanika nije nađena povezanost ekspresije i Gleasonovog zbroja, a mogući razlog je razlika u raspodjeli ispitanika po prognostičkim skupinama. Naime, u našoj skupini ispitanika prevladavali su oni s lokaliziranim rakom prostate skupine gradusa 2 (26/40) dok su u studiji Visio i sur. prevladavali bolesnici s metastatskim rakom prostate. Iz istog razloga moguće je odsudstvo imunohistokemijskog signala u epitelu svih tipova tkiva. Samo je u jednom od uzoraka ispitanika s rakom prostate skupine gradusa 3 u okolnome netumorskome tkivu zabilježena ekspresija (umjereno jak signal, kategorija postotka 3, IRS 6). Drugi mogući razlog je razrjeđenje protutijela. Hamarsten i sur. su primijetili da se epitel počinje jače bojati nakon smanjenja razrjeđenja protutijela (94). S obzirom da se *CAV1* nalazi u regiji 7q31.1 koja je često deletirana u raku prostate, moguće je da je delecija gena razlog odsustvu signala u epitelnim stanicama (95). Nadalje, ekspresija gena *CAV1* u ovome radu ne korelira s tPSA što je u skladu s prijašnjim rezultatima (96).

Gen *CAV1* je jedan od prvih deset gena hipermetiliranih u tkivu raka prostate naspram okolnog tkiva (97). Pomoću *online* alata UCSC Xena vizualizirani su podaci studije TCGA-PRAD (engl. *The Cancer Genome Atlas Prostate Adenocarcinoma*) te je regija koja obuhvaća CpG mjesta s najviše razlike u metilaciji između tkiva raka prostate i pripadajućeg netumorskog tkiva odabrana za ovo istraživanje (98). Analizirana regija u našoj studiji obuhvaćala je istih sedam CpG mjesta kao u studiji TCGA-PRAD te dva CpG mjesta koja nisu uključena u tu studiju (CpG3 i CpG9) (73). Kao i u TCGA-PRAD studiji, razina metilacije u tumorskome tkivu bila je veća od okolnog netumorskog tkiva na svim CpG mjestima. U našoj studiji analizirana je metilacija i u tkivu BHP-a te je ona statistički značajno manja od metilacije u tkivu raka prostate na mjestima CpG2, CpG3 te prosječnoj metilaciji gena *CAV1* dok je na mjestu CpG1 ona značajno veća od metilacije okolnog netumorskog tkiva. Ipak, nije nađena povezanost između metilacije odabrane regije gena *CAV1* i njegove ekspresije na proteinskoj razini. Tri su moguća uzroka tome. Prvo, treba imati na umu da su za analizu metilacije tkiva uzorkovane i epitelne i stromalne stanice zajedno te da gen *CAV1* nije eksprimiran u epitelu. Ukoliko je gen *CAV1* reguliran metilacijom, to bi svakako moglo biti uočeno odvajanjem tipova stanica i povezivanjem s ekspresijom u točnom tipu stanica. Drugo, moguće je da je ekspresija pod regulacijom metilacije neke druge regije u promotoru. Kao treće, treba uzeti u obzir mogućnost

da metilacija nije mehanizam regulacije ekspresije gena *CAV1*, već neki drugi mehanizam regulira ekspresiju ovog gena. Sanders i sur. su na fibroblastima iz pluća pokazali da je ekspresija *CAV1* epigenetički regulirana, primarno metilacijom histona, a ne DNA (99).

Bez obzira na mehanizam regulacije ekspresije gena *CAV1*, na temelju nađenih razlika metilacije u tipovima tkiva, opravdano je bilo očekivati razliku i u metilaciji cfDNA.

Nadalje, i razine proteina *CAV1* u serumu su veće u pacijenata s rakom prostate od pacijenata s BHP-om, a u krvnoj plazmi veća je razina u pacijenata s kastracijski osjetljivim rakom prostate nego u pacijenata s kastracijski neosjetljivim rakom prostate (100,101). Prema našim saznanjima, metilacija cfDNA gena *CAV1* u uzorcima tekućinskih biopsija pacijenata s rakom prostate nije do sada ispitana. Postoji studija o njegovoj metilaciji u urinu, ali je u toj studiji analizirana gDNA izolirana iz stanica peleta. U toj studiji pokazano je da metilacija gena *CAV1* može poslužiti za razlikovanje pacijenata s rakom prostate od pacijenata s BHP-om (AUC 0,72) no treba napomenuti da se radilo o različitoj regiji (+1855 od mjesta početka transkripcije) (102).

U ovom radu, prosječna metilacija cfDNA gena *CAV1* u krvnoj plazmi bila je niska u obje skupine (medijan 3 %) te se između skupina ispitanika nije razlikovala ni prosječna metilacija ni metilacija pojedinih CpG mjesta. Nije nađena nikakva povezanost između metilacije i kliničkih parametara. Mogući uzrok tome je dominacija cfDNA podrijetlom iz drugih organa koja onemogućava cfDNA iz prostate da dođe do izražaja. U krvi zdravih dobrovoljaca prevladava cfDNA iz hematopoetskih stanica (medijan 7.9 ng/ml). Kod pacijenata s lokaliziranim oblikom raka prostate koncentracija cfDNA je nešto niža (medijan 6.7 ng/ml) dok je kod pacijenata s metastatskim oblikom raka prostate koncentracija značajno viša (medijan 13.8 ng/ml) (50). S obzirom na navedeno, može se zaključiti da cfDNA podrijetlom iz lokaliziranog oblika raka prostate nije prisutna u krvi u količinama dovoljnim za detekciju i dijagnostiku dok kod metastatskog oblika raka prostate jest. Ispitanici uključeni u ovu studiju nemaju metastaze te je moguće da zbog toga nemaju ni dovoljno cfDNA u krvi podrijetlom od tumora. Osim toga, na količinu cfDNA u krvi utječe i brzina njene degradacije. Aktivnost DNaza je niska u pacijenata s rakom prostate, a nemetilirana DNA se brže eliminira iz krvi od metilirane DNA (103,104). Proteini vezani za cfDNA otežavaju pristup DNaza-ma te se takva DNA slabije razgrađuje (103).

Zbog male količine cfDNA u krvi i faktora koji utječu na njenu degradaciju, vjerojatno promjene u metilaciji cfDNA nisu dobar pristup za detekciju lokaliziranog raka prostate u krvi.

Prosječna metilacija cfDNA gena *CAV1* u sjemenjnoj plazmi bila je niska u obje skupine (medijan 3 %). Razlika u metilaciji pojedinih CpG mjesta gena *CAV1* uočena je samo na prvom CpG-u gdje je metilacija bila statistički značajno veća u skupini ispitanika s BHP-om. Medijan metilacije CpG1 bio je 7 % u ispitanika s BHP-om te 5 % u ispitanika s rakom prostate. Što se tiče metilacije po skupinama gradusa, metilacija cfDNA u ispitanika s rakom prostate skupine gradusa 1 statistički je značajno veća nego u ispitanika s skupinom gradusa 2. Između ostalih skupina gradusa i/ili BHP-a nije bilo značajne razlike. S obzirom na to da niska razina ekspresije gena *CAV1* pomaže u prevladavanju senescencije inducirane onkogenom moguće je da je pad razine metilacije bitan događaj za progresiju raka prostate (59).

Povezanost metilacije cfDNA gena *CAV1* u ejakulatu s kliničkim značajkama (dob, tPSA, skupina gradusa, T) nađena je za samo za CpG7 i skupine gradusa dok između ostalih parametara nije nađena nikakva povezanost. S obzirom da nema literaturnih navoda koji jasno govore o povezanosti pojedinih CpG mjesta gena *CAV1* s kliničkim značajkama, potrebno je buduća istraživanja provoditi na toj razini.

Da bi se ispitala karakteristike metilacije CpG1u sjemenjnoj plazmi kao biomarkera napravljena je analiza ROC krivulje čime je utvrđeno da AUC iznosi 0,63, a za „cut-off“ vrijednost metilacije od 4,5 % osjetljivost iznosi 43,24 %, a specifičnost 80 % što je bolje nego tPSA (AUC = 0,52). Za „cut-off“ vrijednost tPSA od 7,76 ng/mL osjetljivost je iznosila 67,5 %, a specifičnost 47,5 %.

Budući da rak prostate skupine gradusa 1 ne pokazuje metastatski potencijal i smatra se indolentnim oblikom koji ne zahtjeva liječenje, napravljena je analiza ROC krivulje za metilaciju CpG1 u svrhu razlikovanja ispitanika s BHP-om i rakom prostate skupine gradusa 1 od ispitanika s rakom prostate skupine gradusa ≥ 2 (105). AUC takve krivulje iznosi 0,72, a za „cut-off“ vrijednost 6,5 % osjetljivost je iznosila 68,75 %, a specifičnost 66,67 %. Za usporedbu, na istim pacijentima napravljena je analiza ROC krivulje za tPSA, a njen AUC bio je jednak onome za razlikovanje ispitanika s BHP-om od ispitanika s rakom prostate bez obzira na skupinu gradusa (AUC = 0,52). Za „cut-off“ vrijednost tPSA od 4,53 ng/mL osjetljivost je iznosila 19,15 %, a specifičnost 47,5 %.

Iako se metilacija CpG1 mjesta u tkivu nije razlikovala između tkiva BHP-a i raka prostate, nađena je razlika u metilaciji cfDNA u sjemenjnoj plazmi. Valja napomenuti da je to jedino CpG mjesto za koje je utvrđena razlika u metilaciji gena *CAV1* između uzoraka okolnog netumorskog tkiva i BHP-a te je i tamo tkivo BHP-a pokazalo veću metilaciju gena *CAV1* od okolnog netumorskog. Na ostalim mjestima (CpG2, CpG3 i prosječna metilacija) uočena je

statistički značajna razlika između metilacije gena *CAV1* tkiva raka prostate i BHP-a te između tkiva raka prostate i pripadajućeg okolnog tkiva, ali ne i između BHP-a i okolnog netumorskog tkiva. Nažalost, metilacija gDNA tkiva nije uključivala odvojenu analizu epitelnih i stromalnih stanica jer to zahtjeva primjenu laserskog mikrodisektora no dobiveni rezultati ukazuju na to da cfDNA u sjemennoj plazmi pacijenata s rakom prostate vjerojatno potječe iz stanica okolnog netumorskog tkiva, a ne stanica raka prostate.

Dobiveni rezultati ukazuju na to da bi metilacija cfDNA gena *CAV1* u sjemennoj plazmi mogla biti dobar biomarker raka prostate, ali svakako bi trebalo dodatno stimulirati ispuštanje cfDNA iz prostate u ejakulat, napraviti analizu metilacije stanica epitela i strome, obuhvatiti veću regiju gena *CAV1* za analizu metilacije te uključiti veći broj pacijenata s boljom raspodjelom po skupinama gradusa.

S obzirom na interindividualnu i intraindividualnu heterogenost tumora te velike razlike u kliničkom tijeku raka prostate koje je, za sada, nemoguće predvidjeti, nerealno je očekivati da jedan biomarker sam ima dovoljnu dijagnostičku snagu te je izglednija njegova primjena u panelu biomarkera i u tome smjeru bi trebalo nastaviti istraživanje metilacije cfDNA gena *CAV1* u sjemennoj plazmi.

6.3 Buduća istraživanja

Istraživanje je pokazalo koliki je potencijal navedenih molekula kao biomarkera raka prostate, a njegova realizacija ukazala na nedostatke na kojima bi trebalo raditi u budućnosti te na hodogram koji bi mogao dovesti do otkrića biomarkera.

Brojne studije osvrnule su se na predanalitičke faktore koji izazivaju varijabilnost u istraživanjima cfDNA u krvi kao što su vrijeme proteklo od jela, debljina igle za uzorkovanje, tip epruvete, vrijeme proteklo prije centrifugiranja, treskanje epruvete, čuvanje plazme i cfDNA, kvantifikacija cfDNA (63,106,107).

Povećanje količine cfDNA podrijetlom iz prostate svakako bi povećalo vjerojatnost da se prepozna biomarker u cfDNA iz raka prostate. Pokazano je da se razina cfDNA u krvi nakon biopsije povećava te medijan koncentracije jedan sat nakon biopsije iznosi 3,62 ng/ml, a dva sata nakon biopsije 7,05 ng/ml (108). Uzorci krvi uzeti dva sata nakon biopsije mogli bi biti dobar izvor biomarkera za procjenu potrebe za ponovljenom biopsijom zbog lažno negativnog rezultata biopsije te prognostičkih i prediktivnih biomarkera. Za očekivati je da se koncentracija cfDNA nakon biopsije povećava i u ejakulatu no to bi valjalo ispitati (108). Da bi se povećala koncentracija cfDNA prije uzorkovanja u svrhu dijagnostike samo na temelju tekućinske biopsije nije opravdano biopsirati pacijenta. Ipak, tome mogu poslužiti neki drugi načini obogaćivanja uzoraka kao što je masaža prostate. Masaža prostate radi se prije uzorkovanja urina za analizu već komercijano dostupnim testovima čime se povećava njihova osjetljivost (109). Stoga bi se prije uzorkovanja krvi ili ejakulata trebala napraviti masaža prostate, a potom uzorak što prije centrifugirati kako bi se izbjegla liza stanica.

Ukoliko se u uzorcima tekućinskih biopsija raka prostate želi ispitati metilacija DNA kao potencijalni biomarker, potrebno je detaljno poznavati metilaciju DNA u stanicama epitela i stromalnim stanicama zasebno i to u tkivu raka prostate, okolnome netumorskome tkivu i tkivu BHP-a. Metilacija DNA okolnog netumorskog tkiva trebala bi biti sličnija tumorskome, a što različitija od metilacije tkiva BHP-a. Zbog lokalizacije samih stanica, pretpostavljamo da je za istraživanje metilacije cfDNA sjemene plazme bitnije stanje metilacije gDNA epitelnih stanica, a za istraživanje cfDNA krvi kao izvora metilacijskih biomarkera važnije stanje metilacije gDNA stromalnih stanica. Također, analizu metilacije je potrebno napraviti na više genomskih regija kako bi se istaknuti rezultati mogli kombinirati u panel.

Što se tiče ejakulata, rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da ejakulat može biti dobar izvor biomarkera za rak prostate, iako je slabo istražen. Naime, prema dostupnoj literaturi, studija metilacije cfDNA ejakulata kao biomarkera za rak prostate nema, stoga je svakako potrebno

proširiti znanje o podrijetlu i ponašanju cfDNA u sjemennoj plazmi. Iz ejakulata, osim cfDNA, mogu se izolirati prostasomi ili epitelne stanice prostate pa se može analizirati metilacija DNA u njima. Osim toga, komercijalno dostupni urinski testovi za rak prostate baziraju se na RNA molekulama pa bi bilo zanimljivo ispitati njihov potencijal u ejakulatu. Sve u svemu, pri istraživanju bilo kojeg biomarkera u bilo kojem tipu tekućinskih biopsija bitno je proučiti literaturu, izbjeći postupke koji mogu unijeti odstupanja između uzoraka te imati dovoljno velike i balansirane skupine ispitanika.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da ejakulat može biti dobar izvor biomarkera za rak prostate, ali ga je moguće i potrebno doraditi kako je gore predloženo.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave doneseni su sljedeći zaključci:

1. Obrasci metilacije cfDNA gena *RASSF1A* u krvi i ejakulatu pacijenata s rakom prostate ne razlikuju se od onih kod pacijenata s BHP-om. Obrazac metilacije cfDNA gena *CAV1* pacijenata s rakom prostate ne razlikuje se od onog kod pacijenata s BHP-om u krvi, ali se razlikuje u ejakulatu i to samo na poziciji CpG1.
2. Postotak metilacije gena *RASSF1A* i *CAV1* veći je u tkivu raka prostate nego u tkivu BHP-a te se obrazac metilacije u tkivu raka prostate razlikuje od tkiva BHP-a.
3. Ekspresija gena *RASSF1* na proteinskoj razini u tkivu strome i epitela raka prostate je niža od ekspresije u tkivu strome i epitela BHP-a. Ekspresija gena *CAV1* na proteinskoj razini u tkivu strome raka prostate je niža od ekspresije u tkivu strome BHP-a, dok u epitelu gen *CAV1* nije eksprimiran ni u tkivu raka prostate ni BHP-a.
4. Unutar skupine pacijenata s rakom prostate zabilježen je veliki raspon u metilaciji gena *RASSF1A* i *CAV1* u tkivu dok to nije bio slučaj u tekućinskim biopsijama ni u pacijenata s BHP-om. Obrazac metilacije gena *RASSF1A* u tkivu nije povezan s ekspresijom u tkivu ni metilacijom u krvi i ejakulatu. Obrazac metilacije gena *CAV1* u tkivu nije povezan s ekspresijom u tkivu ni metilacijom u krvi. Obrazac metilacije gena *CAV1* u ejakulatu pacijenata s rakom prostate više nalikuje obrascu metilacije okolnog netumorskog tkiva, nego obrascu metilacije tkiva raka prostate i BHP-a.
5. Metilacija gena *RASSF1A* u uzorcima tkiva i tekućinskih biopsija nije povezana s dobi, tPSA ni skupinom gradusa dok metilacija cfDNA iz ejakulata pozitivno korelira s T-om. Metilacija gena *CAV1* u uzorcima tkiva na mjestu CpG5 slabo i negativno korelira s dobi dok na mjestu CpG8 slabo i pozitivno korelira s tPSA. Metilacija gena *CAV1* u uzorcima tekućinskih biopsija nije povezana s dobi ni tPSA dok metilacija cfDNA na mjestu CpG7 gena *CAV1* iz sjemene tekućine negativno korelira sa skupinom gradusa.

Geni *RASSF1* i *CAV1* u cfDNA krvi i ejakulata bolesnika s rakom prostate nisu hipermetilirani u odnosu na cfDNA krvi i ejakulata bolesnika s BHP-om te zaključujemo da hipoteza ovog istraživanja nije potvrđena. Kako je gen *CAV1* na CpG1 u ejakulatu pacijenata s rakom prostate ipak hipometiliran u odnosu na pacijente s BHP-om, može ga se predložiti za daljnja istraživanja tekućinskih biopsija kao mogući epigenetički biomarker za rak prostate.

8. SAŽETAK

Metode ranog otkrivanja raka prostate su digitorektalni pregled i povišene serumske vrijednosti antigena specifičnog za prostatu (PSA). Obzirom da PSA nije tumor specifičan marker te je povišen i u drugim stanjima (npr. benignoj hiperplaziji prostate (BHP) za definitivnu dijagnozu potrebna je biopsija koja kod samo trećine pacijenata potvrdi dijagnozu. Zbog svega toga potrebni su novi biomarkeri za otkrivanje raka prostate, posebno oni koji se mogu određivati u tekućinskim biopsijama. Kako su geni *RASSF1A* i *CAV1* u tkivu raka prostate hipermetilirani u odnosu na tkivo BHP-a, istražio se potencijal metilacije gena *RASSF1* i *CAV1* u cfDNA iz uzoraka krvi i ejakulata kao markera za razlikovanje raka prostate od BHP-a. Ekspresija odabranih gena na proteinskoj razini bila je različita među skupinama. Metilacija gena *RASSF1A* pokazala se dobrim markerom za razlikovanje tkiva raka prostate od tkiva BHP-a, ali ne i za razlikovanje pacijenata s rakom prostate i BHP-om na temelju analize cfDNA u tekućinskim biopsijama. Metilacija gena *CAV1* pokazala se dobrim markerom za razlikovanje pacijenata s rakom prostate od pacijenata s BHP-om, budući da je metilacija pozicije CpG1 gena *CAV1* bila značajno niža u ejakulatu pacijenata s rakom prostate od pacijenata s BHP-om. Metilacija gena *CAV1* na ostalim CpG mjestima kao i metilacija u krvi se nije razlikovala između skupina. Temeljem rezultata ove disertacije može se zaključiti da je metilacija gena *CAV1* na mjestu CpG1 ejakulata potencijalni biomarker za rak prostate.

9. ABSTRACT

Cell-free DNA methylation of *RASSF1* and *CAV1* genes in blood and ejaculate of patients with prostate cancer, Lucija Škara, 2022

Early prostate cancer detection methods are digital rectal examination and elevated prostate-specific antigen (PSA) levels. As PSA is not cancer specific and increased level may be caused by other conditions (e.g. benign prostatic hyperplasia (BPH)), for definitive diagnosis biopsy is needed, which confirms the diagnosis for only one third of patients. Because of all this, new biomarkers for prostate cancer detection are needed, especially those available in liquid biopsy samples. Since *RASSF1* and *CAV1* genes are hypermethylated in prostate cancer tissue compared to BPH tissue, potential of *RASSF1* and *CAV1* gene methylation of cfDNA from blood and ejaculate samples as a biomarker to distinguish between PC and BPH was assessed. Expression of selected genes on protein level differed between groups. *RASSF1A* gene methylation distinguished well prostate cancer tissue from BPH tissue but cfDNA methylation did not differ between groups. *CAV1* gene methylation distinguished well prostate cancer patients from BPH patients since CpG1 methylation of *CAV1* gene in ejaculate cfDNA was significantly lower in prostate cancer group. *CAV1* gene methylation on other CpG sites in ejaculate or blood cfDNA did not differ between groups. To conclude, methylation CpG1site of *CAV1* gene in ejaculate has the potential as a biomarker for prostate cancer.

10. POPIS LITERATURE

1. Xin L. Cells of origin for prostate cancer. In: Dehm SM, Tindall DJ, editors. Prostate cancer: cellular and genetic mechanisms of disease development and progression. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 67-86.
2. Tonry C, Finn S, Armstrong J, Pennington SR. Clinical proteomics for prostate cancer: understanding prostate cancer pathology and protein biomarkers for improved disease management. Clin Proteomics. 2020;17(1):41.
3. Šamija M, Antunac K, Bedalov A, Bašić-Koretić M, Bišof V, Divošević V i sur. Rak prostate: najvarijabilniji zloćudni tumor. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009, p. 1-20.
4. Kaler J, Hussain A, Haque A, Naveed H, Patel S. A comprehensive review of pharmaceutical and surgical interventions of prostate cancer. Cureus. 2020;12(11):e11617.
5. Paulis G. Inflammatory mechanisms and oxidative stress in prostatitis: the possible role of antioxidant therapy. Res Rep Urol. 2018;10:75-87.
6. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. Pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 1047-1058.
7. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, i sur. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.
8. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The epidemiology of prostate cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(12):a030361.
9. Gandhi J, Afridi A, Vatsia S, Joshi G, Joshi G, Kaplan SA, i sur. The molecular biology of prostate cancer: current understanding and clinical implications. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2018;21(1):22-36.
10. Altarac S. Testiranje na PSA u ranom otkrivanju karcinoma prostate. Ljetopis AMZH. 2018;16:48-56.
11. Shah SIA. An update on the risk factors for prostate cancer. World Cancer Res J.

2016;3:e711.

12. Rawla P. Epidemiology of prostate cancer. *World J Oncol*. 2019;10(2):63-89.
13. Ružić B, Knežević M. Karcinom prostate. *Medicus*. 2015;24(1):45-50.
14. Hao S, Karlsson A, Heintz E, Elfström KM, Nordström T, Clements M. Cost-effectiveness of magnetic resonance imaging in prostate cancer screening: a microsimulation study. *Value Heal*. 2021;24(12):1763-72.
15. Ong XRS, Bagguley D, Yaxley JW, Azad AA, Murphy DG, Lawrentschuk N. Understanding the diagnosis of prostate cancer. *Med J Aust*. 2020;213(9):424-9.
16. Pezelj I, Tomašković I, Čulo K, Novosel L, Tomić M, Reljic A, i sur. Cost-benefit analysis of the introduction of MP-MRI guided biopsies in croatia. *Acta Clin Croat*. 2018;57:46-9.
17. Varma M, Lee MW, Tamboli P, Zarbo RJ, Jimenez RE, Salles PGO, i sur. Morphologic criteria for the diagnosis of prostatic adenocarcinoma in needle biopsy specimens: a study of 250 consecutive cases in a routine surgical pathology practice. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(5):554-61.
18. Krušlin B, Džombeta T, Tomas D, Ulamec M. Prostatic adenocarcinoma grading system according to 2016 world health organization classification of tumors. *Liječnički Vjesn*. 2017;139(3-4):72-5.
19. Kench JG, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Cree IA, Gill AJ, i sur. WHO Classification of tumours 5th edition: evolving issues in classification, diagnosis and prognostication of prostate cancer. *Histopathology*. 2022;epub ahead of print.
20. Matulović I, Šilje M, Šljuka M, Cvitanović Z, Milić M, Busančić S. Maligna bolest prostate Malignant disease of prostatic node. *Sestrin Glas*. 2019;24(1):20-3.
21. Solarić M, Fröbe A, Huić D, Zahirović D, Kaštelan Ž, Bulimbašić S, i sur. Smjernice za dijagnosticiranje, liječenje i praćenje bolesnika s rakom prostate. *Liječnički Vjesn*. 2019;141(11-12):313-25.
22. Buyyounouski MK, Choyke PL, McKenney JK, Sartor O, Sandler HM, Amin MB, i sur. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):245-53.

23. Abramović I. Metilacija nestaničnoga DNA gena APC i LGALS3 u krvi i ejakulatu bolesnika s rakom prostate. Zagreb: Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2021.
24. Simpkin AJ, Tilling K, Martin RM, Lane JA, Hamdy FC, Holmberg L, i sur. Systematic review and meta-analysis of factors determining change to radical treatment in active surveillance for localized prostate cancer. *Eur Urol.* 2015;67(6):993-1005.
25. Saoud R, Heidar NA, Cimadamore A, Paner GP. Incorporating prognostic biomarkers into risk assessment models and TNM staging for prostate cancer. *Cells.* 2020;9(9):2116.
26. Sandhu S, Moore CM, Chiong E, Beltran H, Bristow RG, Williams SG. Prostate cancer. *Lancet.* 2021;398(10305):1075-90.
27. Olivas A, Price RS. Obesity, inflammation, and advanced prostate cancer. *Nutr Cancer.* 2021;73(11-12):2232-48.
28. Montironi R, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Cheng L. Prostatic intraepithelial neoplasia: its morphological and molecular diagnosis and clinical significance. *BJU Int.* 2011;108(9):1394-401.
29. Segura-Moreno YY, Sanabria-Salas MC, Varela R, Mesa JA, Serrano ML. Decoding the heterogeneous landscape in the development prostate cancer. *Oncol Lett.* 2021;21(5):376.
30. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(6):1238-60.
31. Vitkin N, Nersesian S, Siemens DR, Koti M. The tumor immune contexture of prostate cancer. *Front Immunol.* 2019;10:603.
32. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, i sur. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2021;7(1):9.
33. Vietri MT, D'Elia G, Caliendo G, Resse M, Casamassimi A, Passariello L, i sur. Hereditary prostate cancer: genes related, target therapy and prevention. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3753.
34. Albany C, Alva AS, Aparicio AM, Singal R, Yellapragada S, Sonpavde G, i sur.

- Epigenetics in prostate cancer. *Prostate Cancer*. 2011;2011:580318.
35. Deng T, Xiao Y, Dai Y, Xie L, Li X. Roles of key epigenetic regulators in the gene transcription and progression of prostate cancer. *Front Mol Biosci*. 2021;8:743376.
 36. Macedo-Silva C, Benedetti R, Ciardiello F, Cappabianca S, Jerónimo C, Altucci L. Epigenetic mechanisms underlying prostate cancer radioresistance. *Clin Epigenetics*. 2021;13(1):125.
 37. Ruggero K, Farran-Matas S, Martinez-Tebar A, Aytes A. Epigenetic regulation in prostate cancer progression. *Curr Mol Biol Reports*. 2018;4(2):101-15.
 38. Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama J V. Epigenetics in breast and prostate cancer. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:425-66.
 39. Simundic AM. Prostata specifični antigen (PSA) - biokemijske osobitosti. *MEDIX*. 2005;11:92-5.
 40. Mihaljević I, Mudri D, Glavaš-Obrovac L, Tucak A. Tumorski markeri karcinoma prostate. *Med Vjesn*. 2009;41(1-2):21-8.
 41. Nogueira L, Corradi R, Eastham JA. Prostatic specific antigen for prostate cancer detection. *Int Braz J Urol*. 2009;35(5):521-9.
 42. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, i sur. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA*. 1993;270(7):860-4.
 43. Matuszczak M, Schalken JA, Salagierski M. Prostate cancer liquid biopsy biomarkers' clinical utility in diagnosis and prognosis. *Cancers*. 2021;13(13):3373.
 44. Moore CK, Karikhalli S, Nazeer T, Fisher HAG, Kaufman RPJ, Mian BM. Prognostic significance of high grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation in the contemporary era. *J Urol*. 2005;173(1):70-2.
 45. Jedinak A, Curatolo A, Zurakowski D, Dillon S, Bhasin MK, Libermann TA, i sur. Novel non-invasive biomarkers that distinguish between benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:259.
 46. Kohaar I, Petrovics G, Srivastava S. A rich array of prostate cancer molecular biomarkers: opportunities and challenges. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):1813.

47. Hatakeyama S, Yoneyama T, Tobisawa Y, Chikara O. Recent progress and perspectives on prostate cancer biomarkers. *Int J Clin Oncol*. 2016;22:214-221.
48. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, i sur. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(4):223-38.
49. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther*. 2019;20(8):1057-67.
50. Chen E, Cario CL, Leong L, Lopez K, Márquez CP, Chu C, i sur. Cell-free DNA concentration and fragment size as a biomarker for prostate cancer. *Sci Rep*. 2021;11(1):5040.
51. Martins I, Ribeiro IP, Jorge J, Gonçalves AC, Sarmento-Ribeiro AB, Melo JB, i sur. Liquid biopsies: applications for cancer diagnosis and monitoring. *Genes*. 2021;12(3):349.
52. Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer*. 2017;16(1):80.
53. Volodko N, Gordon M, Salla M, Ghazaleh HA, Baksh S. RASSF tumor suppressor gene family: biological functions and regulation. *FEBS Lett*. 2014;588(16):2671-84.
54. Mezzanotte JN, Clark GJ. Ras and RASSF effector proteins. In: *Conquering RAS: from biology to cancer therapy*. 2017. p. 3-23.
55. Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci*. 2007;120(18):3163-72.
56. Wong TH, Dickson FH, Timmins LR, Nabi IR. Tyrosine phosphorylation of tumor cell caveolin-1: impact on cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(2):455-69.
57. Raudenska M, Gumulec J, Balvan J, Masarik M. Caveolin-1 in oncogenic metabolic symbiosis. *Int J cancer*. 2020;147(7):1793-807.
58. Pang L, Yang S, Dai W, Wu S, Kong J. Role of caveolin-1 in human organ function and disease: friend or foe? *Carcinogenesis*. 2022;43(1):2-11.
59. Wang S, Wang N, Zheng Y, Zhang J, Zhang F, Wang Z. Caveolin-1: An oxidative stress-related target for cancer prevention. *Oxid Med Cell Longev*.

2017;2017:7454031.

60. Simón L, Campos A, Leyton L, Quest AFG. Caveolin-1 function at the plasma membrane and in intracellular compartments in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2020;39(2):435-53.
61. Wang Z, Wang N, Liu P, Peng F, Tang H, Chen Q, i sur. Caveolin-1, a stress-related oncotarget, in drug resistance. *Oncotarget.* 2015;6(35):37135-50.
62. Campos A, Burgos-Ravanal R, González MF, Huilcaman R, Lobos González L, Quest AFG. Cell intrinsic and extrinsic mechanisms of caveolin-1-enhanced metastasis. *Biomolecules.* 2019;9(8):314.
63. Krsić J, Abramović I, Vrtarić A, Nikolac Gabaj N, Kralik-Ogrić S, Katušić Bojanac A, i sur. Impact of preanalytical and analytical methods on cell-free DNA diagnostics. *Front cell Dev Biol.* 2021;9:686149.
64. Talukdar FR, Abramović I, Cuenin C, Carreira C, Gangane N, Sinčić N, i sur. A protocol for good quality genomic DNA isolation from formalin-fixed paraffin-embedded tissues without using commercial kits. *bioRxiv.* 2021;2021.07.23.452892.
65. Takai E, Totoki Y, Nakamura H, Morizane C, Nara S, Hama N, i sur. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2015;5(1):18425.
66. Vaissière T, Cuenin C, Paliwal A, Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, i sur. Quantitative analysis of DNA methylation after whole bisulfite amplification of a minute amount of DNA from body fluids. *Epigenetics.* 2009;4(4):221-30.
67. Šitum M, Gotovac J, i sur. *Urologija.* 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
68. Wojno KJ, Costa FJ, Cornell RJ, Small JD, Pasin E, Van Criekinge W, i sur. Reduced rate of repeated prostate biopsies observed in ConfirmMDx clinical utility field study. *Am Heal drug benefits.* 2014;7(3):129-34.
69. Amato E, Barbi S, Fassan M, Luchini C, Vicentini C, Brunelli M, i sur. RASSF1 tumor suppressor gene in pancreatic ductal adenocarcinoma: correlation of expression, chromosomal status and epigenetic changes. *BMC Cancer.* 2016;16(1):11.
70. Pallarés J, Velasco A, Eritja N, Santacana M, Dolcet X, Cuatrecasas M, i sur. Promoter

- hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. *Mod Pathol*. 2008;21(6):691-9.
71. Bao Y, Liu X, Liu Y, Wang S, Wu B. Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene regulates progression, migration and invasion of bladder cancer. *Surg Oncol*. 2019;30:63-71.
 72. Peters I, Rehmet K, Wilke N, Kuczyk MA, Hennenlotter J, Eilers T, i sur. RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis. *Mol Cancer*. 2007;6(1):49.
 73. Zuley M, Jarosz R, Drake BF, Rancilio D, Klim A, Rieger-Christ, K., Lemmerman J. The Cancer Genome Atlas Prostate Adenocarcinoma Collection (TCGA-PRAD) (Version 4) [Data set]. *Cancer Imaging Arch*. 2016.
 74. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet*. 2013;45(6):580-5.
 75. UCSC Xena project. [pristupljeno 1.2.2022.]. Dostupno na: <https://xenabrowser.net/>
 76. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep*. 2015;5(1):10775.
 77. Jr W, Neste L, Moses K, Barnswell C, Silberstein J, Jalkut M, i sur. Evaluation of an epigenetic assay for predicting repeat prostate biopsy outcome in African American men. *Urology*. 2018;128:62-65.
 78. Koch A, Joosten SC, Feng Z, de Ruijter TC, Draht MX, Melotte V, i sur. Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(7):459-66.
 79. Ge YZ, Xu LW, Jia RP, Xu Z, Feng YM, Wu R, i sur. The association between RASSF1A promoter methylation and prostate cancer: evidence from 19 published studies. *Tumour Biol*. 2014;35(4):3881-90.
 80. Siegel EM, Riggs BM, Delmas AL, Koch A, Hakam A, Brown KD. Quantitative DNA methylation analysis of candidate genes in cervical cancer. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122495.
 81. Pan J, Chen J, Zhang B, Chen X, Huang B, Zhuang J, i sur. Association between

- RASSF1A promoter methylation and prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(9):e75283.
82. Šestáková Š, Šálek C, Remešová H. DNA methylation validation methods: a coherent review with practical comparison. *Biol Proced Online*. 2019;21(1):19.
 83. Vasiljević N, Wu K, Brentnall AR, Kim DC, Thorat MA, Kudahetti SC, i sur. Absolute quantitation of DNA methylation of 28 candidate genes in prostate cancer using pyrosequencing. *Dis Markers*. 2011;30:151-61.
 84. Do H, Dobrović A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem*. 2015;61(1):64-71.
 85. Rouprêt M, Hupertan V, Catto JWF, Yates DR, Rehman I, Proctor LM, i sur. Promoter hypermethylation in circulating blood cells identifies prostate cancer progression. *Int J Cancer*. 2008;122(4):952-6.
 86. Bastian PJ, Palapattu GS, Yegnasubramanian S, Rogers CG, Lin X, Mangold LA, i sur. CpG island hypermethylation profile in the serum of men with clinically localized and hormone refractory metastatic prostate cancer. *J Urol*. 2008;179(2):525-9.
 87. Haluskova J, Lachvac L, Nagy V. The investigation of GSTP1, APC and RASSF1 gene promoter hypermethylation in urine DNA of prostate-diseased patients. *Bratisl Lek Listy*. 2015;116(2):79-82.
 88. Eggener SE, Berlin A, Vickers AJ, Paner GP, Wolinsky H, Cooperberg MR. Low-grade prostate cancer: time to stop calling it cancer. *J Clin Oncol*. 2022;JCO2200123.
 89. Ahmed H. Promoter methylation in prostate cancer and its application for the early detection of prostate cancer using serum and urine samples. *Biomark Cancer*. 2010;2:17-33.
 90. Drabovich AP, Saraon P, Drabovich M, Karakosta TD, Dimitromanolakis A, Hyndman ME, i sur. Multi-omics biomarker pipeline reveals elevated levels of protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4 in seminal plasma of prostate cancer patients. *Mol Cell Proteomics*. 2019;18(9):1807-23.
 91. Ponti G, Maccaferri M, Micali S, Manfredini M, Milandri R, Bianchi G, i sur. Seminal cell free DNA concentration levels discriminate between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Anticancer Res*. 2018;38(9):5121-5.

92. Mohammed DA, Helal DS. Prognostic significance of epithelial/stromal caveolin-1 expression in prostatic hyperplasia, high grade prostatic intraepithelial hyperplasia and prostatic carcinoma and its correlation with microvessel density. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2017;29(1):25-31.
93. Di Vizio D, Morello M, Sotgia F, Pestell RG, Freeman MR, Lisanti MP. An absence of stromal caveolin-1 is associated with advanced prostate cancer, metastatic disease and epithelial Akt activation. *Cell Cycle.* 2009;8(15):2420-4.
94. Hammarsten P, Dahl Scherdin T, Hägglöf C, Andersson P, Wikström P, Stattin P, i sur. High caveolin-1 expression in tumor stroma is associated with a favourable outcome in prostate cancer patients managed by watchful waiting. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164016.
95. Cui J, Rohr LR, Swanson G, Speights VO, Maxwell T, Brothma AR. Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer. *Prostate.* 2001;46(3):249-56.
96. Wang X, Liu Z, Yang Z. Expression and clinical significance of caveolin-1 in prostate cancer after transurethral surgery. *BMC Urol.* 2018;18(1):102.
97. Kim JW, Kim ST, Turner AR, Young T, Smith S, Liu W, i sur. Identification of new differentially methylated genes that have potential functional consequences in prostate cancer. *PLoS One.* 2012;7(10):e48455.
98. UCSC Xena project [pristupljeno 14.5.2021.]. Dostupno na: <https://xenabrowser.net/>
99. Sanders YY, Liu H, Scruggs AM, Duncan SR, Huang SK, Thannickal VJ. Epigenetic regulation of caveolin-1 gene expression in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;56(1):50-61.
100. Sugie S, Mukai S, Tsukino H, Toda Y, Yamauchi T, Nishikata I, i sur. Increased plasma caveolin-1 levels are associated with progression of prostate cancer among Japanese men. *Anticancer Res.* 2013;33(5):1893-7.
101. Tahir SA, Ren C, Timme TL, Gdor Y, Hoogeveen R, Morrisett JD, i sur. Development of an immunoassay for serum caveolin-1: a novel biomarker for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(10):3653-9.
102. Khemees TA, Yang B, Schultz A, Allen GO, Gawdzik J, Nihal A, i sur. Epigenetic

- field alterations in non-tumor prostate tissues detect prostate cancer in urine. *Am J Clin Exp Urol*. 2021;9(6):479-88.
103. Khier S, Lohan L. Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature. *Futur Sci OA*. 2018;4(4):FSO295.
 104. Skvortsova T, Bryzgunova O, Lebedeva A, Mak V, Vlassov V, Laktionov P. Methylated cell-free DNA in vitro and in vivo. U: Gahan P, ur. *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum*. Dordrecht: Springer; 2011. p. 185-94.
 105. Lepor H, Donin NM. Gleason 6 prostate cancer: serious malignancy or toothless lion? *Oncology (Williston Park)*. 2014;28(1):16-22.
 106. Greytak SR, Engel KB, Parpart-Li S, Murtaza M, Bronkhorst AJ, Pertile MD, i sur. Harmonizing cell-free DNA collection and processing practices through evidence-based guidance. *Clin Cancer Res*. 2020;26(13):3104-9.
 107. Ungerer V, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020;57(7):484-507.
 108. Corbetta M, Chiereghin C, De Simone I, Soldà G, Zuradelli M, Giunta M, i sur. Post-biopsy cell-free DNA from blood: an open window on primary prostate cancer genetics and biology. *Front Oncol*. 2021;11:654140.
 109. Strand SH, Orntoft TF, Sorensen KD. Prognostic DNA methylation markers for prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):16544-76.

11. ŽIVOTOPIS

Lucija Škara rođena je 1991. godine u Zadru. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2013. g. prvo stječe zvanje prvostupnika molekularne biologije, a potom 2016. i zvanje magistre molekularne biologije. Na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2017. g zaposlila se kao stručni suradnik preko programa Hrvatskog zavoda za zapošljavanje „Stručno osposobljavanje za rad bez zasnivanja radnog odnosa“ na određeno vrijeme od 1 godine, a potom 2018. na određeno vrijeme od 4 godine kao asistent za rad na HRZZ projektu „Projekt razvoja karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti” u sklopu kojeg radi svoju doktorsku disertaciju. 2018. godine je upisala poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Do sada je prošla 16 edukacija uglavnom za rad na uređajima (Wes, ddPCR, qPCR, Tecan, CASA Sperm analyzer, laserski mikrodisektor) i statističku obradu podataka te posjeduje niz laboratorijskih vještina. Autorica je sedam objavljenih znanstvenih radova, desetak kongresnih priopćenja te je održala tri pozvana predavanja.