Metilacija nestaničnoga DNA gena APC i LGALS3 u krvi i ejakulatu bolesnika s rakom prostate

Abramović, Irena

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:105:366876

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Irena Abramović

Metilacija nestaničnoga DNA gena *APC* i *LGALS3* u krvi i ejakulatu bolesnika s rakom prostate

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Irena Abramović

Metilacija nestaničnoga DNA gena *APC* i *LGALS3* 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, „Regenerativna i reproduktivna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala“.

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Nino Sinčić

Zahvale:

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Ninu Sinčiću na pomoći i usmjeravanju u izradi doktorske disertacije te na strpljenju i poticanju.

Zahvaljujem suprugu, roditeljima, braći i sestrama što su mi uvijek bili velika potpora i izvor snage i utjehe.

Zahvaljujem kolegicama i kolegi koji su bili voljni pomoći kad god je trebalo.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Anatomija i fiziologija prostate 1
1.2. Rak prostate 3
1.2.1. Etiologija, epidemiologija i čimbenici rizika 3
1.2.2. Klinička slika i dijagnostika 3
1.2.3. Patohistološka analiza 5
1.2.4. Klinički tijek bolesti, terapija i prognoza 8
1.2.5. Molekularni mehanizmi nastanka i razvoja raka prostate 12
1.3. Molekularna dijagnostika 14
1.3.1. Tekućinske biopsije i nestanični slobodni DNA 14
1.3.2. Metilacija DNA 15
1.3.2.1. Pirosekvenciranje 18
1.3.3. Biomarkeri raka prostate 19
1.3.4. Gen *APC* 22
1.3.5. Gen *LGALS3* 24
2. HIPOTEZA 27
3. SVRHA I CILJEVI RADA 28
4. ISPITANICI I METODE 29
4.1. Ispitanici 29
4.2. Prikupljanje i obrada uzoraka 31
4.2.1. Uzorkovanje krvi i ejakulata 31
4.2.2. Obrada i priprema uzoraka tkiva 31
4.3. Izolacija i kvantifikacija cfDNA iz krvne i sjemene plazme 32
4.4. Izolacija gDNA iz parafinskih blokova 35
4.5. Dizajniranje početnica za PCR i pirosekvenciranje 38
4.6. Bisulfitna konverzija izoliranih cfDNA i gDNA 40
4.7. Lančana reakcija polimerazom nakon bisulfitne konverzije 41
4.8. Pirosekvenciranje 42
4.9. Analiza rezultata pirosekvenciranja 44
4.10. Imunohistokemijsko bojanje preparata protutijelima 44

4.11. Analiza imunohistokemijskih preparata 46
4.12. Mjerenje koncentracije Gal-3 u uzorcima tekućinskih biopsija 46
4.13. Statistička obrada podataka 47
5. REZULTATI 48
5.1. Analiza kliničkih i patohistoloških parametara 48
5.2. Analiza metilacije *APC* 48
5.2.1. Analiza metilacije cfDNA gena *APC* u krvnoj plazmi 48
5.2.2. Analiza metilacije cfDNA gena *APC* u sjemenoj plazmi 50
5.2.3. Metilacija cfDNA gena *APC* u tekućinskim biopsijama i kliničke značajke 52
5.2.4. Analiza metilacije gDNA gena *APC* u tkivu 53
5.2.5. Analiza metilacije DNA gena *APC* unutar skupina ispitanika 55
5.2.5.1. Analiza metilacije DNA gena APC unutar skupine ispitanika s rakom prostate….. 55
5.2.5.2. Analiza metilacije DNA gena *APC* unutar skupine ispitanika s BHP-om 56
5.3. Analiza metilacije DNA gena *LGALS3* 58
5.3.1. Analiza metilacije cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj plazmi 58
5.3.2. Analiza metilacije cfDNA gena *LGALS3* u sjemenoj plazmi 60
5.3.3. Metilacija cfDNA gena *LGALS3* u tekućinskim biopsijama i kliničke značajke 63
5.3.4. Analiza metilacije gDNA gena *LGALS3* u tkivu 65
5.3.5. Analiza metilacije DNA gena *LGALS3* unutar skupina ispitanika 67
5.3.5.1. Analiza metilacije DNA gena *LGALS3* unutar skupine ispitanika s rakom prostate….. 67
5.3.5.2. Analiza metilacije DNA gena *LGALS3* unutar skupine ispitanika s BHP-om……. 69
5.4. Analiza kvantifikacije cfDNA 71
5.5. Analiza kvantifikacije Gal-3 u krvnoj i sjemenoj plazmi 72
5.6. Imunohistokemijska analiza proteina APC i Gal-3 u uzorcima tkiva dobivenih od bolesnika s rakom prostate ili BHP-om 73
5.6.1. Imunohistokemijska analiza proteina APC u bioptatima prostate 75
5.6.2. Imunohistokemijska analiza proteina APC u uzorcima radikalne prostatektomije 75
5.6.3. Imunohistokemijska analiza proteina Gal-3 u bioptatima prostate 76
5.6.4. Imunohistokemijska analiza proteina Gal-3 u uzorcima radikalne prostatektomije 77

5.7. Korelacijske analize 78
5.7.1. Korelacijske analize metilacije gDNA i tkivne ekspresije na proteinskoj razini 78
5.7.2. Korelacijske analize koncentracije Gal-3 i prosječne metilacije cfDNA gena *LGALS3* u tekućinskim biopsijama 79
5.7.3. Korelacijske analize prosječne metilacije cfDNA s kliničkim parametrima ispitanika 80
6. RASPRAVA 82
6.1. Metilacija DNA gena *APC* 82
6.2. Ekspresija *APC* na proteinskoj razini 85
6.3. Metilacija DNA gena *LGALS3* 86
6.4. Ekspresija *LGALS3* na proteinskoj razini 90
6.5. Koncentracija Gal-3 u krvi i ejakulatu 92
6.6. Koncentracija i integritet cfDNA u krvi i ejakulatu 93
7. ZAKLJUČAK 95
8. SAŽETAK 96
9. ABSTRACT 97
10. POPIS LITERATURE 98
11. ŽIVOTOPIS 108

Popis oznaka i kratica

AAH - atipična adenomatozna hiperplazija

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

APS - adenozin 5'-fosfosulfat

AR - androgen-receptor

ASAP - atipična proliferacija malih acinusa (engl. *atypical small acinar proliferation*)

ATP - adenozin trifosfat

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

BHP - benigna hiperplazija prostate

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

cfDNA - nestanični slobodni DNA (engl. *cell-free DNA)*

cfi - cfDNA fragmentacijski indeks

ctDNA - cirkulirajući tumorski DNA

CTCs - cirkulirajuće tumorske stanice (engl. *circulating tumor cells*)

DAB - 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid

DRP - digitorektalni pregled

ELISA - enzimski-vezani imunosorbentni test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Gal-3 - galektin-3

gDNA - genomski DNA

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

ISUP - Međunarodno udruženje za urološku patologiju (engl. *International Society for Urological Pathology*)

mpMRI - multiparametrijska magnetna rezonancija

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

np - nije primjenjivo

PAP - prostatna kisela fosfataza

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

PIA - proliferacijska inflamatorna atrofija

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

PSA - prostata-specifični antigen

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

qPCR - kvantitativna lančana rekacija polimerazom (engl. r*eal-time or quantitative polymerase chain reaction*)

RLU - relativne jedinice svjetlosti (engl. *relative light units*)

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

SNP - polimofrizam jednog nukleotida (engl. *single-nucleotide polymorphism*)

TAE - Tris-acetat-EDTA

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

Tris-EDTA - hidroksilmetil aminometan-etilendiamintetraoctena kiselina

TRUZ - transrektalni ultrazvuk

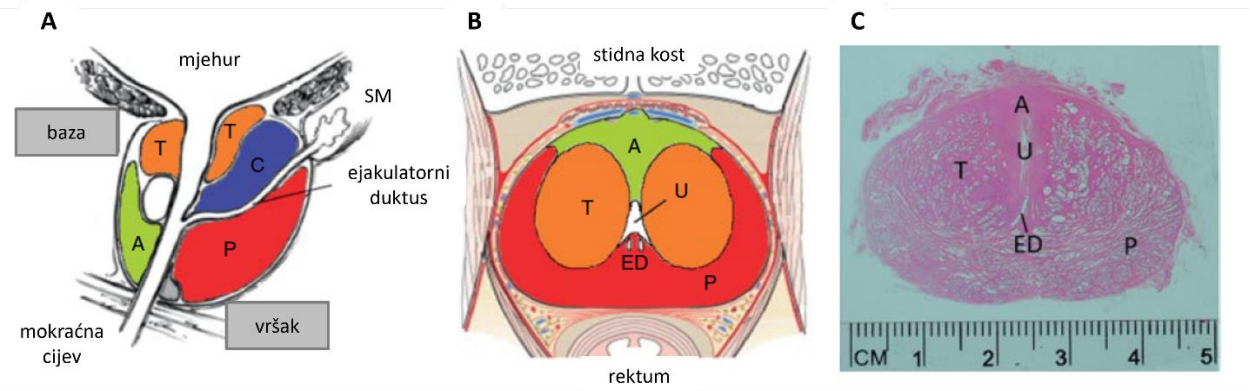
WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

1. UVOD

1.1. Anatomija i fiziologija prostate

Prostata je muška egzokrina žlijezda ovalnog oblika zbog čega se još naziva kestenjača. Nalazi se u zdjelici, na bazi mokraćnog mjehura, iza stidne kosti, a ispred rektuma te okružuje mokraćnu cijev. Veličina prostate odraslog muškarca je otprilike 3 cm duljine, 4 cm širine, 2 cm debljine i težine oko 20 gr-ama. U starijoj životnoj dobi očekuje se porast prostate. Jedna trećina prostate, odnosno njezin vanjski dio, građen je od fibromuskularnog tkiva, dok je unutrašnji dio karakteriziran žljezdanim tkivom. Prostata je prekrivena peri-prostatičnom fascijom, a tanki sloj vezivnog tkiva formira pravu kapsulu. Preko nje nalazi se pseudokapsula koju čini troslojna fascija, prisutna na anteriornoj, posteriornoj i lateralnoj strani prostate. U području njezinog vrška, prostatu podupiru vanjski sfinkter uretre i urogenitalna dijafragma. Baza prostate vezana je prema gore s mokraćnim mjehurom i sjemenim mjehurićima (1).

Prostata se, ovisno o literaturnom izvoru, dijeli na tri ili četiri zone koje su anatomski različite, imaju karakteristične histološke značajke te određenu predispoziciju za maligne ili benigne promjene (Slika 1). To su periferna, prijelazna i središnja zona te prema nekima, prednja vezivno-mišićna stromalna zona ili prednja (anteriorna) fibromuskularna stroma. Periferna zona obuhvaća vanjski stražnji dio prostate s oko 70 % ukupnog volumena žlijezde. Centralna zona čini oko 20 % prostate te okružuje ejakulatorne duktuse koji se spajaju u prostatni dio mokraćne cijevi. Prijelazna zona s udjelom od oko 5 % okružuje mokraćnu cijev. Za ovu zonu je karakterističan rast tijekom starenja, odnosno sklonost promjenama specifičnima za benignu hiperplaziju prostate (BHP). Prednja fibromuskularna zona, izgrađena je od vezivno-mišićnog tkiva te sudjeluje u kontroli mokrenja i otpuštanju prostatnih izlučevina tijekom ejakulacije (1).



Slika 1. Anatomija zdrave prostate. Prostata se dijeli u četiri zone: prijelaznu, centralnu, perifernu i prednju fibromuskularnu zonu. A - Sagitalni presjek kroz prostatu koja pokazuje orijentaciju baze i vrška prostate. B - Aksijalni presjek kroz bazu koji pokazuje blizinu smještaja prostate u odnosu na stidnu kost (anteriorno) i rektum (posteriorno). C - Hemalaun-eozinom (HE) obojen preparat presjeka kroz bazu prostate uklonjene radikalnom prostatektomijom radi raka prostate. T, prijelazna (engl. *transition*) zona; C, centralna zona; P, periferna zona; A, anteriorna fibromuskularna stroma; SM, sjemeni mjehurić; ED, ejakulatorni duktus; U, mokraćna cijev (engl. *urethra*). (Preuzeto i prilagođeno prema *Blandy's Urology, edited by Omar M. Aboumarzouk, Wiley, 2019.* (2)).

Na mikroskopskoj razini, žlijezde koje grade prostatu okružene su bazalnom membranom na kojoj leži sloj kubičnih bazalnih stanica te ponegdje koja neuroendokrina stanica. Slijedi unutarnji sloj luminalnih cilindričnih stanica koje okružuju lumen žlijezde. Luminalne stanice stvaraju i izlučuju prostatnu tekućinu koja doprinosi volumenu ejakulata u iznosu od 40 % (3). Izlučuju također i snažne proteolizne enzime koji likveficiraju sjemeni koagulum, poput prostata-specifičnog antigena (PSA) i prostatne kisele fosfataze (PAP) (2). Luminalne stanice odgovaraju na podražaj androgena odnosno testosterona kojeg izlučuju testisi, androstendiona i dehidroepiandrosterona iz kore nadbubrežne žlijezde te dehidrotestosterona koji nastaje iz testosterona u samoj prostati. Epitel prostate podržan je stromom koja sadrži fibroblaste, stanice glatkih mišića, živce i krvne žile (1). Glavna funkcija prostate je proizvodnja alkalnog sekreta (pH ~ 6) koji uz već spomenute proteolizne enzime PSA i PAP, sadrži cink, citrat i poliamine. Funkcija mu je likvefakcija sjemenog koaguluma (2).

1.2. Rak prostate

1.2.1. Etiologija, epidemiologija i čimbenici rizika

Etiologija raka prostate je slabo razjašnjena, a prepoznati čimbenici rizika na koje se ne može utjecati su dob, etnicitet, obiteljska povijest bolesti uključujući i genetsku predispoziciju. Ostali rizični čimbenici su uvjetovani okolišem i stilom života, poput izloženosti toksinima, prehrane, debljine, infekcija, hormonskog disbalansa i pušenja (4). Rak prostate smatra se bolešću starenja, što su sugerirale autopsijske analize. Naime, pokazale su da gotovo 30 % muškaraca u dobi 50-60 godina ima rak prostate te da taj postotak raste s dobi dosežući čak više od 80 % muškaraca starijih od 80 godina. S obzirom na to da svjetska populacija stari i da se očekivani životni vijek produžuje, posebice u zemljama zapadnog svijeta, rak prostate imat će sve značajniji utjecaj na zdravstvene sustave (2).

Rak prostate predstavlja malignu bolest s najvišom stopom prevalencije među muškom populacijom u svijetu, dok je prema incidenciji drugi, neposredno iza raka pluća (5). Geografski, zemlje Sjeverne Amerike, Europe i Australija imaju najvišu incidenciju, dok je ona znatno manja u manje razvijenim zemljama Afrike i Azije. Značajan rast slučajeva raka prostate bilježi se od 90.-ih godina prošlog stoljeća, što se pripisuje uvođenju testiranja pomoću PSA i sve starijoj svjetskoj populaciji (2). Najnovije brojke upućuju na više od 1,4 milijuna novodijagnosticiranih slučajeva godišnje u svijetu, dok je stopa smrtnosti u laganom padu (5). Prema posljednjem izvještaju Registra za rak Republike Hrvatske za 2016. godinu, prostata je prvi put postala najčešće sijelo raka u hrvatskih muškaraca s 19 % svih slučajeva maligniteta, odnosno nešto više od 2300 slučajeva (6). Dodatno zabrinjava zabilježeni rast smrtnosti muškaraca u Republici Hrvatskoj od raka prostate (7), koji dalje predviđa i Međunarodna agencija za istraživanje raka (8).

1.2.2. Klinička slika i dijagnostika

Otprilike 95 % slučajeva raka prostate čini adenokarcinom koji nastaje iz prostatnih epitelnih stanica i još se naziva „konvencionalnim“ acinarnim tipom (9). Najčešće se radi o spororastućem tumoru koji dugo ostaje ograničen na prostatu s niskim malignim potencijalom. Rani ili lokalizirani rak prostate često ne uzrokuje jasnu kliničku sliku, već biva otkriven uslijed

patološkog nalaza PSA ili digitorektalnog pregleda (DRP). Simptomi raka prostate češće se javljaju ukoliko se tumorsko tkivo nalazi u neposrednoj blizini mokraćne cijevi ili ako je dovoljno veliko pritišće okolne strukture (mokraćni mjehur, rektum). U tom slučaju uzrokuje simptome poput opstrukcije mokraćnog mjehura, oklijevanja mokrenja, slabog mlaza urina, češće potrebe za mokrenjem, osjećaja nepotpunog pražnjenja mjehura nakon mokrenja i nikturije. Lokalno uznapredovali rak prostate može se očitovati simptomima perinealne boli, tenezmima, impotencijom, inkontinencijom, hematurijom i hematospermijom. U slučaju metastaza, najčešće sijelo su kosti pa se bolesnici mogu prezentirati bolovima u kostima, najčešće u području zdjelice i kralježnice te patološkim prijelomima zahvaćenih kostiju.

U Republici Hrvatskoj, u svrhu rane detekcije raka prostate, određivanje serumske koncentracije PSA i provedba DRP su indicirani kod muškaraca starijih od 50 godina. PSA, serinska proteaza sintetizirana u duktusu i acinarnom epitelu prostate, predstavlja biljeg specifičan za organ, ali ne i za rak prostate. Njena serumska koncentracija raste u stanjima poput BHP, prostatitisa i mikrotraumi prostate (DRP, biciklizam). Zbog toga su njezine karakteristike kao biomarkera za rak prostate visoka osjetljivost i niska specifičnost. Naime, i do 70 % pacijenata sa serumskom koncentracijom PSA između 4 i 10 µg/L ima negativan nalaz biopsije na rak prostate (10,11). U većini se slučajeva radi o porastu PSA uslijed BHP prisutne u 50 % muškaraca u 50-im godinama te čak 90 % muškaraca u 80-im godinama (12). Zbog svega navedenog, praćenje vrijednosti PSA uzrokuje velik broj nepotrebnih biopsija opterećujući zdravstveni sustav i uzrokujući nepotreban rizik za bolesnike. Nadalje, uvođenje probira pomoću PSA dovelo je i do tzv. *overtreatment*-a zbog otkrivanja klinički indolentnih oblika raka prostate za koje se pretpostavlja da se nikad ne bi razvili u agresivan oblik niti utjecali na kvalitetu života bolesnika (2). Dodatan opterećujući aspekt su opetovane biopsije uslijed postojano povišene koncentracije PSA i aktivnog nadzora raka prostate. Analiza utjecaja probira pomoću PSA na epidemiološke i kliničke pokazatelje dovela je do zaključka da je PSA testiranje dovelo do češćeg postavljanja dijagnoze i identifikacije lokaliziranog raka prostate bez poznatog utjecaja na kvalitetu života te da nema utjecaja na smanjenje mortaliteta uslijed raka prostate (2). Zbog svega navedenog, iako smatran „zlatnim standardom“, probir na rak prostate pomoću PSA ostaje kontroverzna tema u biomedicinskoj zajednici koja se posljednjih godina znatno usmjerila na pronalazak novih biomarkera.

S obzirom da je prostata dostupna izravnoj palpaciji prstom kroz rektum, DRP predstavlja jednostavnu pretragu koja ima mogućnost široke primjene u dijagnostici i procjeni lokalne proširenosti raka prostate. U većini slučajeva rak prostate se nalazi u perifernoj zoni prostate koja je lako palpabilna pomoću DRP. Međutim, tumor je moguće napipati kad mu je volumen veći od 0,2 mL, dok oni koji su smješteni u centralnoj i prijelaznoj zoni nisu dostupni (13).

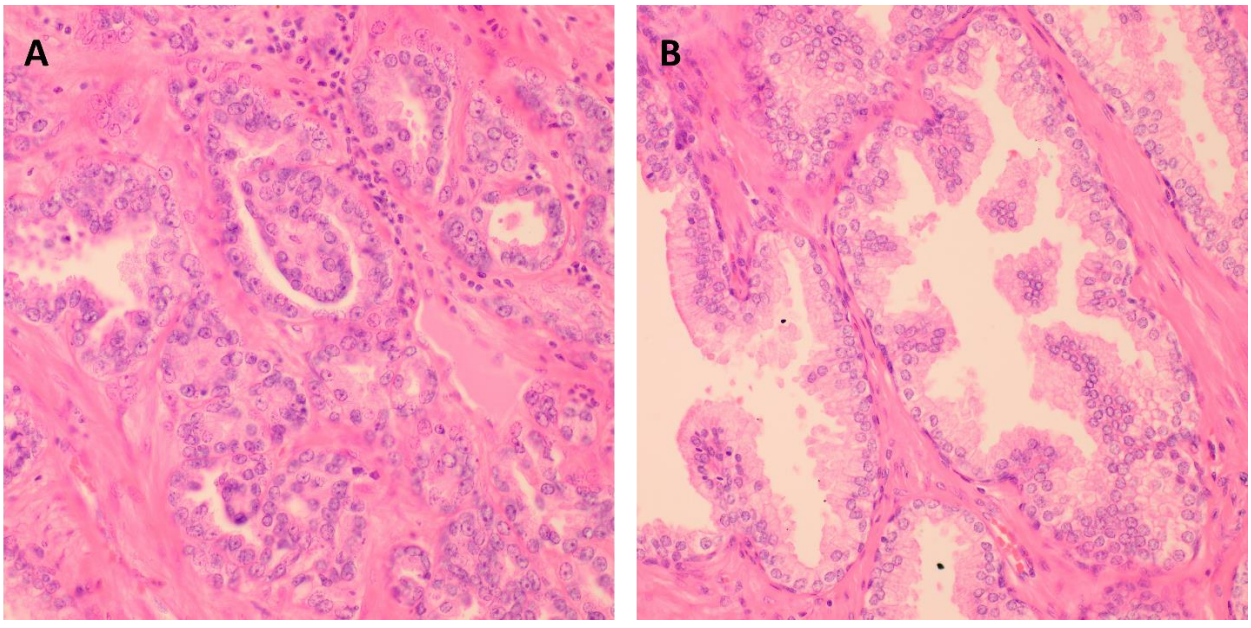
Konačna dijagnoza raka prostate ovisi o patohistološkoj verifikaciji tumora u iglenoj biopsiji prostate, uzorcima transuretalne resekcije ili prostatektomije. Standardna metoda dijagnostike je biopsija pod kontrolom transrektalnog ultrazvuka (TRUZ). Ultrazvukom se ciljaju hipoehogene regije uz provođenje sustavnog uzorkovanja područja bez hipoehogenih lezija na periferiji prostate. TRUZ vođenom biopsijom prostate uzima se 10-12 uzoraka iz periferne zone (korišteni protokol u KBC Zagreb i KBC Sestre milosrdnice podrazumijeva uzimanje 12 cilindara: 6 iz lijevog i 6 iz desnog režnja). Osim tih shematskih standardiziranih biopsija, u slučaju potrebe poput prethodnih multiplih biopsija, provode se ciljane biopsije kada se uzima još dodatnih 6 uzoraka koje se prethodno identificiraju slikovnom tehnikom pomoću multiparametrijske magnetne rezonancije (mpMRI).

1.2.3. Patohistološka analiza

Patohistološka analiza bioptata prostate omogućuje razlikovanje benignih od malignih promjena te dijagnozu i prognozu raka prostate. Benigne promjene uključuju upalne bolesti i hiperplaziju prostate. BHP karakterizira dobroćudno umnažanje i rast žljezdanih, mišićnih i vezivnih stanica prostate, a najčešće zahvaća prijelaznu zonu prostate. BHP je najčešće stromalni proces karakteriziran značajnom hiperplazijom stanica glatkih mišića, što uzrokuje porast omjera strome i epitela (Slika 2) (2).

Patohistološki tip raka prostate je u više od 95 % slučajeva acinarni adenokarcinom, a histološko graduiranje tumora predstavlja važan prognostički faktor o kojem ovisi i izbor terapije. Osnovne histološke i citološke značajke raka prostate su prisutnost sitnih atipičnih žlijezda infiltrativnog rasta, kribriformne formacije žlijezda, atipija jezgre s naglašenim jezgricama, odsutnost bazalnih stanica (Slika 2). Dodatno, mogu se naći intraluminalni plavkasti mucin, intraluminalni kristaloidi, amfofilija citoplazme, hiperkromazija jezgre, retrakcijske pukotine te prostatična intraepitelna neoplazija (engl. *prostate intraepithelial neoplasia*, PIN) u blizini atipičnih žlijezda

(2). PIN je neoplastična proliferacija sekretornih stanica unutar granica postojećih kanala i acinusa, s citološkim promjenama koje nalikuju onima u raku, uključujući nuklearno proširenje i brojne istaknute jezgrice. Bazalni sloj često je diskontinuiran, no nema potpunog gubitka kontinuiteta. Više činjenica upućuje na to da da je PIN vjerojatna preteča raka prostate, poput toga da je prisutan u većoj mjeri u prostatama s rakom, najčešće zahvaća perifernu zonu prostate te PIN i rak prostate eksprimiraju slične biomarkere i dijele mnoge somatske nepravilnosti u genomu (14,15). Osim PIN-a, atipična proliferacija malih acinusa (engl. *atypical small acinar proliferation,* ASAP), proliferacijska inflamatorna atrofija (PIA) i atipična adenomatozna hiperplazija (AAH) se još smatraju mogućim prekursorima raka prostate. Najznačajniji je ASAP, žarišta atipičnih žlijezda koje brojem ili citološkim kriterijima ne udovoljavaju dijagnozi raka prostate. PIA su mala žarišta proliferativnog žljezdanog epitela s morfološkim izgledom jednostavne atrofije uz prisutnost upale, dok je AAH lokalizirana proliferacija malih acinusa koja može imati različite morfološke karakteristike, od kojih su neke karakterizirane stupnjem atipije koji liči na rak. Važno je prepoznati i dijagnosticirati navedene promjena s obzirom na to da je njihova prisutnost povezana s dijagnozom raka prostate u ponovljenim biopsijama (16,17).



Slika 2. Tumorsko (A) i hiperplastično (B) tkivo prostate (HE, x400).

Gradus adenokarcinoma se tijekom posljednjih nekoliko desetljeća određuje prema Gleasonovom sustavu. On se temelji na arhitekturnim obilježjima i izgledu tumorskih žlijezda na malom i

srednjem povećanju svjetlosnog mikroskopa. Prema Gleasonovom sustavu, razlikuje se pet histoloških obrazaca rasta ili gradusa (engl. *Gleason pattern/grade*) koji brojevima od 1 do 5 označavaju stupanj diferenciranosti, čemu 5 označava najmanje diferencirane stanične populacije (Tablica 1). U svakoj biopsiji s rakom prostate određuje se Gleasonov gradus za dva najzastupljenija histološka obrasca (primarni i sekundarni), budući da je pokazano da prognoza raka prostate korelira sa zbrojem dvaju najzastupljenijih komponentni tumora. Zbrajanjem vrijednosti primarnog i sekundarnog obrasca dobije se Gleasonov zbroj (engl. *Gleason score/sum*) koji može biti od 2 do 10, a u praksi je najčešće između 6 i 10. Veći Gleasonov zbroj predstavlja agresivniji rak i veći rizik za bolesnike (18). Osim na biopsijskim uzorcima, Gleasonovi zbrojevi primarnog i sekundarnog gradusa određuju se i na ostalim vrstama uzoraka tkiva prostate poput transuretralne resekcije i radikalne prostatektomije (19).

Tablica 1. Gleasonova klasifikacija raka prostate (2).

Stupanj diferenciranosti	Histološka obilježja
1	Jedna do druge smještene, pravilne, okrugle, podjednake žlijezde. Rubovi tumora jasni.
2	Pojedinačne, odvojene, okrugle, manje podjednake žlijezde, odijeljene stromom za više od promjera žlijezde. Rubovi tumora manje jasni.
3	Pojedinačne žlijezde, nepravilna izgleda s papilarnim kribriformnim oblicima. Rubovi tumora slabo vidljivi
4	Kribriforman način rasta, spojene i pregrađene žlijezde, glomeruloidne formacije. Nema solidnih žarišta.
5	Solidne nakupine, pojedinačne raspršene tumorske stanice i žljezdolike, odnosno kribriformne formacije s komedonekrozom.

S vremenom su uočeni nedostaci, poput toga da je rak s Gleason zbrojem 4 + 3 = 7 znatno agresivniji od 3 + 4 = 7. Razlikovanje ta dva stupnja prepoznato je u novom klasifikacijskom sustavu Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) i Međunarodnog udruženja za urološku patologiju (engl. *International Society for Urological Pathology*, ISUP), koji svrstava karcinome u pet gradusnih skupina (engl. *grade group*s). Prikazane su u Tablici 2, a dopisuju se u nalazu uz postojeći Gleasonov zbroj. Navedeni sustav graduiranja temelji se na Gleasonovom zbroju te bolje predviđa preživljenje nakon radikalne prostatektomije, pri čemu veći broj grupe ukazuje na manju vjerojatnost preživljenja (18).

Tablica 2. Gleasonov zbroj i gradusna grupa. Usporedba Gleasonova zbroja i skupina gradusa prema klasifikaciji SZO-a iz 2016. godine i ISUP-a (2).

Gleasonov zbroj	Gradusna grupa SZO 2016./ISUP
6 (3+3)	**1**
7 (3 + 4)	**2**
7 (4 + 3)	**3**
8 (4 + 4, 3 + 5, 5 + 3)	**4**
9 – 10 (4 + 5, 5 + 4, 5 + 5)	**5**

1.2.4. Klinički tijek bolesti, terapija i prognoza

Rak prostate karakterizira mogućnost vrlo različitog tijeka bolesti. Najčešće se radi o spororastućem, indolentnom tumoru, ali postoji i agresivan oblik pa je zato važno donijeti pravu odluku o načinu liječenja. U odabiru liječenja te prognozi tijeka bolesti, važno je odrediti stadij i procijeniti proširenost raka prostate. Klasifikacija koja se koristi za određivanje stadija i stupnja proširenost je TNM klasifikacija Američkog udruženja za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC). TNM sustav za klasifikaciju raka odnosi se na vrednovanje proširenosti primarnog tumora (T), zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N) i proširenost bolesti na udaljene dijelove tijela (M). Kad se procjenjuje proširenost raka prostate prije početka liječenja,

ono se naziva klinička cTNM klasifikacija, dok se procjena nakon eventualne radikalne prostatektomije s limfadenektomijom naziva patološka pTNM klasifikacija raka prostate (2). Očekivano, one se mogu razlikovati te je patološka točnija od kliničke, ali nije primjenjiva na sve bolesnike budući da radikalna prostatektomija nije uvijek indicirana kao način liječenja. Klinička procjena proširenosti raka prostate prema TNM klasifikaciji prikazana je Tablicom 3. Patološka procjena proširenosti raka ima iste kategorije, izuzev T1 koja se koristi isključivo za kliničku procjenu.

Tablica 3. TNM klasifikacija raka prostate prema 8. izdanju priručnika za stupnjevanje raka izdanog od strane AJCC (20).

Primarni tumor (T)	
Tx	ne može se odrediti postoji li primarni tumor
T0	nema dokaza primarnog tumora
T1	tumor se ne može evidentirati slikovno niti palpirati, moguće otkrivanje iglenom biopsijom
T1a	slučajan histološki nalaz tumora u < 5 % tkiva dobivenog TURP-om
T1b	slučajan histološki nalaz u > 5 % tkiva dobivenog TURP-om
T1c	tumor detektiran iglenom biopsijom indiciranom uslijed povišenog PSA
T2	palpabilan tumor ograničen na prostatu
T2a	tumor zahvaća polovicu jednog lobusa prostate ili manje
T2b	tumor zahvaća više od polovice jednog prostatnog režnja
T2c	tumor zahvaća oba prostatna režnja
T3	tumor probija kapsulu
T3a	tumor probija kapsulu na jednu ili obje strane prostate, ili se proširio na vrat mjehura
T3b	tumor zahvaća sjemene mjehuriće

T4	tumor se proširio na okolne zdjelične organe, poput sfinktera, rektuma, mjehura…
Regionalne metastaze u limfne čvorove (N)	
NX	zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova ne može se procijeniti
N0	regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni
N1	prisutne metastaze u regionalnim limfnim čvorovima
Udaljene metastaze (M)	
Mx	ne može se procijeniti prisutnost udaljenih metastaza
M0	nema udaljenih metastaza
M1	prisutne udaljene metastaze
M1a	metastaze u neregionalne limfne čvorove
M1b	metastaze u kosti
M1c	metastaze u ostala sijela s ili bez zahvaćenosti kosti

U slučaju raka prostate, u određivanju stadija i prognoze, osim TNM klasifikacije, koriste se i vrijednost PSA u trenutku dijagnoze te Gleasonov zbroj nakon biopsije prostate. Prognostički stadiji raka prostate prema posljednjem 8. izdanju priručnika za stupnjevanje raka izdanog od strane AJCC prikazani su u Tablici 4 (20).

Tablica 4. Prognostički stadiji raka prostate prema AJCC (20).

Kad je T…	i N je…	i M je…	i PSA (µg/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	≥ 10, < 20	1	IIA
pT2	N0	M0	≥ 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

Uz gore navedene kriterije za prognozu i odabir liječenja, važni faktori su i očekivano trajanje života bolesnika te njegovo sveukupno zdravstveno stanje. Terapija lokaliziranog raka prostate predstavlja najveći prijepor među kliničarima, zbog nesigurnost u efikasnost različitih modaliteta liječenja. Često lokalizirani rak prostate predstavlja mali rizik za bolesnike pa se kao vid liječenja odabire aktivni nadzor (engl. *active surveillance*) sve do zabilježene progresije bolesti, ukoliko je kod tih bolesnika očekivani životni vijek duži od 10 godina. Lokalizirani rak visokog rizika

zahtijeva operativno liječenje odnosno radikalnu prostatektomiju ili radioterapiju zbog opasnosti od invazije i metastaza. Lokalno uznapredovali rak proširen izvan kapsule prostate, ali bez vidljivih metastaza, liječi se lokalnom radioterapijom, operacijom ili sistemskom hormonskom terapijom, slično kao i metastazni rak. U slučaju pacijenata s očekivanim trajanjem života manjim od 10 godina, katkad se odabire pomno praćenje (engl. *watchful waiting*) gdje je liječenje simptomatsko (2).

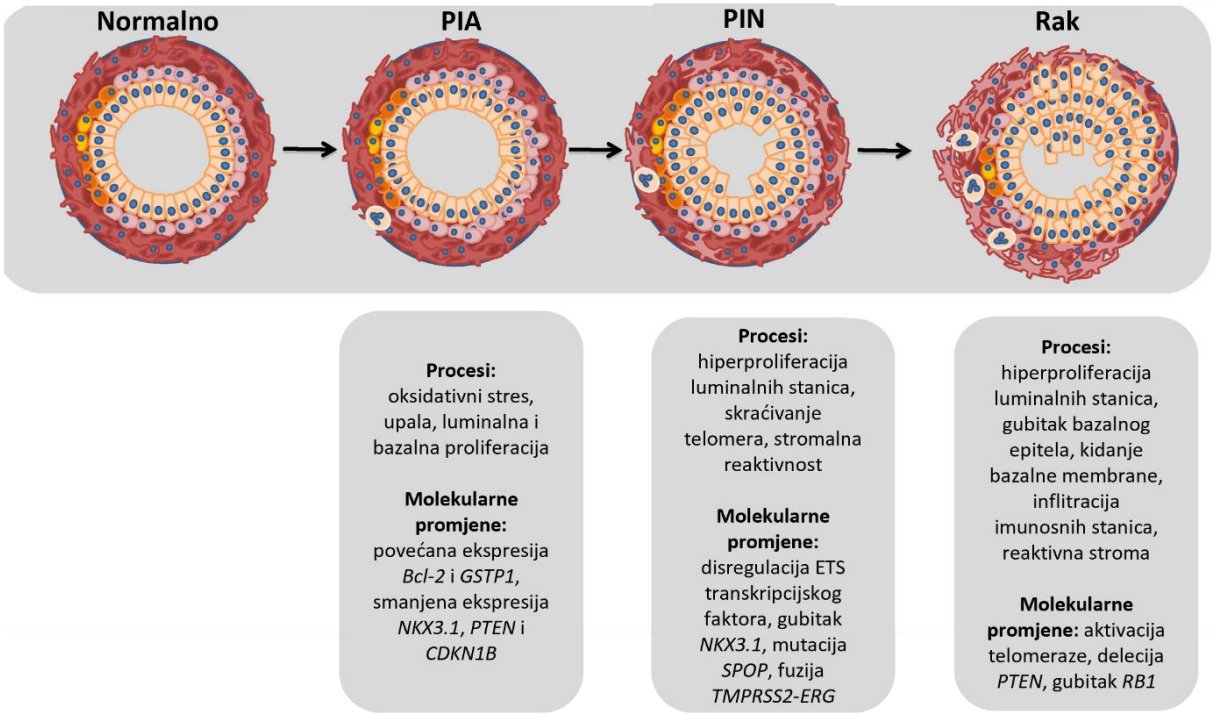
Zbog brojnih vidova prezentacije raka prostate i mogućnosti njegovog razvoja, izazovno je procijeniti najbolju terapijsku opciju za bolesnika, a da se njegova kvaliteta života što manje naruši posebice imajući na umu brojne rizike i nuspojave kirurških i farmakoloških terapija poput erektilne disfunkcije i inkontinencije.

1.2.5. Molekularni mehanizmi nastanka i razvoja raka prostate

Posljednja otkrića u polju istraživanja raka prostate donose uvid u mehanizme nastanka raka prostate uključujući genetičke, okolišne i imunološke čimbenike. Poseban je fokus stavljen na upalne procese kao one koji posreduju u stvaranju tumorskih stanica i progresiji raka prostate (21). U prilog tome govori činjenica da gore spomenute upalne promjene PIA i PIN imaju više genetičkih promjena identičnih onima u raku prostate te se također najčešće javljaju u perifernoj zoni prostate (22). Nije u potpunosti jasno što točno uzrokuje i potiče upalne procese u prostati, ali pretpostavlja se da ulogu imaju infekcije mikroorganizmima, kemijski iritansi, fizička trauma, debljina i prehrana (21). Aktivacija brojnih stanica imunosnog sustava dovodi do aktivacije signalizacije JAK-STAT3-RORɣ signalnog puta koji, između ostalog, aktivira i ciljni gen za androgen-receptor (AR). AR djeluje kao transkripcijski faktor nakon aktivacije vezanjem testosterona i dihidrotestosterona, odnosno kao regulator rasta prostate, a njegova aberantna ekspresija zabilježena je u čak 62 % metastaznih raka prostate otpornih na kastraciju (23). Proizvodnja reaktivnih kisikovih radikala od strane aktiviranih imunosnih stanica dalje pridonosi oštećenju DNA, što vjerojatno inducira starenje stanica (engl. *cellular senescence*) i daljnje upalne reakcije (21). Pretpostavlja se i da oksidacijski stres uzrokuje fuziju gena *TMPRSS2-ERG* u epitelnim stanicama prostate, najčešću genomsku alteraciju u raku prostate koja dovodi do pretjerane ekspresije transkripcijskog faktora ERG. Onkogen ERG je prepoznat kao značajan faktor u razvoju i progresiji raka prostate. Smatra se pokretačem tranzicije iz PIN-a u tumor te

regulatorom stanične pokretljivosti, invazije, epitelno-mezenhimske tranzicije i metastaziranja (24,25).

Osim, fuzije *TMPRSS2-ERG*, najčešće onkogene molekularne promjene u primarnom raku prostate uključuju pretjeranu ekspresiju gena *MYC* (progresija staničnog ciklusa), aktivaciju telomeraze i povećanje ekspresije proupalnog citokina interleukina-6. U okviru gena supresora tumora značajni događaji su delecija gena *PTEN* (heterozigotna delecija zabilježena u oko 40 % primarnih tumora prostate) što rezultira sprečavanjem apoptoze, ali i delecija gena *NKX3.1* (heterozigotna delecija prisutna u i do 85 % raka prostate) koji regulira razvoj epitela prostate (26). Na Slici 3 prikazani su procesi i molekularne promjene do kojih dolazi tijekom razvitka stanice raka prostate, s upalnim stanjima koje prethode (PIA i PIN) (26).



Slika 3. Razvoj raka prostate. Fenotipske, mikrookolišne i molekularne promjene koje nastaju u pre-malignim procesima raka prostate. (Preuzeto i prilagođeno prema *Packer i Maitland, Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res., 2016* (26)).

Osim zabilježenih genomskih aberacija, epigenetički mehanizmi koje uključuju metilaciju DNA, posttranslacijske histonske modifikacije te mikroRNA-regulaciju su također promijenjeni u raku prostate. Utvrđeno je da igraju ulogu u njegovoj incijaciji i progresiji pa bi daljnja istraživanja

mogla uputiti na dublje razumijevanje nastanka i razvoja raka te pružiti mogućnost za identifikaciju i razvoj novih biomarkera (27). Jedan od predloženih mehanizama razlaže da oksidacijski stres uzrokuje mobilizaciju epigenetičkog sustava na mjestu oštećenja DNA, što uključuje DNA metiltransferaze, remodeliranje kromatina i represorske komplekse. Navedeno objašnjava značajnu aberantnu metilaciju DNA i transkripcijsko utišavanje promotorskih regija gena koje je zabilježeno u razvoju, progresiji i metastaziranju raka prostate (28).

Najviše istraživana epigenetička modifikacija u raku prostate je metilacija DNA, odnosno adicija metilne skupine na peti ugljikov atom u citozinskom prstenu posredstvom DNA-metiltransferaze u sekvenci 5'-CG-3' (tzv. CpG dinukleotid). Oko 1 % ljudskog genoma se sastoji od takvih kratkih, gustih CpG sekvenci zvanih CpG otoci koji se uglavnom nalaze na 5'-kraju promotora, neprevedenih regija i prvog egzona ljudskih gena (29). U normalnim stanicama, CpG otoci su uglavnom nemetilirani i povezani uz aktivnu ekspresiju gena. Metilacija DNA u promotorskoj regiji uglavnom promovira epigenetičko utišavanje gena, izravno, blokiranjem aktivatora transkripcije ili posredno putem regrutiranja metilcitozin-vezujućih proteina (30). Stanice raka prostate često imaju aberantnu hipermetilaciju DNA u promotorskoj regiji kao način represije ekspresije gena i održavanja neoplastičnog fenotipa. Ova modifikacija utišava brojne gene supresore tumora s funkcijama hormonske signalizacije, popravka DNA, stanične adhezije, kontrole staničnog ciklusa i apoptoze (29).

1.3. Molekularna dijagnostika

1.3.1. Tekućinske biopsije i nestanični slobodni DNA

Povijest tekućinske biopsije seže u 1869. godinu kada je patolog Thomas Ashworth pokazao postojanje cirkulirajućih tumorskih stanica (engl. *circulating tumor cells*, CTCs), u krvi bolesnika s metastaznim karcinomom (31). Od tada, osim CTCs, kao materijal koji završava u krvi i drugim tjelesnim tekućinama, prepoznate su slobodne nestanične nukleinske kiseline i ekstracelularne vezikule (32). Vezano za rak prostate, istražuju se svi navedeni materijali u različitim tekućinskim biopsijama, posebice u krvi, odnosno serumu i plazmi te urinu. Ejakulat i njegove frakcije tek počinju značajnije biti u fokusu znanstvene zajednice (3).

Najviše istraživana molekula u tekućinskim biopsijama je nestanični slobodni DNA (engl. *cell-free DNA*, cfDNA). Radi se o dvostrukom, fragmentiranom DNA koji najčešće veličinom odgovara nukleosomu s 150 do 200 parova baza. Prisutnost cfDNA u ljudskoj krvi prvi su opisali Mandel i Metais 1948. godine, a kasnije je pronađena i u ostalim tjelesnim tekućinama u koje dospijeva uslijed nekroze, apoptoze ili aktivne sekrecije stanica (33). Pokazano je da većina plazmatskog cfDNA kod zdravih osoba potječe iz hematopoetskih stanica. Brojna fiziološka (fizička aktivnost, trudnoća) i patološka stanja (infarkt miokarda, različite traume, rak i drugih bolesti) također dovode do otpuštanja dodatnog cfDNA u perifernu cirkulaciju (34). Poluvrijeme eliminacije cfDNA iz krvi iznosi između 16 min i 2,5 h, prema različitim izvorima, a proces je posredovan aktivnošću enzima DNaze-1, ekskrecijom urinom te eliminacijom u jetri i slezeni putem degradacije makrofagima (35).

Brojna istraživanja novih biomarkera za različite karcinome temelje se na analizi tkiva dobivenih invazivnim kirurškim metodama, što nije uvijek dostupno. Zbog svoje neinvazivne prirode, lake dostupnosti i potencijalno specifičnosti za pojedini tumor, istraživanje cfDNA je značajno područje u dijagnostici, prognostici i praćenju karcinoma. Nekoliko testova cfDNA iz tekućinskih biopsija, prvenstveno krvi, već postoji na tržištu u svrhu dijagnostike tumor-specifičnih mutacija i metilacijskog statusa određenih gena (34). Naime, frakcija cfDNA koja dolazi od tumora, zvana cirkulirajući tumorski DNA (ctDNA) može sadržavati tumor-specifične promjene poput mutiranih gena supresora tumora ili onkogena, mikrosatelitske nestabilnosti i metilacije DNA. Već je sama promjena koncentracije cfDNA u krvi i njenim frakcijama predložena kao biomarker za određene karcinome s obzirom na to da kod zdravih osoba obično iznosi do 10 ng/mL plazme, a kod oboljelih i do 1000 ng/mL, s prosjekom oko 180 ng/mL. Zabilježeno je također, da veličina i stadij tumora koreliraju s koncentracijom cfDNA pa su najveće količine pronađene kod pacijenata s metastazama (34).

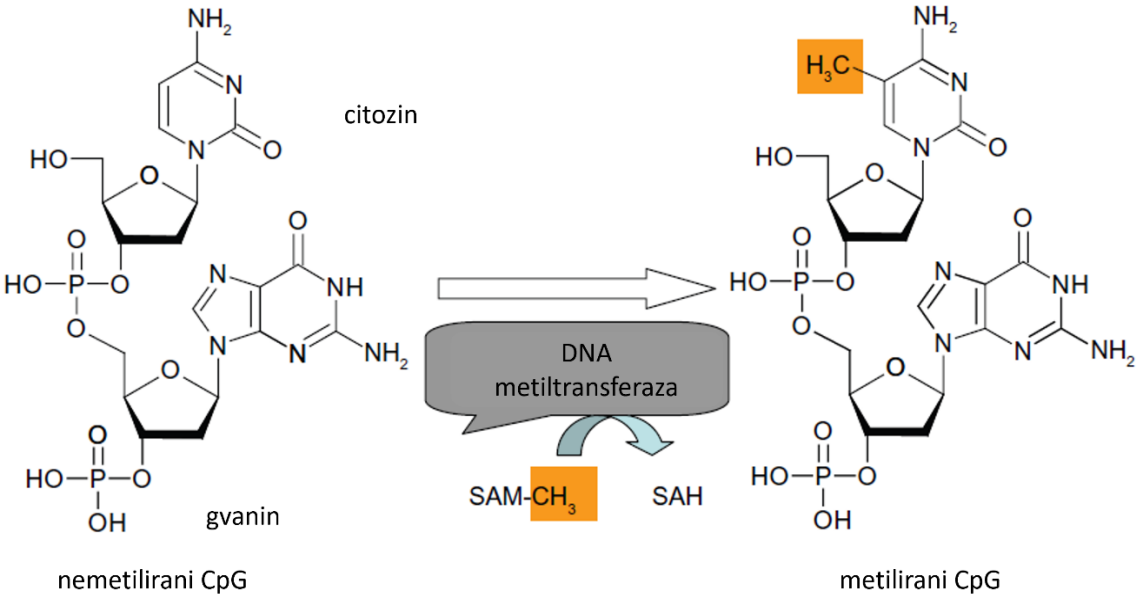
1.3.2. Metilacija DNA

Metilacija DNA predstavlja jednu od epigenetičkih modifikacija, odnosno nasljednu promjenu koja utječe na ekspresiju gena, ali se za razliku od genetičke modifikacije ne očituje kao promjena u sekvenci DNA. U sisavaca, epigenetička mašinerija se sastoji od tri glavna procesa: metilacije DNA, posttranslacijskih modifikacija histona i nekodirajućih RNA. Kao što je već

spomenuto, metilacija DNA jest najispitivanija epigenetička modifikacija čiji je promijenjen obrazac prepoznat u brojnim patološkim stanjima ljudskog organizma. Prepoznato je da je metilacija DNA važan faktor u razvoju i progresiji raka. Naime, promjene u metilaciji DNA mogu dovesti inaktivacije regulatora staničnog ciklusa, apoptoznih gena, enzima koji popravljaju DNA i brojnih drugih gena što dovodi do nekontrolirane proliferacije stanica (36).

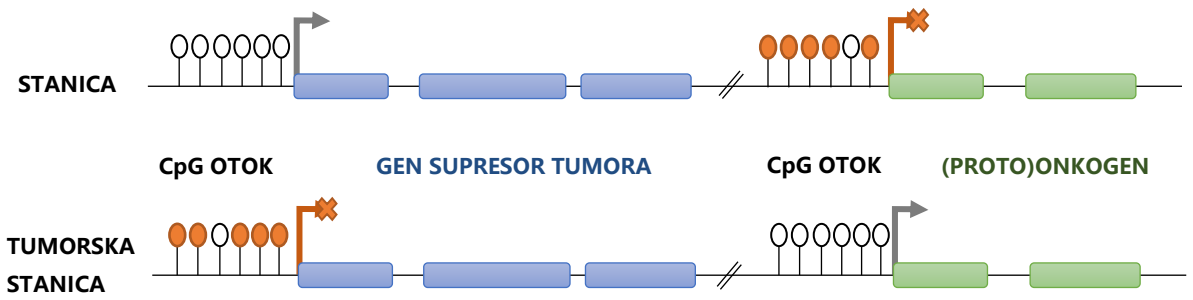
Metilacija DNA je prva otkrivena epigenetička modifikacija, a radi se o katalitičkoj adiciji metilne skupine (-CH) posredstvom enzima DNA-metiltransferaze (DNMT) s S-adenozilmetionina na ugljikov atom na petoj poziciji citozinskog prstena u CpG dinukleotidu, pri čemu nastaje 5-metil citozin (Slika 4). Proces metilacije DNA kataliziran je enzimima DNMT3a i DNMT3b kad se radi o *de novo* metilaciji DNA tijekom embrionalnog razvoja, čime nastaju obrasci metilacije DNA specifični za određeno tkivo (37). Metilacija DNA je ograničena na citozine unutar dinukleotidnog CpG slijeda, a otprilike 80 % svih CpG dinukleotida u ljudskom je genomu metilirano. CpG dinukleotidi u bilo kojoj genomskoj regiji dužoj od 200 pb s visokim sadržajem gvanina i citozina (> 55 %) nazivaju se CpG otoci. Oni igraju važnu ulogu u razvoju, ali i bolesti na način da se ponašaju kao transkripcijski regulatorni elementi u genomu kontrolirajući ekspresiju ubikvitarno eksprimiranih gena. U čovjeka su uočeni u barem 50 % promotorskih regija gena, a metilacija u CpG otocima čini gotovo 90 % ukupne metilacije DNA. Osim u promotorima, regije bogate CpG-ovima nalaze se u satelitskim sekvencama, repetitivnim elementima i nerepetitivnim intergenskim sekvencama

(36).



Slika 4. Mehanizam metilacije DNA. Metilacija citozina u CpG dinukleotidu unutar molekule DNA katalizirana DNA metiltransferazama uz S-adenozilmetionin kao donor metilne skupine. (Preuzeto i prilagođeno prema *Ahmed H., Biomark Cancer, 2010* (38)).

Metilacija DNA regulira transkripciju na način da onemogućava pristup transkripcijskih faktora molekuli DNA u području genskog promotora, zbog čega ne dolazi do formiranja inicijacijskog transkripcijskog kompleksa. Kod stanica raka, CpG otoci u promotorskim regijama su aberantno metilirani na način da su utišani geni supresori tumora, a protookogeni su aktivirani (Slika 5). Tumorske stanice najčešće sadrže obrazac globalne hipometilacije repetitivnih elemenata i kodirajućih regija gena, s hipermetilacijom gena supresora tumora i hipometilacijom onkogena (36). Metilacija DNA istražuje se kao potencijalni biomarker za brojna patološka stanja ljudskog organizma, a posebice razne maligne bolesti (39,40). Prednosti metilacije DNA kao biomarkera su visoka frekvencija, izrazita kemijska i biološka stabilnost, moguća detekcija u uzorcima dobivenih tekućinskim biopsijama, specifičnost za određenu vrstu stanica te jednostavna detekcija standardiziranim metodama (37).



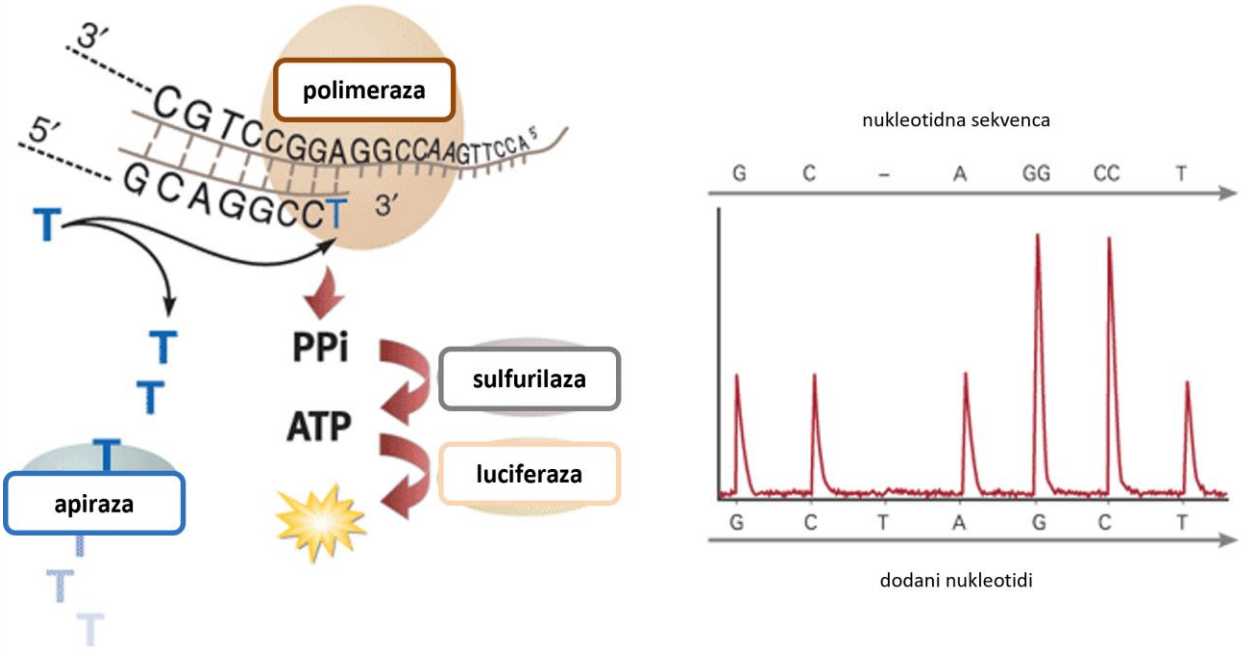
Slika 5. Usporedba metilacije DNA CpG otoka u normalnoj i tumorskoj stanici. U zdravoj stanici nemetilirani su CpG otoci u promotorskoj regiji gena superesora tumora, a metilirani su kod (proto)onkogena. U tumorskoj stanici situacija je obrnuta pa dolazi do utišavanja gena supresora tumora i povećane ekspresije (proto)onkogena.

1.3.2.1. Pirosekvenciranje

Danas su dostupne brojne kvalitativne i kvantitativne tehnike za analizu metilacije DNA. Variraju od onih lokus-specifičnih, poput lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju (engl. *methylation-specific polymerase chain reaction*, MSP), njene kvantitativne inačice (qMSP), bisulfitnog sekvenciranja genoma, pirosekvenciranja, itd., do cjelogenomskih metoda (engl. *genome-wide techniques*), od kojih je najpoznatiji i najkorišteniji *Infinium Methylation Assay* (Illumina) koji kvantitativno analizira metilaciju >850 000 CpG dinukleotida (36,41).

Pirosekvenciranje predstavlja robusnu i široko dostupnu metodu analize metilacije DNA, a radi se o bioiluminometrijskoj metodi sekvenciranja DNA koja se temelji na principu sekvenciranja sintezom *de novo*. Osim za analizu metilacije DNA, koristi se i za detekciju mutacija te analizu polimorfizama jedne baze (engl. *single-nucleotide polymorphisms*, SNP). Bisulfitno konvertirani i PCR-om umnoženi DNA produkti su biotinilirani zahvaljujući jednoj od početnica koja je obilježena biotinom. Preko biotina se vežu na streptavidin na sefaroznim kuglicama. Daljnja reakcija odvija se u uređaju, tzv. pirosekvenceru, pri čemu se odvija sinergistička aktivnost DNA polimeraze, ATP-sulfurilaze, luciferaze i apiraze. Naime, u reakciju se ubacuje jedan po jedan nukelotid, a ukoliko se ugradi u molekulu DNA, oslobađa se ekvimolarna količina pirofosfata. Posljedično, iz pirofosfata nastaje proporcionalna količina ATP-a (adenozin trifosfata) pomoću ATP-sulfurilaze u prisutnosti APS-a (adenozin 5'-fosfosulfata). Nastali ATP potiče konverziju luciferina u oksoluciferin djelovanjem luciferaze, što dovodi do oslobađanja svjetla koje je proporcionalno količini nastalog ATP-a. Kvantifikacija nastalog svjetlosnog signala je vidljiva

kao signal na pirogramu. Nukleotidi koji se ne ugrade u DNA se razgrađuju pomoću enzima apiraze. Prikaz reakcije pirosekvenciranja nalazi se na Slici 6. Pokazalo se da pirosekvenciranje ima prednost nad drugim suvremenim metodama analize metilacije DNA, posebno na temelju dobre rezolucije nukleotidnih baza, analize metilacije pojedinačnog CpG mjesta, a dodatna je prednost inherentna kontrola bisulfitne konverzije (42,43).



Slika 6. Princip pirosekvenciranja. (Prilagođeno i preuzeto od *Whiteford N., String Matching in DNA Sequences: Implications for Short Read Sequencing and Repeat Visualisation, Ph.D. thesis, University of Southampton, 2007,* (44)).

1.3.3. Biomarkeri raka prostate

Prilikom odabira biomarkera u području onkologije njegove karakteristike koje se razmatraju su mogućnost rane detekcije i smanjenja pretjerane dijagnoze (engl. *over-diagnosis*), procjena odgovora na terapiju, procjena stadija te probir pacijenata za određenu terapiju. Biomarkeri se najčešće klasificiraju prema njihovoj uporabi, a u području raka prostate od posebnog su interesa biomarkeri za probir i ranu detekciju. Uz manjkavosti PSA definirane u odlomku 1.2.2., područje dijagnostike raka prostate ostaje zakinuto za specifičan biomarker koji će omogućiti ranu

detekciju te razlikovanje maligne od benigne bolesti raka prostate. Idealan biomarker uz visoku specifičnost posjeduje i visoku osjetljivost, jednostavan je za korištenje, reproducibilan, ima dobar omjer cijene i učinkovitosti te je kvantitativno mjerljiv u lako dostupnom uzorku (45). Zbog svega navedenog, u kratkom vremenu su objavljena brojna istraživanja u području tekućinskih biopsija, odnosno potrage za novim biomarkerima u uzorcima krvi i urina. Na tržištu su dostupni različiti biomarkeri iz tekućinskih biopsija za rak prostate, i biokemijski i molekularni. Koriste se za dijagnozu, prognozu i stratifikaciju rizika. Dostupni su uglavnom samo na američkom tržištu. Biokemijski se uglavnom temelje na kvantifikaciji različitih oblika molekule PSA iz kojih se pomoću algoritama izračunava rizik ili vjerojatnost da se radi o raku. Molekularni biomarkeri su raznovrsni, neki analiziraju po svega nekoliko gena, dok drugi i po 30-ak (Tablica 5). Zanimljivo je da je prvi epigenetički biomarker pod nazivom ConfirmMDx (MDxHealth, Inc, SAD) od nedavno također na raspolaganju kliničarima kao pomoć u procjeni kolika je vjerojatnost raka kod pacijenata s negativnom biopsijom. Radi se o analizi metilacije DNA gena *GSTP1, APC* i *RASSF1* u uzorku bioptata. Trenutne brojke govore o visokoj vrijednosti od 88 % za negativnu prediktivnu vrijednost (45). Osim ovog, mnogi ostali testovi za biomarkere koji su dostupni na tržištu, namijenjeni su muškarcima koji imaju povijest negativne biopsije na rak prostate. Prikaz dostupnih testova za biomarkiranje raka prostate, biokemijskih i molekularnih, tkivnih i onih iz tekućinskih biopsija, nalazi se u Tablici 5.

Tablica 5. Prikaz dostupnih biomarkera za rak prostate. (Preuzeto i prilagođeno prema *Abramovic i sur., Epigenomics, 2020* (46)).

TEST/ESEJ	KOMPONENTE	TIP UZORKA	INDIKACIJA/KLINIČKA KORISNOST
4K Score	fPSA, tPSA, intaktni PSA, kalikreinu slična peptidaza 2 (hk2)	krv (plazma)	Dijagnoza pri inicijalnoj biopsiji ili rebiopsiji (povijest negativnih biopsija)
PHI (Prostate Health Index)	proPSA, fPSA, tPSA	krv (serum)	dijagnoza, prognoza, inicijalna biopsija

Prostarix Risk Score	Metaboliti vezani uz rak prostate: sarkozin, alanin, glicin, glutamat	urin	Stratifikacija rizika od raka u "sivoj zoni" - sumnjiv nalaz DRP i serumski PSA 2,5-10 µg/L
ProMark	proteomička platforma s 12 biomarkera	tkivo (RP)	radikalna prostatektomija, stratifikacija rizika od raka
Mi-Prostate Score	serumski PSA, urinarni PCA3 i T2-ERG mRNA	krv (serum), urin	dijagnoza, prognoza, inicijalna biopsija
PCA 3 (Progensa)	PCA3/PSA mRNA omjer x 1000	urin	dijagnoza pri rebiopsiji (povijest negativnih biopsija)
ExoDx Prostate Intelliscore	egzosomalna mRNA (T2-ERG, PCA3, SPDEF)	urin	dijagnoza, inicijalna biopsija
Confirm MDx	metilacija DNA gena RASSF1, GSTP1 i APC	tkivo (biopsija)	dijagnoza pri rebiopsiji (povijest negativnih biopsija)
SelectMDx	HOXC6, DLX1, KLK3 mRNA	urin	dijagnoza, prognoza, inicijalna biopsija
Decipher GC (GenomeDx)	panel od 22 gena	tkivo (RP)	radikalna prostatektomija, bolesnici na aktivnom promatranju koji primaju terapiju
Oncotype Dx genomic prostate score (GPS)	12 gena vezanih uz rak + 5 referentnih gena	tkivo (biopsija)	stratifikacija rizika od raka, bolesnici na aktivnom promatranju

Prolaris CCP Score	31 gena vezanih uz rak uključenih u stanični ciklus + referentnih gena	tkivo (biopsija ili RP)	stratifikacija rizika od raka, bolesnici na aktivnom promatranju
TMPRSS2:ERG fusion gene	TMPRSS2:ERG mRNA u odnosu na PSA mRNA	urin	rebiopsija

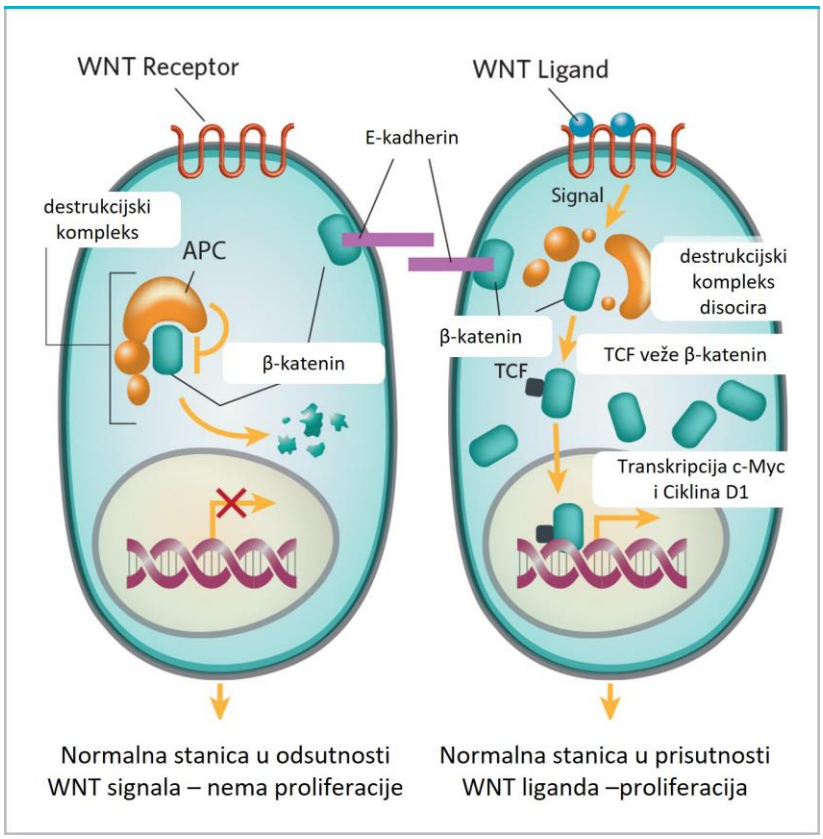
Istraživanja novih biomarkera za rak prostate snažno su zahvatila i polje epigenetike, ali većinom područje mikroRNA, dok je područje metilacije DNA znatno manje zastupljeno. Međutim, postoje i radovi u prilog metilaciji cfDNA izoliranoj iz krvi i urina kao potencijalnom dijagnostičkom i prognostičkom biomarkeru za rak prostate (47,48). Naime, velik broj radova koji upućuju na promjenu metilacije DNA u uzorcima karcinomskog tkiva u odnosu na okolno tkivo ili tkivo BHP-a (49,50) dao je zamah istraživanju u uzorcima tekućinskih biopsija. No, metilacija cfDNA u raku prostate još uvijek većinom predstavlja područje koje tek treba istražiti i ispitati njegov potencijal, a zatim moguće biomarkere potvrditi u velikim multicentričnim studijama. Trenutno, kao glavni uzroci odgađanja kliničke implementacije biomarkera temeljenih na metilaciji DNA se navode metodološke i eksperimentalne poteškoće u bazičnim i translacijskim istraživanjima (37).

1.3.4. Gen *APC*

Gen *Adenomatous polyposis coli (APC)* je gen supresor tumora koji kodira za protein APC veličine 312 kDa s brojnim staničnim ulogama, lokaliziran u više staničnih odjeljaka. Njegova kromosomska lokacija je 5q21-22, a gen se sastoji od 15 kodirajućih koji kodiraju za protein s više funkcijskih domena i 3 nekodirajuća egzona (51). Gen *APC* je prvotno identificiran kao patogeni gen u obiteljskoj adenomatoznoj polipozi (engl. *familial adenomatous poylposis*, FAP), autosomno dominatnoj nasljednoj bolesti karakteriziranoj brojnim crijevnim polipima. Ubrzo se pokazalo da *APC* ima važnu ulogu u brojnim drugim tumorima (52).

Najbolje istražena i poznata funkcija proteina APC je negativna regulacija signalnog puta Wnt (engl. *Wing-less-type*). U njemu sudjeluje tako da ulazi u interakciju s β-kateninom u citoplazmi

(Slika 7), potičući njegovu fosforilaciju, ubikvitinaciju i posljednično proteolitičku degradaciju. Na taj način APC onemogućuje vezanje β-katenina za transkripcijska mjesta i aktivaciju ekspresije gena odgovornih za proliferaciju, preživljenje i održavanje nediferenciranog staničnog stanja (53). Prepoznato je da su poremećaji u balansu ovog signalnog puta osnova za nastanak kolorektalnog karcinoma te da su mutacije u genu *APC* prisutne u velikog broja oboljelih (51). APC također ima ulogu u razdvajanju kromosoma i osiguravanju stanične polarnosti i migracije, što čini izravnom interakcijom s mikrotubulima preko C-terminalnog kraja (51,54). Dodatno, APC kontrolira stanični ciklus regulacijom tranzicije iz G1 faze u S fazu staničnog ciklusa tako što blokira ulazak ili progresiju S faze (53).



Slika 7. Uloga proteina APC u Wnt signalnom putu. (Preuzeto i prilagođeno prema *https://targetedcancercare.massgeneral.org/My-Trial-Guide/Diseases/Colorectal-Cancer/APC.aspx* (55)).

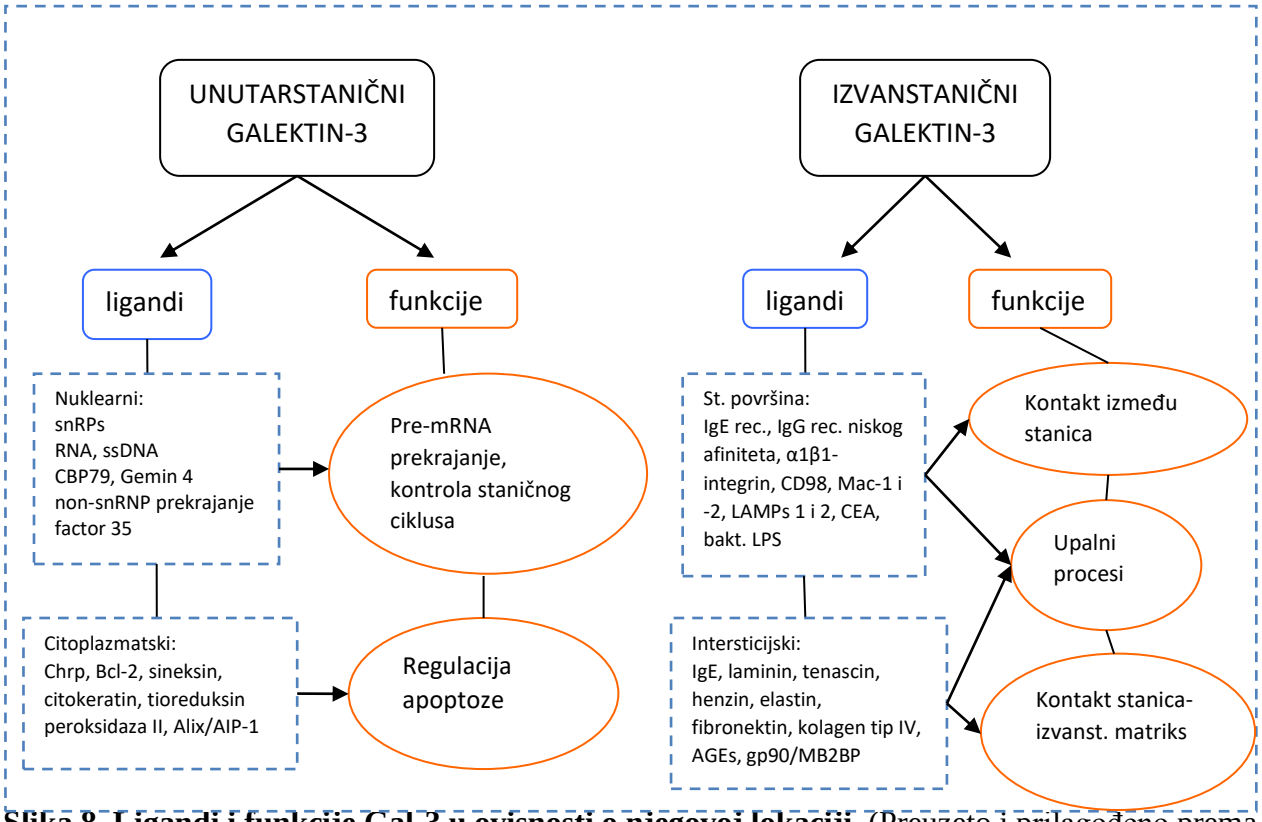
Hipermetilacija DNA u promotoru gena *APC* zabilježena je u brojnim tumorima, od kolorektalnog i gastrointestinalnih tumora do tumora dojke, prostate i bubrega, a povezana je s gubitkom ekspresije gena *APC* (52,56–59). U nekim od njih hipermetilacija je povezana s

naprednijim stadijima raka, smanjenim preživljenjem i većom smrtnosti (52). Tijekom razvoja raka prostate utvrđeno je postojanje kontinuirane hipermetilacije DNA, a njen status korelira s kliničko-patološkim varijablama, poput stadija i gradusa tumora te prognoze (60). Usporedba tkivne metilacije pokazala je hipermetilaciju DNA u tumorskom tkivu u odnosu na tkivo BHP-a i HGPIN-a (49,50,60–62). Potvrda korisnosti metilacije DNA gena *APC* kao biomarkera za rak prostate očituje se u njegovoj uključenosti u dijagnostički panel ConfirmMDx razvijen za potrebe procjene rizika od raka prostate kod pacijenata s negativnim rezultatom biopsije (46).

1.3.5. Gen *LGALS3*

Gen *LGALS3* (engl. *lectin, galactoside-binding, soluble, 3*) nalazi se na kromosomu 14 i kodira za protein iz obitelji galektina molekulske mase 29-32 kDa, galektin-3 (Gal-3). Galektini čine obitelj od 15 poznatih proteina u sisavaca, lektina koji putem putem evolucijski konzervirane domene (engl. *carbohydrate recognition domain*, CRD) prepoznaju i vežu β-galaktozidne ostatke (63). Prema organizaciji CRD, Gal-3 spada u skupinu kimernih galektina. Uz jednu CRD, koja je odgovorna za lektinsku aktivnost, Gal-3 sadrži N-terminalnu domenu (ND) veličine 110-130 ak bogatu prolinskim i glicinskim ostacima. ND je također odgovorna za biološku aktivnost Gal-3 jer omogućuje stvaranje multimera (homodimera i homopentamera), interakciju s drugim proteinima, sekreciju i dr. (64) Gal-3 je supstrat prostatnog specifičnog antigena (PSA) u sjemenoj tekućini i prostasomima (65,66).

Ligandi Gal-3, njegova funkcija i procesi u kojima sudjeluje ovise o njegovoj lokalizaciji. Ona je primarno citoplazmatska, ali nalazi se i u jezgri, na staničnoj površini, u izvanstaničnom prostoru te u tjelesnim tekućinama. Nuklearno lokalizirani Gal-3 regulira transkripciju i prekrajanje pre-mRNA (67), a citoplazmatski kontrolira stanični ciklus i preživljavanje stanice inhibirajući apoptozu (68). Izvanstanični Gal-3 posreduje u staničnoj signalizaciji, aktivaciji, adheziji te regulira interakcije među stanicama i stanice s izvanstaničnim matriksom. Vrlo važnu ulogu Gal-3 ima u imunosnom odgovoru u kojem je njegovo djelovanje najčešće proupalno (63). Gal-3 također sudjeluje u procesima fibroze, angiogeneze, kardiovaskularnom remodeliranju i progresiji tumora. Pregled liganada i funkcija Gal-3 s obzirom na njegovu lokaciju nalazi se na Slici 8.



Slika 8. Ligandi i funkcije Gal-3 u ovisnosti o njegovoj lokaciji. (Preuzeto i prilagođeno prema *Iacobini i sur., JASN, 2003,* (69))

Uloga Gal-3 u raku je uglavnom poticanje progresije karcinoma preko regulacije stanične proliferacije, maligne trasnformacije, angiogeneze, migracije, invazije, metastaziranja i izbjegavanja prepoznavanja tumora od strane imunosnog sustava (70). Neki od prepoznatih pro-tumorskih mehanizama Gal-3 uključuju o ligandnu neovisnu aktivaciju receptora 2 za vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor receptor 2*, VEGFR2), interakciju s produktom onkogena GTPazom H-RAS (onkoprotein), vezanje za ekstracelularne proteine i integrine što potiče staničnu migraciju i invaziju, regulacija β-kateninskog Wnt i Hedgehog signalnog puta, i dr. Aberantna ekspresija Gal-3 zabilježena je u više od 80 % ljudskih tumora, a uglavnom se radi o povećanoj ekspresiji (70).

U slučaju raka prostate, pokazalo se da je ekspresija Gal-3 snižena na proteinskoj i mRNA razini u tumorskim stanicama u usporedbi sa zdravim tkivom ili ONT (71,72) te da je uzrok metilacija DNA promotora (73). No, čini se da Gal-3 ima dvostruku ulogu u raku prostate, ovisno o njegovoj staničnoj lokalizaciji. Dok se količina Gal-3 u tumoru smanjuje tijekom progresije raka

prostate, istovremeno je zabilježena povećana ekspresija u citoplazmi tumorskih stanica. Stoga je pretpostavka da dok citoplazmatski Gal-3 potiče razvoj tumora, nuklearno locirani Gal-3 ima antitumorsku aktivnost (70). Istraživanja također pokazuju da metilacija DNA i ekspresija gena *LGALS3* u raku prostate ovise o njegovom stadiju. Rani stadiji raka prostate pokazuju značajnu hipermetilaciju promotora gena *LGALS3* i smanjenu ekspresiju u odnosu na zdravo tkivo prostate (74,75), s oko 10 %-tnom učestalošću ekspresije naspram 52 % u naprednijem stadiju raka (71). Pretpostavka je da utišavanje gena *LGALS3* putem metilacije DNA onemogućuje interakciju Gal-3 s prostatičnim supresorom tumora NKX3.1, što dovodi do proliferacije tumorskih stanica (73). U naprednijim stadijima raka prostate metilacija DNA promotora gena *LGALS3* nije bila značajna, dok u normalnom i BHP tkivu je pokazana njena gotovo potpuna odsutnost (74). Stoga, metilacija DNA *LGALS3* predstavlja dinamičnu i aktivnu komponentu u razvoju raka prostate koja zahtijeva daljnje istraživanje kako bi se ispitao njezin biomarkerski potencijal.

2. HIPOTEZA

Promotorske regije gena *APC* i *LGALS3* u cfDNA izoliranom iz krvi i ejakulata hipermetilirane su kod bolesnika s ranim stadijima raka prostate u odnosu na bolesnike s benignom hiperplazijom prostate.

3. SVRHA I CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

Utvrditi obrazac i stupanj metilacije promotorske regije gena *APC* i *LGALS3* u cfDNA izoliranom iz krvi i ejakulata kod bolesnika s ranim stadijima raka prostate i bolesnika s BHP.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Odrediti obrazac i stupanj metilacije DNA promotorskih regija gena *APC* i *LGALS3* u cfDNA izoliranom iz krvne i sjemene plazme kod pacijenata s ranim stadijima raka prostate i BHP te međusobno usporediti dobivene podatke dviju skupina.

2. Odrediti obrazac i stupanj metilacije DNA promotorskih regija gena *APC* i *LGALS3* u gDNA izoliranom iz tumorskog tkiva te ga usporediti s obrascem i stupnjem metilacije cfDNA iz krvne i sjemene plazme kod pacijenata s ranim stadijima rak prostate.

3. Kvantificirati i usporediti ekspresiju gena *APC* i *LGALS3* na proteinskoj razini u tkivu tumora te okolnom netumorskom tkivu.

4. Korelirati ekspresiju gena *APC* i *LGALS3* na proteinskoj razini sa statusom metilacije gDNA u tumorskom tkivu pacijenata s ranim stadijima raka prostate.

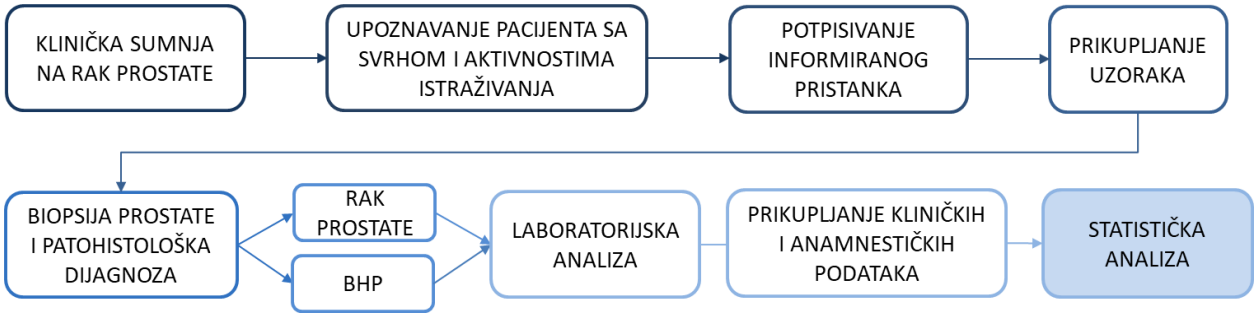
5. Utvrditi osjetljivost i specifičnost stupnja i obrasca metilacije cfDNA promotorskih regija gena *APC* i *LGALS3* izolirane iz krvne i sjemene plazme kao biomarkera za razlikovanje bolesnika s ranim stadijima raka prostate od bolesnika s BHP.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

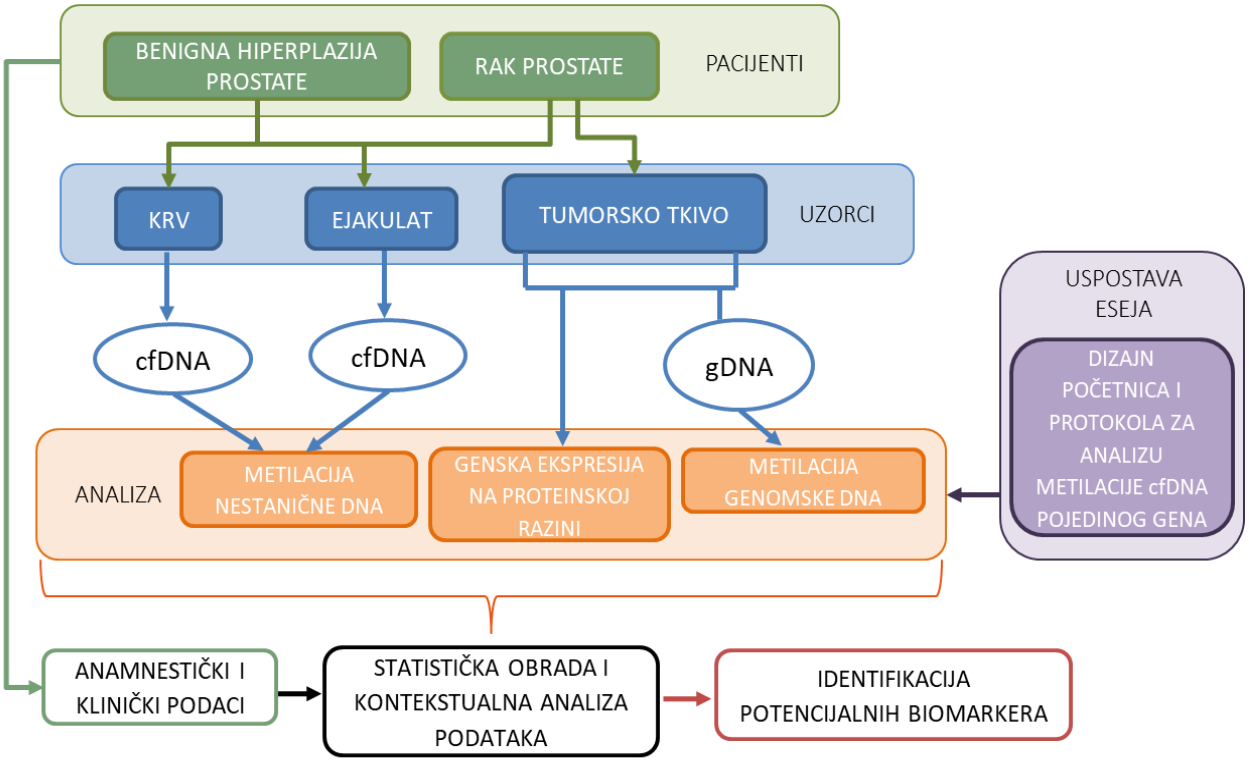
U istraživanje je bilo uključeno 97 ispitanika koji su pristupali biopsiji prostate radi sumnje na dijagnozu raka prostate u okviru rutinskog rada Klinika za urologiju KBC-a Zagreb i KBC-a Sestre milosrdnice. Ispitanici su prije uključenja u istraživanje, odnosno prikupljanja uzoraka detaljno upoznati sa svrhom i tijekom istraživanja te su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju, kao što je prikazano na Slici 9. Obaviješteni su o tajnosti njihovih podataka, namjenskom korištenju njihova biološkog i genetičkog materijala te o mogućnosti izlaska iz istraživanja vlastitom voljom u bilo kojem trenutku. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Epigenetički biomarkeri raka prostate“ (epiPro, UIP-2017-05-8138). Odobreno je od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa odobrenja 641-01/18-02/01 od 25. siječnja 2018), Etičkog povjerenstva KBC Zagreb (klasa odobrenja 8.1-17/213-2, br. 02/21 AG od 11. prosinca 2017.) i Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice (broj odobrenja EP-18327/17-2 od 7. prosinca 2017.).

Ispitanicima su prije biopsije uzorkovani krv i ejakulat te su nakon biopsije podijeljeni u skupine rak prostate ili BHP, sukladno dijagnozi kliničkog patologa. Kriteriji uključenja u istraživanje su dijagnoza BHP-a ili dijagnoza raka prostate u stadiju I ili II prema 8. izdanju priručnika za stupnjevanje raka izdanog od strane AJCC. Navedeno uključuje rak prostate gradusa 1-4 koji je ograničen na prostatu, bez zahvaćenih limfnih čvorova i/ili prisutnih metastaza te s PSA vrijednošću < 20 μg/L. Isključni kriterij je bilo koja patohistološka dijagnoza osim BHP-a, odnosno raka prostate stadija I ili II ustanovljena na Kliničkom zavodu za patologiju dotičnog KBC-a (sukladno pravilima struke te najnovijoj WHO i AJCC klasifikaciji). Od ispitanika uključenih u istraživanje, 42 je dijagnosticiran rak prostate, a 55 BHP.



Slika 9. Dizajn uključivanja ispitanika u istraživanje.

Od kliničkih i patohistoloških podataka prikupljeni su podaci o dobi i zadnje izmjerenoj serumskoj koncentraciji PSA prije biopsije, podaci o GS, veličini tumora (T), zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i kliničkom stadiju bolesti izraženom prema TNM klasifikaciji koja se rabila u trenutku pisanja ove disertacije te podaci o ISUP stupnju. Za ispitanike koji su kasnije pristupili radikalnoj prostatektomiji su prikupljeni isti patohistološki podaci. Dizajn istraživanja prikazan je na Slici 10.



Slika 10. Dizajn istraživanja.

4.2. Prikupljanje i obrada uzoraka

4.2.1. Uzorkovanje krvi i ejakulata

Periferna venska krv prikupljena je u dvije 3 mL ili 6 mL vakuum epruvete s K_2EDTA kao antikoagulansom (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH/ Becton Dickinson, NJ, USA). Vađenje krvi provedeno je prema nacionalnim preporukama za uzorkovanje venske krvi, u sjedećem položaju od strane stručnog osoblja (76). Krv je odmah po vađenju obrađena dvostrukim centrifugiranjem do krvne plazme (na 1400 x g pa 4500 x g, oba koraka 10 min na sobnoj temperaturi). Uzorci ejakulata prikupljeni su u sterilnu čašicu metodom masturbacije nakon 3-5 dana seksualne apstinencije te su obrađeni dvostrukim centrifugiranjem do sjemene plazme (na 400 x g pa 12000 x g, oba koraka 10 min na sobnoj temperaturi). Svi uzorci su pohranjeni na –80 °C do daljnje analize.

4.2.2. Obrada i priprema uzoraka tkiva

Iglenom biopsijom i radikalnom prostatektomijom dobiveni uzorci prostate su obrađeni prema standardnoj histološkoj metodi koja uključuje 24-satnu fiksaciju u 10 %-tnom puferiranom formalinu te dehidraciju u etanolu rastućih koncentracija (70 %, 80 %, 96 % i 100 %). Tkivo je zatim provedeno kroz ksilol, prožeto u tekućem parafinu na temperaturi od 60 °C te uklopljeno u parafinske blokove. Nakon što su blokovi ohlađeni na 4 °C, narezani su na kliznom mikrotomu na rezove debljine 4 μm. Ovi rezovi nakon deparafiniranja u ksilolu i dehidracije u padajućem nizu koncentracije etanola (100 %, 96 %, 80 % i 70 %) bili su obojani hemalaun-eozinom (HE) za svjetlosno mikroskopsku analizu. Patolog je na HE preparatima procijenio morfološku građu tkiva te donio dijagnozu raka prostate ili BHP-a, u slučaju iglene biopsije, a potvrdio dijagnozu raka prostate u slučaju radikalne prostatektomije.

Od ispitanika s rakom prostate koji su pristupili radikalnoj prostatektomiji uzeti su blokovi koji sadrže i tumorsko i okolno netumorsko tkivo (ONT), gdje god je bilo moguće. Od svakog bloka su narezana četiri reza debljine 4 μm za potrebe imunohistokemijske analize te šest rezova rezova debljine 10 μm za potrebe izolacije genomskog DNA (gDNA). U slučaju BHP-a, uzeta su dva bloka biopsija zbog male količine tkiva te je jedan narezan na rezove debljine 4 μm, a drugi na rezove debljine 10 μm, za iste potrebe. Što se tiče blokova biopsija s patohistološki potvrđenim

rakom prostate, uzeti su blokovi s cilindrima koji sadrže najveći postotak tumorskog tkiva prema uputama patologa, a narezani su na rezove debljine 4 μm za potrebe imunohistokemijske analize. Zbog ograničene količine, ti blokovi nisu mogli biti narezani i za izolaciju gDNA te su stoga korišteni prethodno opisani uzorci radikalne prostatektomije.

4.3. Izolacija i kvantifikacija cfDNA iz krvne i sjemene plazme

cfDNA je izoliran iz uzoraka krvne plazme dobivene dvostrukim centrifugiranjem koristeći NucleoSnap cfDNA kit (Macherey-Nagel, Njemačka) na QIAvac 24 Plus vakuum stanici (Qiagen, Njemačka). Početni volumen krvne plazme varirao je od 1,2 do 6 mL, a prosječno je iznosio 4 do 5 mL. Izolacija je obavljena sukladno uputama proizvođača s iznimkom da je za digestiju korištena povećana količina proteinaze K (20 μL umjesto 15 μL proteinaze K/mL plazme) te je korak digestije obavljen na 55 °C, preko noći. Naime, pokazano je da produžena digestija proteinazom K rezultira većim prinosom izolirane DNA (77). Ukratko, u uzorak je dodana proteinaza K pa nakon 5 min inkubacije pufer VL u volumenu jednakom početnom volumenu plazme. Nakon kratkog treskanja i prekonoćne digestije, u uzorak je dodan jednak volumen 100 %-tnog etanola volumenu plazme. Uzorak je kratko protresen i prebačen na pripremljenu kolonu spojenu na vakuumski *manifold*. Pod tlakom je propušten kroz kolonu pri čemu je DNA ostala vezana za membranu kolone. Uslijedilo je dvostruko ispiranje kolone komercijalnim puferima VW1 i WB. Kolona je zatim skinuta i prebačena u kolekcijsku epruveticu te je osušena centrifugiranjem na velikoj brzini. Elucija DNA s membrane kolone postignuta je pomoću dvostrukog centrifugiranja u trajanju od 2 x 1 min koje je povećano na 20000 x g s ukupno 100 μL elucijskog pufera (2 x 50 μL). Izolirani cfDNA je spremljen na –80 °C do daljnje analize.

Prije izolacije cfDNA iz sjemene plazme, uzorci su centrifugirani 10 min na 20 000 x g jer je utvrđeno da klasičnim dvostrukim centrifugiranjem zaostaje značajna količina staničnih rezidua koje onemogućavaju kvalitetnu izolaciju, a uklanjaju se tim dodanim korakom centrifugiranja. Početni volumen sjemene plazme iznosio je 0,2 do 6,1 mL, a uglavnom se kretao oko 1 do 1,5 mL. Za izolaciju su korišteni NucleoSnap cfDNA kit i NucleoSpin cfDNA kit (Macherey-Nagel, Njemačka). Potonji se temelji na istom principu kao prethodno opisani kit, osim što ne koristi vakuumski *manifold* jer je prilagođen za volumene manje od 1 mL. Korak digestije proteinazom K izmijenjen je kao i u NucleoSnap cfDNA kitu. Elucija DNA s kolone je prilikom korištenja

kita NucleoSnap cfDNA učinjena kao što je opisano u slučaju krvne plazme, a za uzorke izolirane s NucleoSpin cfDNA kitom volumen elucijskog pufera je iznosio 50 µL. Grafički prikaz izolacije nalazi se na Tablici 6.

Tablica 6. Shematski prikaz izolacije cfDNA iz krvne i sjemene plazme pomoću komercijalnih kitova NucleoSnap cfDNA i NucleoSpin cfDNA XS (Macherey-Nagel, Njemačka).

korak	NucleoSnap cfDNA		NucleoSpin cfDNA XS	
1. liziranje uzorka i inkubacija		20 µL proteinaze K/mL plazme miješanje RT, 5 min VL* pufer za lizu inkubacija 55 °C, O/N		20 µL proteinaze K/mL plazme miješanje inkubacija 55 °C, O/N
2. priprema vezujućih uvjeta (engl. *binding conditions*)		100 % etanol miješanje		BB** pufer miješanje
3. vezanje DNA	 vakuum	priprema kolone (*column conditioner*, CC) tlak 30 s stavljanje lizata na kolonu tlak ~ 15-20 min (dok lizat ne prođe kroz kolonu)		stavljanje lizata na kolonu centrifugirane: 2,000 x g, 30 s 11,000 x g, 5 s
4. ispiranje silika membrane	 vakuum	VW1* pufer tlak 1 min WB*** pufer tlak 30 s		WB*** pufer centrifugiranje: 11,000 x g, 30 s premještanje kolone u čistu kolekcijsku tubicu
5. sušenje silika membrane		ukloniti gornji dio kolone i odbaciti centrifugiranje: 20,000 x g, 3 min		WB pufer centrifugiranje: 11,000 x g, 3 min premještanje kolone u čistu kolekcijsku tubicu
6. eluiranje DNA		elucijski pufer RT, 3 min centrifugiranje: 11,000 x g, 1 min		elucijski pufser centrifugiranje: 11,000 x g, 30 s

*sadrži gvanidin hidroklorid

**sadrži gvanidin tiocijanat
***sadrži etanol

Količina cfDNA određena je pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time or Quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR). Korištene su početnice koje ciljaju drugi okvir čitanja ljudskog *LINE-1* elementa (engl. *Long Interspersed Element-1*). *LINE-1* pripada obitelji retrotranspozona s više od 100 000 elemenata razasutih po ljudskom genomu. Njegova kvantifikacija predstavlja osjetljivu metodu za kvantifikaciju cfDNA, koja ima prednost nad drugim metodama kvantifikacija poput fluorometrije te se smatra „zlatnim standardom" u kvantifikaciji cfDNA (78,79).

Korištene su početnice koje umnažaju 82 pb dugu *LINE-1* regiju i one koje umnažaju 224 pb *LINE*-a regiju (Tablica 7). Početnice su pribavljene od proizvođača Kemomed, Hrvatska. Kratki amplikon je korišten za kvantifikaciju ukupne cfDNA, a dugi za izračun cfDNA fragmentacijskog indeksa (cfi) koji je jednak omjeru cfDNA kvantificirane dužim i kraćim fragmentom (80). Sekvence početnica za *LINE*-a su preuzete iz rada Takai i sur. (81). Reakcijske smjese priređene su u ukupnom volumenu od 20 µL u pločicama s 96 jažica i u konačnici su sadržavale 10 µL 1 x reagensa za umnožavanje SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Njemačka), 0,5 µL 250 nM *forward* početnice, 0,5 µL 250 nM *reverse* početnice, 8 µL DNaze slobodne vode i 1 µL izolirane cfDNA. Umnažanje qPCR-om je učinjeno na uređaju CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Njemačka) prema sljedećem protokolu: pre-*cycling heat* aktivacija DNA polimeraze pri 98 °C tijekom 3 minute praćena s 40 ciklusa denaturacije DNA pri 98 °C tijekom 10 sekundi te sparivanje lanaca i sinteza DNA pri 60 °C tijekom 30 sekundi. Analiza je učinjena koristeći CFX Maestro Software (Bio-Rad Laboratories, Njemačka). Apsolutna kvantifikacija DNA u svakom uzorku je obavljena pomoću standardne krivulje serijskih razrjeđenja komercijalne ljudske genomske DNA (Human Genomic DNA: Male, G1471, Promega, SAD). Reakcije umnažanja gena od interesa za svaki pojedini uzorak provedene su u triplikatu, u odvojenim jažicama. Za provjeru potencijalne kontaminacije kao negativna kontrola korištena je voda.

Tablica 7. Početnice korištene za kvantifikaciju cfDNA i veličine amplikona.

Gen		Sekvenca	Veličina amplikona (pb)
LINE-1 kratki fragment	F	5′-TCACTCAAAGCCGCTCAACTAC-3′	82
	R	5′-TCTGCCTTCATTTCGTTATGTACC-3′	
LINE-1 dugi fragment	F	5′-TCTGCCTTCATTTCGTTATGTACC-3'	224
	R	5′-TCAGCACCACACCACACCTATTC-3′	

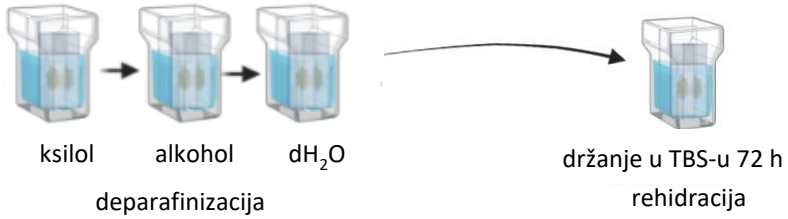
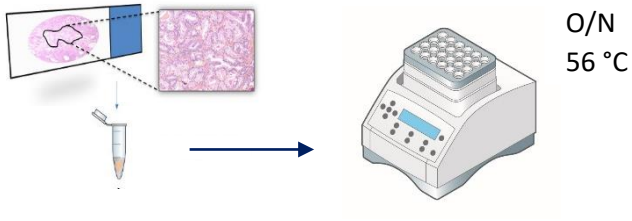
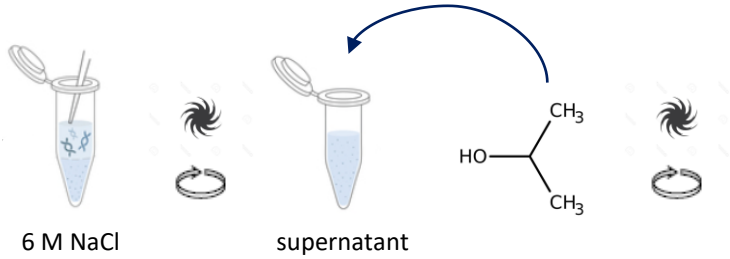
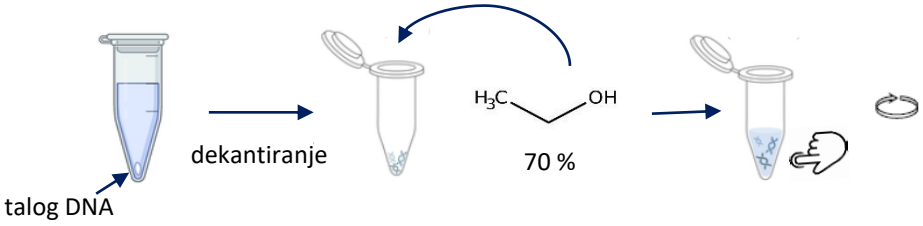
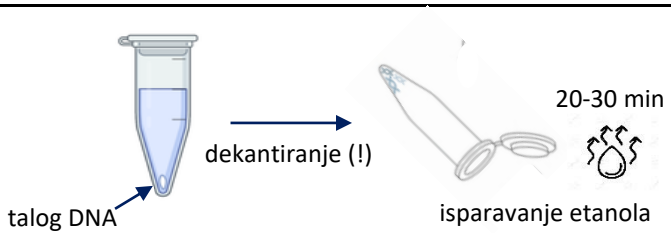
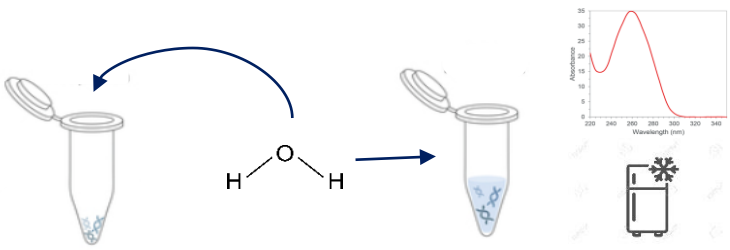
4.4. Izolacija gDNA iz parafinskih blokova

Ukupni gDNA izoliran je iz rezova parafinskih blokova radikalne prostatektomije i biopsije prostate pacijenata s BHP-om debljine 10 μm koji su priređeni kao što je opisano u poglavlju 4.2.2.). Za izolaciju iz uzoraka radikalne prostatektomije uzeto je po pet rezova, a za izolaciju iz uzoraka BHP-a svi rezovi iz jednog parafinskog bloka. Iz 27 prikupljenih uzoraka radikalne prostatektomije izoliran je tumorski DNA, a iz 21 od tih 27 je izoliran i DNA iz ONT jer je tamo bilo dovoljno okolnog tkiva da se sa sigurnošću može odvojiti bez kontaminacije tumorskim tkivom. Tumorsko i netumorsko tkivo su na HE obojanom rezu označili patolozi te je prema tim oznakama skalpel nožićem skinuto tkivo sa stakala za potrebe izolacije; s tim da je izuzeto tkivo koje se nalazi na označenom rubu tumorskog/netumorskog tkiva.

Korišten je kućni protokol razvijen u Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) koji je pokazao iznimne značajke s obzirom na prinos i kvalitetu DNA u odnosu na komercijalno dostupne kitove za izolaciju gDNA. Protokol se temelji na isoljavanju DNA te je shematski prikazan u Tablici 8. Ukratko, rezovi su deparafinirani u ksilolu i dehidrirani u padajućem nizu koncentracije etanola (100 % dva puta po 5 min, 96 % dva puta po 5 min i 70 % 5 min) te su nakon 5 minuta hidracije u destiliranoj H_20 ostavljeni u tris puferiranoj fiziološkoj otopini (engl. *tris-buffered saline*, TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) tijekom 72 sata, što je omogućilo izrazitu rehidraciju. Tkivo je zatim sterilnim skalpel nožićem sastrugano u epruveticu s 500 μL TES pufera (50 mM Tris-HCl pH = 8; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1 % SDS) te je dodano 50 μL proteinaze K (10 mg/mL). Uzorci su

stavljeni na termoblok postavljen na 56 °C radi prekonoćne digestije. Iduće jutro je u uzorke gdje se tkivo nije potpuno razgradilo dodano još 50 µL proteinaze K. Nakon potpune razgradnje tkiva, u uzorke je dodano 200 µL potpuno zasićenog natrijevog klorida (6 M NaCl) te su uzorci nakon 5-minutnog kratkog treskanja centrifugirani na 13 000 *rpm* tijekom 10 minuta. Supernatant (oko 700 µL) je prebačen u čistu epruveticu gdje je zatim dodano 500 µL izopropanola. Nakon 2-minutnog kratkog treskanja i centrifugiranja na 13 000 *rpm* tijekom 15 minuta, dobiven je talog DNA. Supernatant je dekantiran, a talog je ispran dodavanjem 500 µL 70 %-tnog etanola i višestrukim kuckanjem po dnu epruvetice. Uslijedilo je centrifugiranje na 13 000 *rpm* tijekom 15 minuta nakon kojeg je etanol uklonjen opreznim dekantiranjem da se ne izgubi i talog DNA. Epruvetica s talogom DNA je ostavljena da se osuši od ostataka etanola okrenuta naopako na papirnatom ručniku, otprilike 20 do 30 minuta. Zatim je u uzorak dodano 50 µL miliQ u slučaju uzoraka biopsije i 100 µL miliQ u slučaju uzoraka radikalne prostatektomije vode te je uzorak stavljen na termoblok na temperaturu od 40 °C na 1 h kako bi se DNA otopio. Uzorak je lagano propipetiran kako bi se osigurala homogenost. Koncentracija i čistoća izoliranog ukupnog DNA određena je mjerenjem apsorbancije 1 µL izolata DNA u triplikatu pri 260 nm, odnosno omjera apsorbancija pri 260 nm i 280 nm na spektrofotometru Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, SAD). Koncentraciju RNA u izolatima uređaj preračunava temeljem Beer-Lambertovog zakona koji opisuje linearnu povezanost apsorbancije i koncentracije. Omjer A260/A280 otopine čistog DNA iznosi ~ 1,8 , što je i bio slučaj kod svih analiziranih uzoraka.

Tablica 8. Shematski prikaz izolacije gDNA iz rezova parafinskih blokova.

koraci	**opis**
1. deparafinizacija i rehidracija	
2. homogenizacija tkiva u TES puferu i digestija s proteinazom K	
3. isoljavanje proteina, kratko treskanje i centrifugiranje **4.** dodavanje izopropanola/DNA precipitacija, kratko treskanje i centrifugiranje	
5. dekantiranje supernatanta, ispiranje taloga DNA etanolom (kuckanje po dnu epruvetice), centrifugiranje	
6. oprezno dekantiranje etanola, sušenje taloga DNA na zraku	
7. otapanje DNA u miliQ H_2O, kvantifikacija i pohrana	

4.5. Dizajniranje početnica za PCR i pirosekvenciranje

Početnice za umnažanje željenih fragmenata gena *APC* i *LGASL3* PCR-om i analizu stupnja njihove metilacije metodom pirosekvenciranja dizajnirane su u računalnom programu PyroMark® Assay Design Software 2.0 (Qiagen, Njemačka). Za pronalazak sekvenci gena korišten je genomski preglednik UCSC Genome Bioinformatics (https://genome.ucsc.edu/), a sekvence su preuzete iz baze podataka RefSeq, identifikacijskih oznaka NM_001354896 za gen *APC* i NM_002306 za gen *LGALS3*. Unutar preuzete sekvence se kod oba istraživana gena nalazi CpG otok. Sekvence također obuhvaćaju promotorsku regiju, prvi egzon i dio prvog introna. U računalnom programu za dizajn početnica, DNA sekvence su modificirane kako bi se početnice mogle dizajnirati za bisulfitno konvertirani DNA. Odnosno, slijed baza je promijenjen uz pretpostavku da su svi nemetilirani citozini konvertirani u uracile i da će nakon PCR reakcije biti zamijenjeni za timine. Zato su svi citozini koji ne pripadaju CpG dinukleotidu označeni kao timini, a svi potencijalno metilirani citozini koji im pripadaju su označeni kao Y, što označava primidinsku bazu jer nakon bisulfitne konverzije mogu biti ili C ili T. Za umnažanje željenog fragmenta PCR reakcijom odabran je par početnica: F početnica (engl. *forward primer,* F) za produljivanje jednog lanca i R početnica (engl. *reverse primer,* R) za produljivanje drugog lanca te sekvencijska početnica (engl. *sequencing primer,* S) za pirosekvenciranje. Za reakciju pirosekvenciranja potrebne su biotinilirane jednolančane molekule DNA pa je nužno da ili F ili R početnica ima kovalentno vezani biotin. U slučaju gena *APC*, biotin je bio vezan za 5'-kraj F početnice, a kod gena *LGALS3* za 5'-kraj R početnice. Ostali detalji koji uključuju broj analiziranih CpG mjesta nalaze se u Tablici 9. Dizajnirane početnice omogućile su umnažanje fragmenata veličine 145 pb za gen *APC* i 124 pb za gen *LGALS3* tijekom PCR reakcije.

Tablica 9. Početnice korištene za umnažanje i analizu metilacije DNA gena *APC* i *LGALS3*, analizirana sekvenca i broj analiziranih CpG mjesta unutar iste.

Naziv gena	Početnica	Sekvenca početnice	Analizirana sekvenca	CpG mjesta
APC	F	biotin-5'-GGAGGGTAAGTAGTAAGGGG-3'	3'-CRAACCAACCTCRATCCRCAACTCCCRAACCTAAACCCRCAAATCCCCCCC-5'*	5
	R	5'-TCCTCACCAACAACCAACAACAATA-3'		
	S	5'-ACAATACCTAAAAACAACAT-3'		
LGALS3	F	5'-GGTTGGATTTGGAGGAGAT-3'	5'-TYGTTGTGGAGYGYGAATGAGTTTTTTTATYGGGATTAGTTGYGGTYGGGTTGTAGTYGTTGTTTGGTTGTTGATT-3'	7
	R	biotin-5'-ACCATAAAACAAACACCATTTTCTATA-3'		
	S	5'-GGATTTGGAGGAGATT-3'		

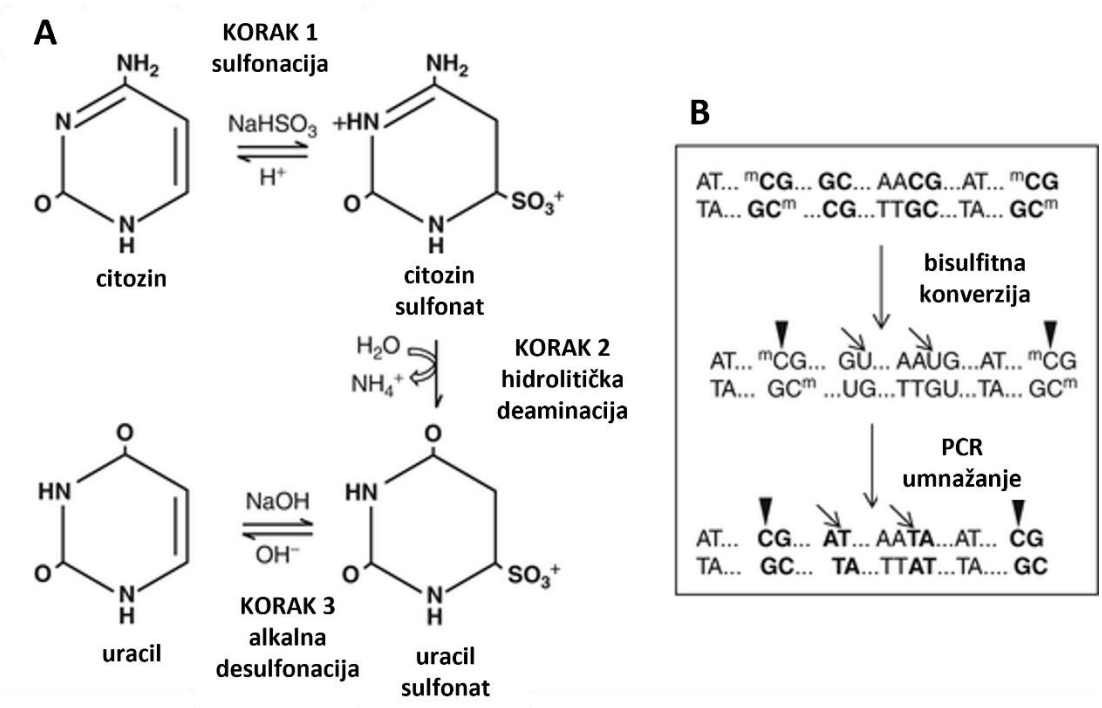
*R je simbol za purinsku bazu (A ili G)

Uspješnost umnožavanja PCR-om fragmenata gena *APC* i *LGALS3* pomoću dizajniranih početnica je provjerena na cfDNA i gDNA izoliranim iz krvne i sjemene plazme dobrovoljca. Nakon bisulfitne konverzije i PCR umnažanja obavljenih prema protokolima opisanim u potpoglavljima 4.6. i 4.7., uspješnost umnažanja je provjerena pomoću gel elektroforeze na 2 %-tnom agaroznom gelu u 1 x TAE puferu (Tris-acetat-EDTA). Na gel je nanešeno 5 µL pojedinog PCR produkta te je elektroforeza provedena u trajanju od 10 min na 80 V, a zatim 20-30 min na 120 V. Dodatkom otopine (GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain, Lonza, Švicarska) prilikom pripreme gela koja se veže na DNA, omogućena je vizualizacija umnoženih fragmenata DNA pomoću UV-transiluminatora. Veličina PCR produkta koja je očekivana je provjerena usporedbom s DNA standardom (SimplyLoad™ 100 bp DNA Ladder, Lonza, Švicarska) koji sadrži fragmente DNA poznatih veličina. Prema uputama proizvođača korištenih kemikalija za PCR i pirosekvenciranje (Qiagen), prilikom optimizacije je isprobana početna količina od 10 ng cfDNA i gDNA, zatim od 5 ng; a u slučaju cfDNA i od 2.5 ng kako bi se utvrdila najmanja količina DNA s kojom se može ići u PCR reakciju. Za oba gena je utvrđeno da količina od 5 ng gDNA i 2.5 ng cfDNA zadovoljava, odnosno pokazuje jasan fragment na gelu. Negativna

kontrola (voda stavljena umjesto uzorka u PCR reakciju) je pokazala odsutnost kontaminacije reakcijske smjese stranim molekulama DNA jer se fragmenti gena nisu umnožili PCR reakcijom, odnosno na gelu nije bila prisutna vidljiva vrpca.

4.6. Bisulfitna konverzija izoliranih cfDNA i gDNA

Kako bi se metilacija izoliranog DNA mogla analizirati pirosekvenciranjem, za selektivnu konverziju nemetiliranih citozina u uracile upotrebljena je metoda bisulfitne konverzije (Slika 11), dok metilirani citozini ostaju nepromijenjeni. U tu svrhu korišten je komercijalno dostupan set kemikalija EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača.



Slika 11. Princip bisulfitne konverzije. A – bisulfitna konverzija nemetiliranih citozina koja se odvija u tri koraka. U prvom koraku se DNA denaturira pri 95 ºC i dolazi do sulfonacije citozina. Slijedi hidrolitička deaminacija nemetiliranih citozina natrijevim bisulfitom pri 65 ºC i niskom pH (5-6). Posljednji korak je obilježen desulfonacijom uslijed inkubacije pri visokom pH na sobnoj temperaturi što rezultira nastajanjem uracila. B – nakon bisulfitne konverzije, nemetilirani citozini su konvertirani do uracila te su PCR umnažanjem postali timini u sekvenci DNA, dok su metilirani citozini ostali citozini u sekvenci DNA nakon PCR umnažanja (Preuzeto i prilagođeno prema *Bisulfite Conversion, Brahmachari and Jain, Springer* (82)).

Nakon pripreme kemikalija prema uputama proizvođača, u PCR epruvetice je dodana reakcijska smjesa koja se sastoji od bisulfitne smjese (sadrži natrijev bisulfit), DNA zaštitnog pufera (engl. *DNA protect buffer*), vode bez RNaza (engl. *RNase free water*) i DNA koji se konvertira. U slučaju gDNA konvertirano je 500 ng DNA, kao i kod uzoraka izoliranih cfDNA gdje je koncentracija u izolatu to omogućavala. U preostalim uzorcima izoliranih cfDNA konvertirano je onoliko DNA koliko je bilo na raspolaganju, a nikad manje od proizvođačevog preporučenog minimuma od 1 ng. Nakon postavljanja reakcije, miješanja i kratkog centrifugiranja da se sav sadržaj spusti na dno, PCR tubice su stavljene u uređaj CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Njemačka). Pokrenuta je PCR reakcija prema sljedećim uvjetima: trostruka izmjena denaturacije tijekom 5 min pri 98 °C i inkubacije pri 60 °C (prvi put 25 min, drugi 85 min i treći 175 min) te čuvanje uzoraka na 4 °C maksimalno 20 sati. Sadržaj svake PCR epruvetice prebačen je u sterilnu 1,5 mL epruveticu te je dodan pufer BL pomiješan s *carrier* RNA. Pufer BL omogućava vezanje konvertiranog jednolančanog DNA za membranu na koloni, a *carrier* RNA poboljšava vezanje malih količina DNA za kolonu te ga proizvođač posebno preporuča u slučaju fragmentiranog DNA poput onog izoliranog iz parafina. U epruvetice je dodan 100 %-tni etanol te je nakon miješanja sadržaj prebačen na MinElute DNA spin kolone umetnute u kolekcijske epruvetice. Uslijedilo je jednominutno centrifugiranje kolone na 20 000 g (isti uvjeti centrifugiranja bili su primijenjeni sve do koraka elucije). Filtrat je bačen te je kolona isprana centrifugiranjem s puferom BW koji uklanja ostatke natrijevog bisulfita. Filtrat je ponovno uklonjen, na kolonu je stavljen desulfonacijski pufer BD te su uzorci inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi. Zatim su kolone centrifugirane i još dva puta isprane s puferom BW. Na kolonu je dodan 100 %-tni etanol, centrifugirane su, a zatim prebačene u čiste kolekcijske epruvetice. Na kolonu je stavljen elucijski pufer EB te su centrifugirane 1 min na 15 000 g. Volumen pufera je ovisio o početnoj količini DNA s kojom se kretalo u bisulfitnu konverziju. Odnosno, na kolonu je dodan onaj volumen elucijskog pufera koji je bio potreban da bi koncentracija DNA u eluatu bila 5 ng/µL, gdje god je to bilo moguće. Minimalno se radilo o 10 µL, a maksimalno o 100 µL podijeljenih u dva koraka elucije od 50 µL. Uzorci bisuflitno konvertiranih DNA su pohranjeni na –80 °C do daljnje analize.

4.7. Lančana reakcija polimerazom nakon bisulfitne konverzije

Fragmenti DNA su nakon bisulfitne konverzije umnoženi PCR reakcijom koristeći komercijalni set kemikalija PyroMark® PCR Kit (Qiagen, Njemačka), prema uputama proizvođača. Svaka reakcijska smjesa je sadržavala 12,5 μL Master Mix-a, 2,5 μL koncentrata CoralLoad-a, 0,5 μL 10 μM *forward* početnica, 0,5 μL 10 μM *reverse* početnica te vode i uzorka bisulfitno konvertiranog DNA u ukupnom volumenu od 9 μL. Dodan je 1 μL uzorka u slučaju kad je koncentracija bisulfitno konvertiranog DNA iznosila 5 ng/μL, a drugdje 1–6 μL, ali minimalno da toliko da je u reakciju stavljeno 2,5 ng DNA, kao što je utvrđeno optimizacijom protokola. Kao negativna kontrola korištena je miliQ voda koja je stavljena u reakcijsku smjesu umjesto uzorka u volumenu od 1 μL. Umnažanje PCR reakcijom odvijalo se u uređaju CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Njemačka) i C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Njemačka) pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija pri 95 °C tijekom 15 min, zatim 45 ciklusa od po 30 sekundi denaturacije (94 °C), vezanja početnica (56 °C) i sinteze lanca (72 °C) te završne elongacije pri 72 °C u trajanju od 10 minuta. Po završetku PCR reakcije, uzorci su pohranjeni na +4 °C do daljnje analize koja je slijedila idući dan. Osim uzoraka, PCR reakciji su povdrgnute komercijalne kontrole, bisulfitno konvertirane 100 % metilirani ljudski DNA i nemetilirani ljudski DNA (EpiTect PCR Control DNA Set, Qiagen, Njemačka) koje su kasnije služile u reakciji pirosekvenciranja.

4.8. Pirosekvenciranje

Umnoženi fragmenti bisulfitno konvertiranog DNA su pirosekvencirani na uređaju za pirosekvenciranje Pyromark Q24 Advanced (Qiagen, Njemačka) pri čemu su korištene kemikalije PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen, Njemačka). Eseji za pirosekvenciranje za svaki gen izrađeni su u računalnom programu PyroMark Q24 Advanced Software (Qiagen) čime je utvrđen redoslijed dodavanja nukleotida u reakcijsku smjesu. Eseji su pohranjeni na USB *stick* koji je bio umetnut u pirosekvencer. Prema uputama proizvođača, uređaj za pirosekvenciranje je upaljen 30 min prije početka rada te je pripremljena radna postaja PyroMark® Q24 Vacuum Workstation što uključuje punjenje odgovarajućih posudica 70 %-tnim etanolom, destiliranom vodom te proizvođačevim denaturacijskim puferom (engl. *denaturation buffer*) i puferom za ispiranje (engl. *wash buffer*). Provjerena je također valjanost vakuumske pumpe. Zatim je pripremljena reakcijska smjesa za vezanje biotiniliranih PCR produkata na streptavidinom obložene sefarozne kuglice (Streptavidin Sepharose® High Performance, GE

Healthcare, Švedska) prema Tablici 10. Reakcijska smjesa u volumenu od 60 µL je dodana u svaku od 24 jažice PCR pločice, a zatim je dodano 20 µL uzorka (PCR produkta). Pločica je zatvorena ljepljivom folijom i stavljena na tresilicu na 1400 *rpm* kroz 10–30 min kako bi se omogućilo dobro vezanje PCR produkata na sefarozne kuglice. Tijekom treskanja pripremljena je PyroMark Q24 pločica za pirosekvenciranje tako da je u svaku od 24 jažice stavljeno 20 µL reakcijske smjese pripremljene prema Tablici 10.

Tablica 10. Komponente i volumeni reakcijske smjese za vezanje biotiniliranih PCR produkata na sefarozne kuglice i za vezanje početnica.

Komponenta reakcijske smjese	Volumen po uzorku (µL)	
Sefarozne kuglice	2	PCR pločica
Pufer za vezanje (*PyroMark binding buffer*)	40	
miliQ voda	18	
PCR produkt	20	
Pufer za prijanjanje (*PyroMark annealing buffer*)	19,25	PyroMark Q24 pločica
Početnica za sekvenciranje	0,75	

Zatim je pripremljen spremnik za pirosekvenciranje (PyroMark® Q24 Cartridge, Qiagen, Njemačka) dodavanjem odgovarajućeg volumena smjese enzima (DNA polimeraza, ATP sulfurilaza, luciferaza i apiraza), supstrata (adenozin 5' fosfosulfat i luciferin) i nukleotida, prema eseju koji je kreiran u gore spomenutom programu za pojedini gen. Spremnik je zatim stavljen u pirosekvencer. Prije pripreme spremnika u ampule s liofiliziranom smjesom enzima i supstrata je dodan odgovarajući volumen miliQ vode te su ampule lagano promiješane i ostavljene na sobnoj temperaturi 10 min radi stabilizacije. Nakon što je isteklo minimalno 10 min treskanja na tresilici te su pripremljeni PyroMark Q24 pločica i spremnik, PCR pločica je prebačena na radnu postaju. U jažicu su spušteni nastavci s filtrima pod uključenim vakuumom na ~ 15 s, što je dovelo do vezanja sefaroznih kuglica (koje sadrže biotinilirani PCR produkt na sebi) na nastavke s filtrima. Zatim su nastavci s filtrima provedeni kroz ostale tekućine: 70 %-tni etanol na 5 s (ispiranje nevezanih DNA koje nisu biotinilirane), denaturacijski pufer na 5 s (razdvajanje lanaca DNA pri čemu samo biotinilirani lanac ostaje vezan za sefaroznu kuglicu) te pufer za ispiranje na 10 s.

Nakon ispiranja su nastavci postavljeni točno iznad PyroMark Q24 pločice te spušteni lagano u jažice tijekom čega je isključen vakuum. Laganom trešnjom nastavaka od 30-ak s sefarozne su kuglice pale u pločicu. Pločica je stavljena na grijaču ploču ugrijanu na 80 °C te inkubirana 5 minuta. Neposredno nakon inkubacije prebačena je u pirosekvencer u kojem je bio pripremljen USB s odgovarajućim esejom te je pokrenut postupak pirosekvenciranja uzoraka, odnosno esej za određeni gen. Na svakoj pločici je uz uzorke bila prisutna PCR negativna kontrola (miliQ voda) te komercijalne kontrole – ljudski 100 % metilirani i nemetilirani DNA, kao što je spomenuto u potpoglavlju 4.7.

4.9. Analiza rezultata pirosekvenciranja

Po završetku pirosekvenciranja, dobivena je analiza CpG metilacije pojedinog uzorka grafički prikazana na pirogramu. Za svako analizirano CpG mjesto dobiven je postotak metilacije, a kvaliteta rezultata je procijenjena na temelju kontrole bisulfitne konverzije, negativnih kontrola i intenziteta dobivenih pikova. Računalni program za analizu rezultata provodi kontrolu kvalitete analize na temelju korištenja pikova koji ne pripadaju CpG-u kao referentnih pikova te mjeri koliko se oni dobro uklapaju u teorijski pikogram generiran iz originalne sekvence koja je zadana u eseju. Pikovi varijabilnih pozicija koji su prošli granicu intenziteta svjetlosnog signala od 50 RLU (engl. *relative light units*) su smatrani zadovoljavajućim, iako su gotovi svi bili značajno iznad te vrijednosti.

U svrhu analize metilacije DNA određen je postotak metilacije pet CpG mjesta u slučaju gena *APC*, odnosno sedam CpG mjesta u slučaju gena *LGALS3* unutar CpG otoka ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Postotak metilacije DNA ispitivanog gena izražen je kao prosječna metilacija pet, tj. sedam analiziranih CpG mjesta, a dodatno je analiziran postotak metilacije pojedinog CpG mjesta te uspoređen između skupina ispitanika.

4.10. Imunohistokemijsko bojanje preparata protutijelima

Predmetna stakla s parafinskim rezovima biopsije prostate i radikalne prostatektomije debljine 4 μm su ugrijana u termostatu na 55 °C u trajanju od 1 h. Zatim su deparafinizirana ksilolom, dehidrirana u graduiranom alkoholu (100 % dva puta po 5 min, 96 % dva puta po 5 min, 70% 5 mmin) i potom hidrirana u destiliranoj vodi. Demaskiranje antigena (engl. *antigen retrieval*)

učinjeno je uranjanjem stakala u odgovarajući pufer i 20-minutnim parnim kuhanjem. U slučaju analize proteinske ekspresije gena *APC* radilo se o komercijalnom citratnom puferu (Citrate pH 6, Dako, Agilent Technologies, Njemačka), a u slučaju gena *LGALS3* o pripremljenom Tris-EDTA (hidroksilmetil aminometan-etilendiamintetraoctena kiselina) puferu (pH 9, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,05 % Tween 20). Uslijedilo je hlađenje uzoraka u trajanju od 30 minuta te ispiranje u tris puferiranoj fiziološkoj otopini (engl. *tris-buffered saline*, TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) u trajanju od 5 min. Zatim su stakla izvađena iz pufera te je tkivo okruženo parafinskim markerom kako bi se daljnje otopine zadržale na njemu, a ne razlile okolo. Na stakla je nanijet 5 % goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA, Sigma-Aldrich, SAD) kao blokirajuća otopina za sprečavanje nespecifičnog vezanja. Nakon 20 min je uklonjen te je nanešeno primarno protutijelo pripremljeno u odgovarajućem razrjeđenju (Tablica 11) s otopinomom TBS-a za razrjeđivanje (0.1 % Tween 20, 1 % BSA) i ostavljeno na prekonoćnoj inkubaciji na 4 °C. Sljedeći su dan uzorci isprani u TBS-u 5 puta po 5 minuta tako da su uronjeni u otopinu te stavljeni na treskalicu. Na stakla je zatim nanesena otopina 3 % H_20_2 te su ostavljena u mraku na 20 min kako bi došlo do inaktivacije endogenih peroksidaza. Uslijedilo je ispiranje u TBS-u 3 puta po 5 minuta, a zatim nanošenje sekundarnog protutijela (Dako REAL EnVision Detection System, K5007, Agilent Technologies, Njemačka). Inkubacija sa sekundarnim protutijelom trajala je 1 h na 37 °C, nakon čega su stakla isprana u TBS-u 3 puta po 5 minuta. Kako bi se vizualizirala reakcija antigen – protutijelo, na stakla je nanesen 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB, Dako REAL EnVision Detection System, K5007, Agilent Technologies, Njemačka) u trajanju od 6 min. Reakcija DAB-a i supstrata zaustavljena je 5-minutnim ispiranjem destiliranom vodom. Tkivo na staklima je kontrastirano hematoksilinom (BioGnost, Hrvatska) u trajanju od 10 sekundi pa isprano destiliranom vodom i vodom sa slavine pod mlazom u trajanju od 8 min. Završno ispiranje je bilo u destiliranoj vodi 5 min, nakon čega je slijedilo dehidriranje u nizu otopina suprotnog smjera od onog tijekom deparafinizacije. Odnosno, stakla su držana u sljedećem nizu: 70 % etanol, 96 % etanol, 100 % etanol i ksilol. Naposljetku, tkiva su zaštićena pokrovnim staklom. Prilikom svakog niza imunohistokemijskog bojanja korištene su odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole za svako protutijelo, prema Tablici 11.

Tablica 11. Protutijela korištena u imunohistokemijskom bojanju i njihove karakteristike.

Primarno protutijelo	Klon	Proizvedeno u	Razrjeđenje	Proizvođač	Pozitivna kontrola	Negativna kontrola
Anti-APC	NBP2-15422	zecu	1:750	Novus Biologicals	tanko crijevo	slezena
Anti-Gal-3	ab76245	zecu	1:1000	Abcam	bubreg	slezena

4.11. Analiza imunohistokemijskih preparata

Histomorfološka analiza i slikanje preparata provedeni su pomoću svjetlosnog mikroskopa marke Olympus, model Bx51 spojenim s digitalnim fotoaparatom, uz pomoć dva iskusna nezavisna patologa. Pozitivnom reakcijom je smatrano obojenje smeđom bojom, a ono je analizirano zasebno u epitelu i stromi. Reakcija je očitavana na cijelom prerezu cilindra, odnosno reza prostatektomije pri povećanju mikroskopa od x100, a po potrebi na većem povećanju od x200 ili x400. Razmjer obojenja, odnosno postotak imunoreaktivnih stanica je gradiran na sljedeći način: 0 (nema signala), 1 (1-10 % pozitivnih stanica), 2 (11-50 % pozitivnih stanica), 3 (51-80 % pozitivnih stanica) i 4 (> 80 % pozitivnih stanica). Intenzitet reakcije je gradiran kao 0 (nema reakcije), 1 (blaga reakcija), 2 (umjerena reakcija) ili 3 (snažna reakcija). Proteinska ekspresija je izražena semikvantitativno kao imunohistokemijski indeks bojanja (engl. *immunoreactivity score*, IRS) koji je jednak umnošku razmjera obojenja i intenziteta reakcije, čime je dobivena ljestvica od 0 do 12.

4.12. Mjerenje koncentracije Gal-3 u uzorcima tekućinskih biopsija

Kod ispitanika s većim volumenima uzoraka tekućinskih biopsija, bilo krvne bilo sjemene plazme, izmjerena je i koncentracija proteina Gal-3. Navedeno mjerenje provedeno je na 57 uzoraka krvne plazme (24 od ispitanika s rakom prostate i 33 s BHP-om) te 24 uzorka sjemene plazme (8 od ispitanika s rakom prostate i 16 s BHP-om). Koncentracija Gal-3 izmjerena je imunokemijskom analizom ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) koristeći test Quantikine® ELISA Human Galectin-3 Immunoassay (R&D Systems Inc, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, nakon pripreme otopina (pufer za ispiranje, otopina supstrata, razrjeđivač kalibratora, standard), 100 µL diluenta dodano je u svaku jažicu ploče za ELISA-u na kojoj se nalaze vezana monoklonska protutijela specifična za ljudski Gal-3, a zatim još 50 µL standarda,

kontrole ili razrijeđenog uzorka. Nakon miješanja ploče uslijedila je inkubacija u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi. Uslijedilo je ispiranje ploče na uređaju HydroFlexTM Plate Washer (Tecan Trading AG, Švicarska), dodano je 200 µL ljudskog Gal-3 konjugata (engl. *Human Galectin-3 Conjugate*) u svaku jažicu, odnosno enzim-vezanog poliklonskog protutijela specifičnog za ljudski Gal-3. Uslijedila je inkubacija u trajanju od 2 h te ispiranje ploče kako bi se uklonila nevezana protutijela. U svaku jažicu ploče dodano je 200 µL otopine supstrata te je ploča inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi, zaštićena od izvora svjetlosti, kako bi se razvilo obojenje. Reakcija je završena dodatkom 50 µL stop otopine. Optička gustoća otopine koja je proporcionalna koncentraciji Gal-3 je očitana u svakoj jažici na automatskom čitaču pločica Infinite F50® (Tecan Trading AG, Švicarska) koristeći njegov program Magellan TMsoftware. Analitički raspon testa Quantikine® ELISA Human Galectin-3 Immunoassay je do 10 ng/mL pa su uzorci razrijeđeni 1:4, što je i više od proizvođačevih preporuka (1:2) zbog očekivanih vrijednosti većih od 10 ng/mL, s obzirom na literaturne podatke o referentnim koncentracijama Gal-3.

4.13. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvršena je u računalnom programu GraphPad Prism v5.00 (GraphPad software, San Diego, USA) za Windows operativni sustav. Broj licence je GPW6-278912-RLMU-966F4. Podaci su grafički prikazani koristeći medijan i interkvartilni raspon. Korištena je neparametrijska statistika zbog odstupanja raspodjele podataka od normale. Usporedbe između kvantitativnih vrijednosti načinjene su Mann-Whitneyjevim U testom u slučajevima kada su se uspoređivale razlike između dviju skupina, dok su razlike između više od dviju skupina analizirane Kruskal-Wallisovim testom. Usporedbe između kvantitativnih vrijednosti unutar iste skupine ispitanika učinjene su koristeći Wilcoxonov test rangova zavisnih parova (engl. *Wilcoxon matched-pair signed rank test*). Moguća povezanost varijabli ispitana je Spearmanovom korelacijom. Sve p-vrijednosti manje od 0.05 smatrane su statistički značajnima.

5. REZULTATI

5.1. Analiza kliničkih i patohistoloških parametara

U studiju je ukupno bilo uključeno 97 ispitanika od čega 42 bolesnika s rakom prostate i 55 bolesnika s BHP-om. U Tablici 12 prikazane su kliničke i patohistološke karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje. Medijan dobi je gotovo identičan u skupinama ispitanika te za rak prostate iznosi 62,5 godina, a za BHP 62 godine. Medijan serumske koncentracije PSA iznosio je 6,72 µg/L kod ispitanika s rakom prostate, a 7,10 µg/L kod onih s BHP-om. Skupine ispitanika se nisu statistički značajno razlikovale u dobi ili koncentraciji PSA. Kod većine ispitanika serumska koncentracija PSA bila je niža ili jednaka 10 µg/L, odnosno unutar tzv. „sive zone“ u kojoj je vrlo teško procijeniti je li povišenje koncentracije uzrokovano benignim ili malignim procesom. Većina ispitanika s rakom prostate imala je patohistološki rak označen Gleason zbrojem 7, a uglavnom se radilo o Gleason zbroju 3+4 koji pripada WHO 2016/ISUP gradusu 2.

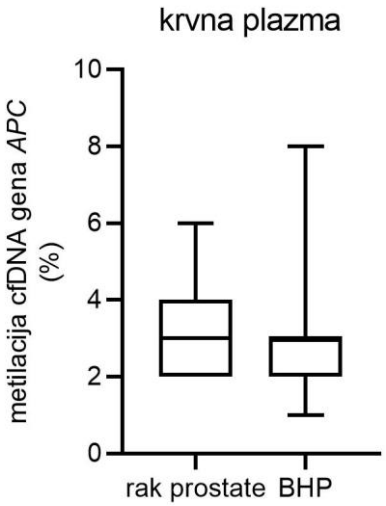
Tablica 12. Kliničke i patohistološke značajke ispitanika uključenih u istraživanje.

Broj ispitanika	rak prostate (42)	BHP (55)
medijan godina (raspon)	62,5 (41-75)	62 (47-77)
medijan predbiopsijske konc. PSA (µg/L)	6,72	7,10
Predbiopsijska konc. PSA, n (%)		
≤ 10 µg/L	34 (8,9 %)	40 (7,7 %)
> 10 µg/L	8 (19,1 %)	15 (27,3 %)
Gleasonov zbroj, n (%)		
6	17 (40,8 %)	np
7	24 (57,1 %)	np
8	1 (2,4 %)	np
9	0 (0 %)	np
SZO 2016/ISUP gradus, n (%)		
1	17 (40,5 %)	np
2	19 (45,2 %)	np
3	5 (11,9 %)	np
4	1 (2,4 %)	np
5	0 (0 %)	np

5.2. Analiza metilacije *APC*

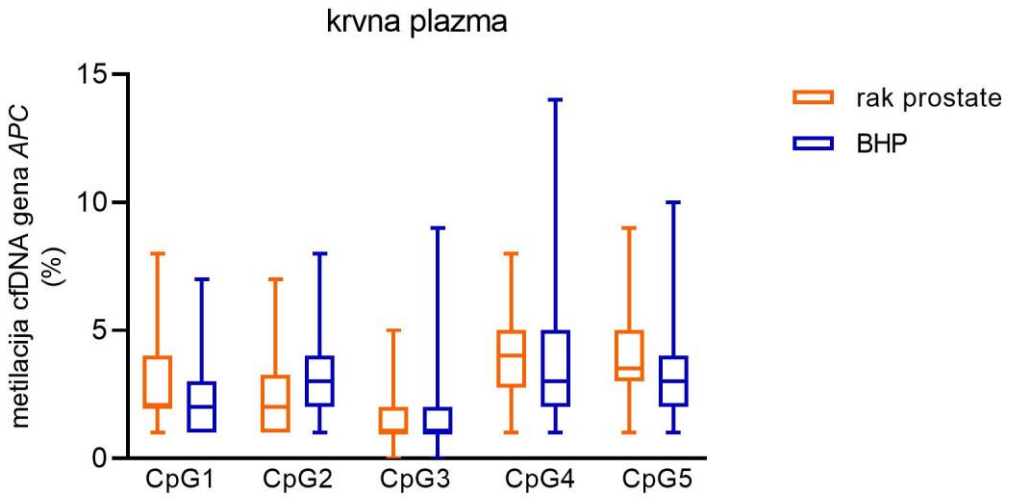
5.2.1. Analiza metilacije cfDNA gena *APC* u krvnoj plazmi

Analizom metilacije cfDNA gena *APC* u krvnoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om utvrđeno je da nema razlike između tih dviju skupina (Slika 12). Medijan metilacije cfDNA u krvnoj plazmi ispitanika s rakom prostate i BHP-om je bio jednak te je iznosio 3 %.



Slika 12. Prosječni postotak metilacije cfDNA gena *APC* u krvnoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

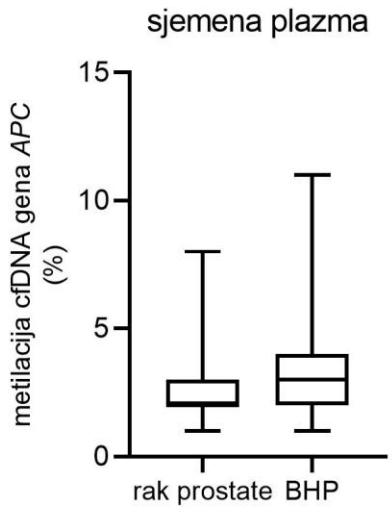
Učinjena je i statistička analiza metilacije cfDNA po pojedinim CpG mjestima kako bi se ispitalo postoji li razlika u metilaciji između pacijenata s rakom prostate i BHP-om u jednom od pet analiziranih CpG mjesta. Nigdje nije pronađena razlika u postotku metilacije između dviju skupina u analiziranim CpG mjestima (Slika 13).



Slika 13. Postotak metilacije cfDNA gena *APC* u krvnoj plazmi za pojedino CpG mjesto kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

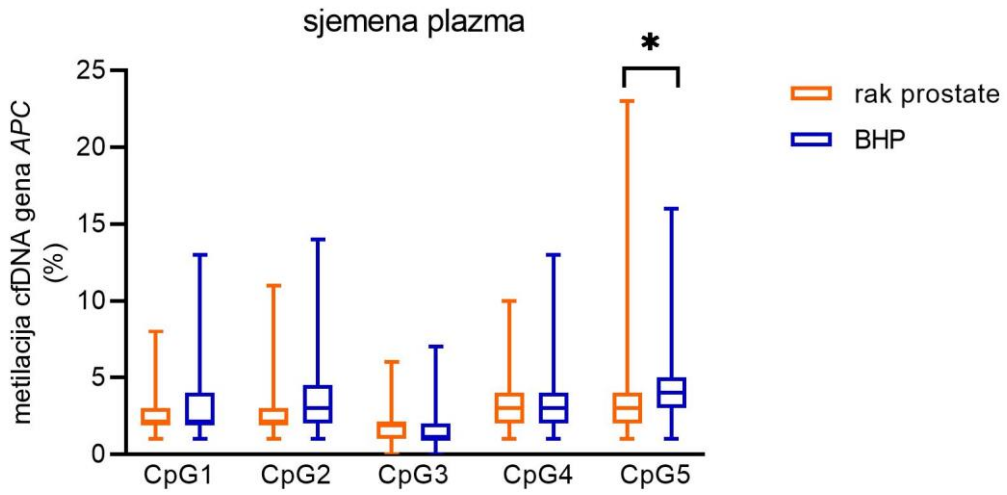
5.2.2. Analiza metilacije cfDNA gena *APC* u sjemenoj plazmi

Analizom metilacije cfDNA gena APC u sjemenoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om utvrđeno je da nema razlike između tih dviju skupina (Slika 14). Medijan metilacije DNA u krvnoj plazmi ispitanika s rakom prostate iznosio je 2 %, a s BHP-om 3 %, odnosno u obje skupine radilo se o izrazito niskoj metilaciji.



Slika 14. Prosječni postotak metilacije cfDNA gena *APC* u sjemenoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

Statistička analiza metilacije cfDNA gena *APC* u pojedinom CpG mjestu kod ispitanika s rakom prostate u odnosu na one s BHP-om pokazala je da u petom analiziranom CpG mjestu postoji statistički značajna razlika u metilaciji cfDNA u sjemenoj plazmi (Slika 15).

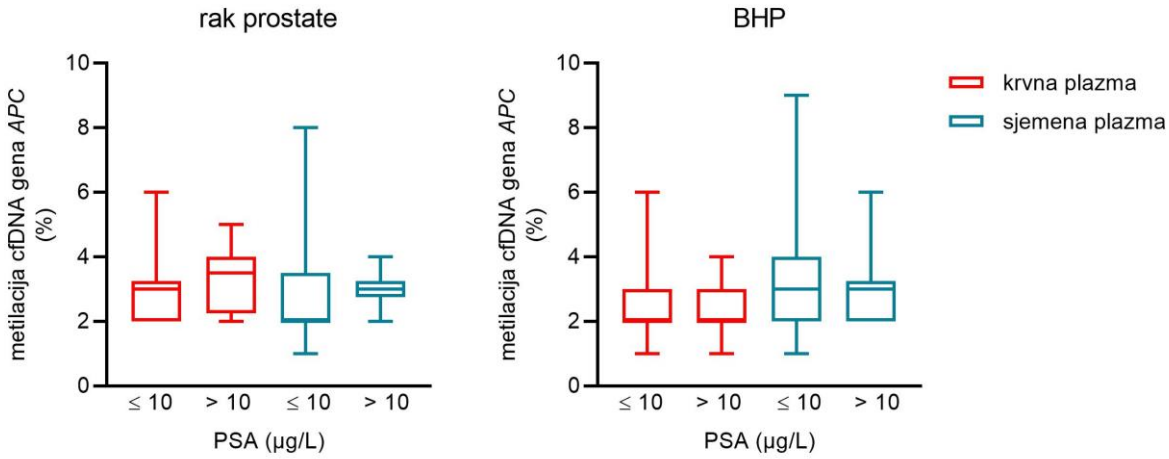


Slika 15. Postotak metilacije cfDNA gena *APC* u sjemenoj plazmi za pojedino CpG mjesto kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05).

Premda je kao jedan od ciljeva ovog rada bio odrediti osjetljivost i specifičnostimetilacije cfDNA gena *APC* kao biomarkera za rak prostate, navedeno nije bilo moguće učiniti. Naime, s obzirom na to da nije utvrđena statistički značajna razlika u metilaciji cfDNA gena *APC* u tekućinskim biopsijama, ne može se govoriti o osjetljivosti i specifičnosti biomarkera te je daljnja statistička obrada u tom smislu bila neopravdana.

5.2.3. Metilacija cfDNA gena *APC* u tekućinskim biopsijama i kliničke značajke

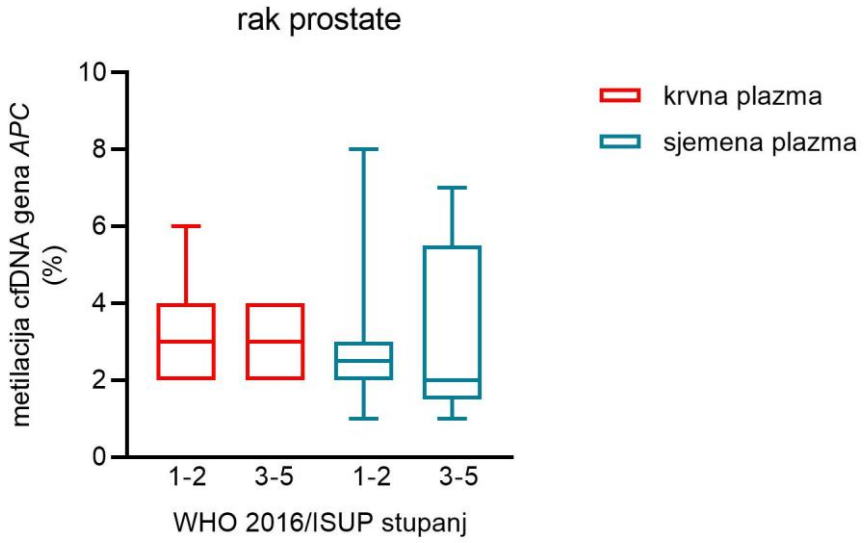
Unutar svake skupine ispitanika istraženo je postoji li razlika u prosječnoj metilaciji cfDNA gena *APC* kod osoba sa serumskom koncentracijom PSA većom od 10 µg/L u odnosu na one s vrijednošću manjom ili jednakom 10 µg/L s obzirom na to da se ta vrijednost smatra gornjom granicom tzv. „sive zone“. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika niti u krvnoj niti u sjemenoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate ili BHP-om (Slika 16).



Slika 16. Prosječan postotak metilacije cfDNA gena *APC* u krvnoj i sjemenoj plazmi ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Usporedba u uzorcima ispitanika sa serumskom koncentracijom PSA ≤ 10 µg/L („siva zona“) u odnosu na > 10 µg/L. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

Ispitano je također postoji li razlika u prosječnoj metilaciji cfDNA gena *APC* u krvnoj i sjemenoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate stupnja 1-3 prema WHO 2016/ISUP u odnosu na stupnjeve 3-5 koji imaju značajno lošiju prognozu. Statistička analiza nije pokazala postojanje

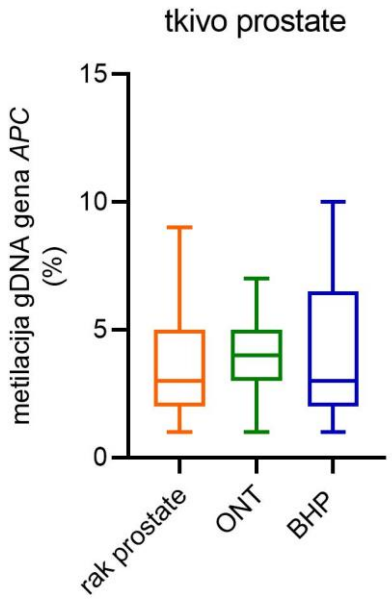
razlike između tih dviju prognostičkih skupina niti u jednoj od dvije vrste tekućinskih biopsija (Slika 17).



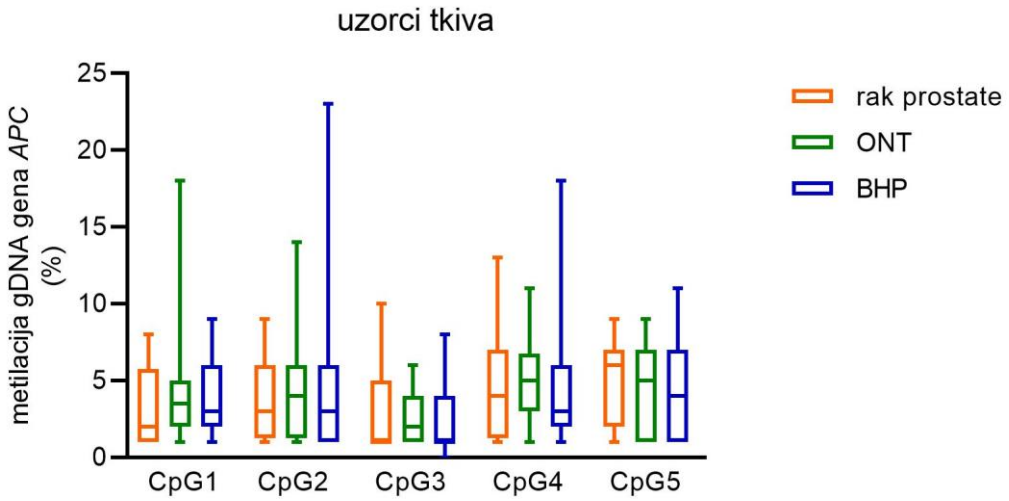
Slika 17. Prosječan postotak metilacije cfDNA gena *APC* u krvnoj i sjemenoj plazmi ispitanika s rakom prostate. Usporedba u uzorcima ispitanika čiji rak pripada WHO 2016/ISUP stupnju 1-2 u odnosu na stupanj 3-5 za koji je karakteristična lošija prognoza. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

5.2.4. Analiza metilacije gDNA gena *APC* u tkivu

U uzorcima tumorskog tkiva dobivenog radikalnom prostatektomijom, ONT-a i biopsije prostate s dijagnozom BHP-a analizirana je također metilacija gDNA gena *APC*. Nije uočena razlika između metilacije u tumorskom u odnosu na ONT, niti na razini prosječne, niti pojedinačne metilacije u analiziranim CpG mjestima. Nije zabilježena razlika u prosječnoj niti u pojedinačnoj metilaciji u uzorcima biopsije kod ispitanika s BHP-om u odnosu na tumorsko tkivo ili ONT. Navedeno je prikazano na Slici 18 i 19.



Slika 18. Prosječni postotak metilacije gDNA gena *APC* u uzorcima tumorskog tkiva dobivenog radikalnom prostatektomijom, ONT tih istih uzoraka i u uzorcima biopsija s potvrđenom dijagnozom BHP-a. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.



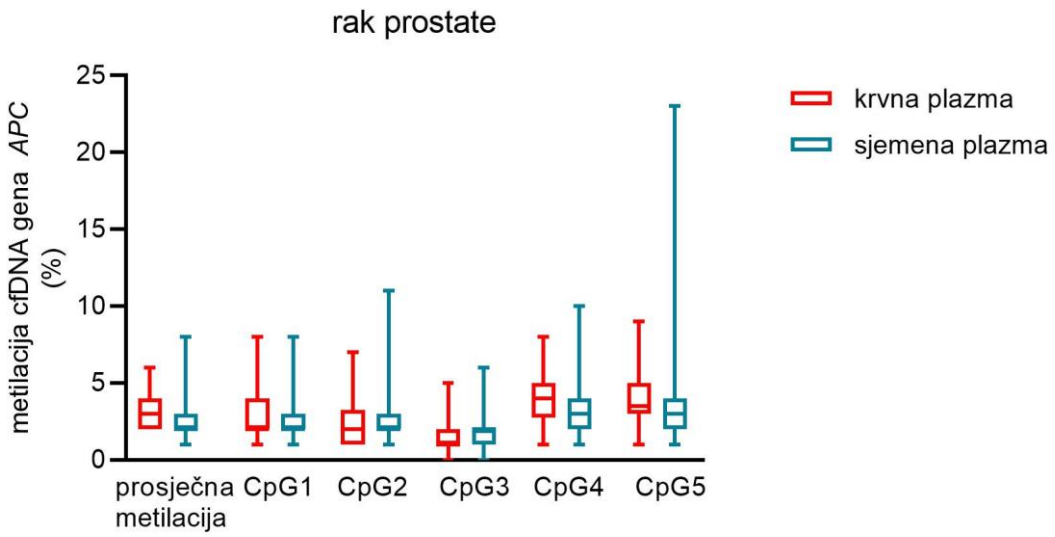
Slika 19. Postotak metilacije gDNA gena *APC* u u uzorcima tumorskog tkiva dobivenog radikalnom prostatektomijom, ONT tih istih uzoraka i u uzorcima biopsija s potvrđenom dijagnozom BHP-a za pojedino CpG mjesto. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

5.2.5. Analiza metilacije DNA gena *APC* unutar skupina ispitanika

Dodatno je učinjena statistička analiza metilacije cfDNA i gDNA unutar pojedine skupine ispitanika, tj. ispitano je postojanje razlika u prosječnoj i pojedinačnoj metilaciji DNA između krvne plazme, sjemene plazme i uzoraka tkiva kod ispitanika s rakom prostate, odnosno BHP-a.

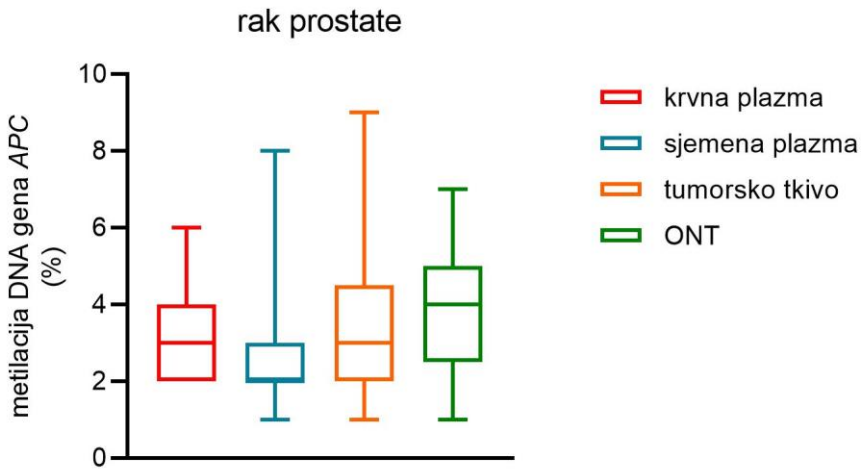
5.2.5.1. Analiza metilacije DNA gena APC unutar skupine ispitanika s rakom prostate

Statistička analiza nije pokazala postojanje razlike između prosječne, niti pojedinačne metilacije cfDNA u krvnoj u odnosu na sjemenu plazmu kod ispitanika s rakom prostate (Slika 20).



Slika 20. Postotak prosječne i pojedinačne metilacije po analiziranim CpG mjestima cfDNA gena *APC* u uzorcima krvne i sjemene plazme ispitanika s rakom prostate. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

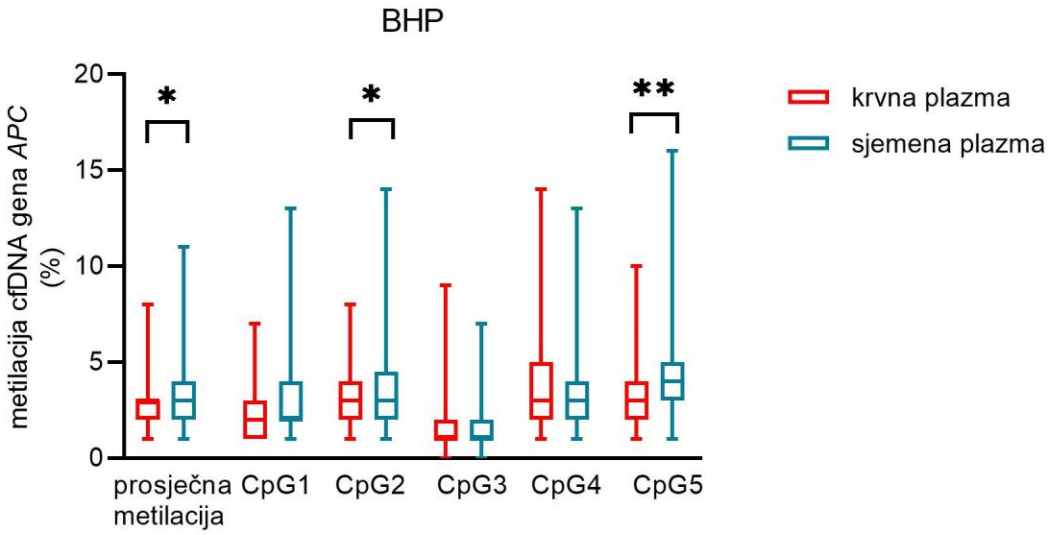
Nadalje, nije zabilježena razlika u prosječnoj metilaciji DNA između krvne plazme, sjemene plazme, tumorskog i ONT, što je analizirano kod 17 ispitanika od kojih su prikupljena sva četiri tipa uzoraka (Slika 21).



Slika 21. Postotak prosječne metilacije cfDNA i gDNA gena *APC* u uzorcima krvne i sjemene plazme te tumorskog tkiva i ONT ispitanika s rakom prostate. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

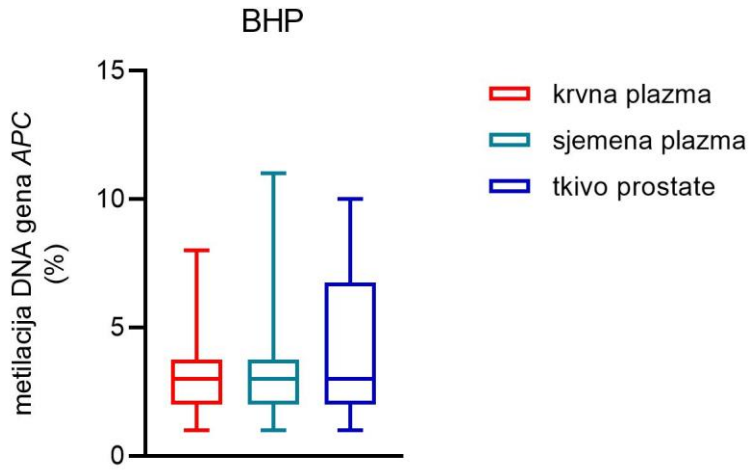
5.2.5.2. Analiza metilacije DNA gena *APC* unutar skupine ispitanika s BHP-om

Utvrđeno je da je prosječna metilacija cfDNA kod ispitanika s BHP-om veća u sjemenoj plazmi nego u krvnoj plazmi ($p = 0,0360$). Isto je uočeno u analiziranom drugom ($p = 0,0337$) i petom ($p = 0,0035$) CpG mjestu (Slika 22).



Slika 22. Postotak prosječne i pojedinačne metilacije po analiziranim CpG mjestima cfDNA gena *APC* u uzorcima krvne i sjemene plazme ispitanika s BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05, ** označava p-vrijednost ≤ 0,01).

Kod 44 ispitanika s BHP-om od kojih su prikupljeni i uzorci krvne i sjemene plazme te uzorci tkiva, nije utvrđena razlika u prosječnoj metilaciji DNA između navedenih skupina uzoraka (Slika 23).

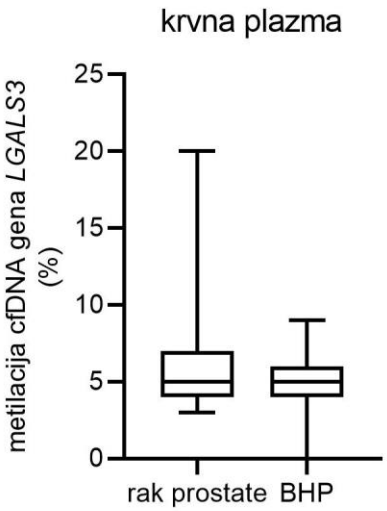


Slika 23. Postotak prosječne metilacije cfDNA i gDNA gena *APC* u uzorcima krvne i sjemene plazme te tkiva dobivenog biopsijom prostate ispitanika s BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

5.3. Analiza metilacije DNA gena *LGALS3*

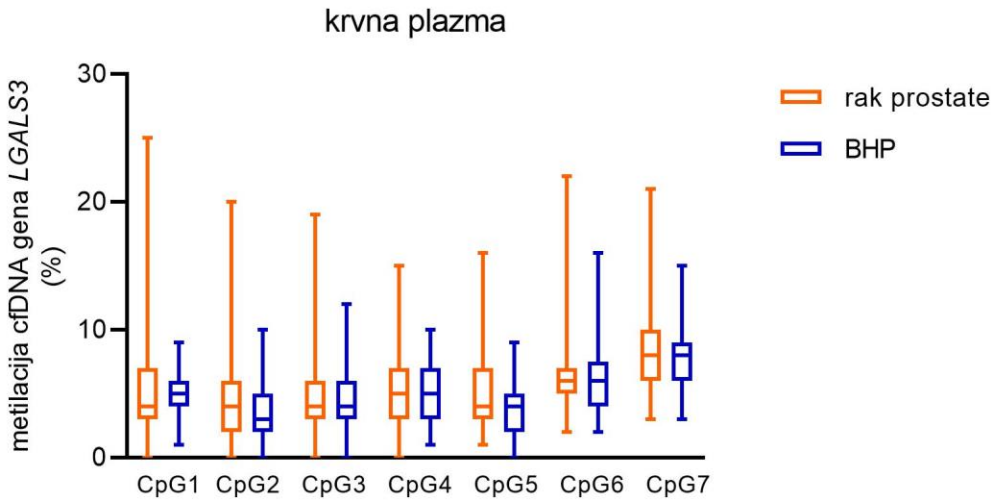
5.3.1. Analiza metilacije cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj plazmi

Analizom metilacije cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om utvrđeno je da nema razlike između tih dviju skupina (Slika 24). Medijan metilacije cfDNA u krvnoj plazmi ispitanika s rakom prostate i BHP-om je bio jednak te iznosio 5 %.



Slika 24. Prosječni postotak metilacije cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

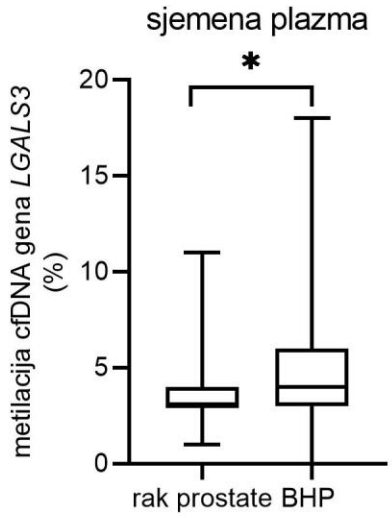
Učinjena je i statistička analiza metilacije cfDNA po pojedinim CpG mjestima kako bi se ispitalo postoji li razlika između pacijenata s rakom prostate i BHP-om u jednom od sedam analiziranih CpG mjesta. Nije pronađena razlika u postotku metilacije između dviju skupina u analiziranim CpG mjestima (Slika 25).



Slika 25. Postotak metilacije cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj plazmi za pojedino CpG mjesto kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

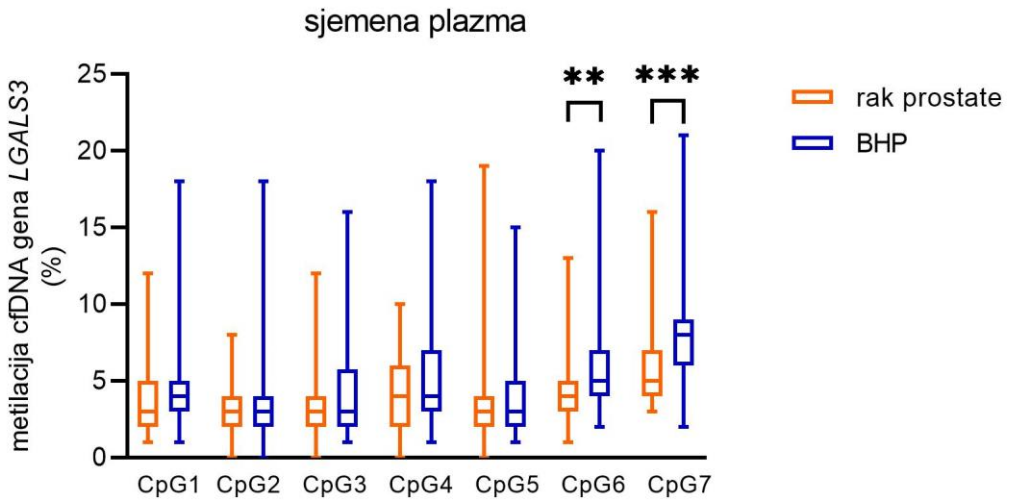
5.3.2. Analiza metilacije cfDNA gena *LGALS3* u sjemenoj plazmi

Analizom metilacije cfDNA gena *LGALS3* u sjemenoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između tih dviju skupina ($p = 0.0154$) (Slika 26). Medijan metilacije cfDNA u krvnoj plazmi ispitanika s rakom prostate iznosio je 3 %, a s BHP-om 4 %.



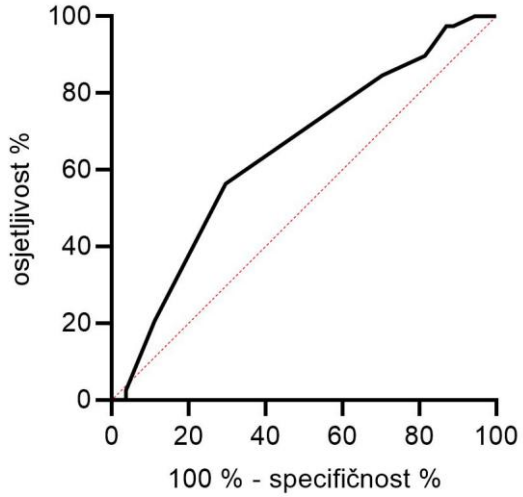
Slika 26. Prosječni postotak metilacije cfDNA gena *LGALS3* u sjemenoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05).

Statistička analiza metilacije cfDNA gena *LGALS3* u pojedinom CpG mjestu kod ispitanika s rakom prostate u odnosu na one s BHP-om pokazala je postoje statistički značajne razlika u metilaciji cfDNA u sjemenoj plazmi u određenim CpG mjestima (Slika 27), odnsono, metilacija cfDNA iz sjemene plazme je veća kod ispitanika s BHP-om u odnosu na one s rakom prostate u šestom (p = 0,0082) i sedmom (p=0,0005) CpG mjestu. Razlika u medijanu metilacije cfDNA najveća je u sedmom analizranom CpG mjestu gdje kod ispitanika s rakom prostate medijan iznosi 5 %, a kod ispitanika s BHP-om 8 %.



Slika 27. Postotak metilacije cfDNA gena *LGALS3* u sjemenoj plazmi za pojedino CpG mjesto kod ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (** označava p-vrijednost ≤ 0,01, *** označava p-vrijednost ≤ 0,001).

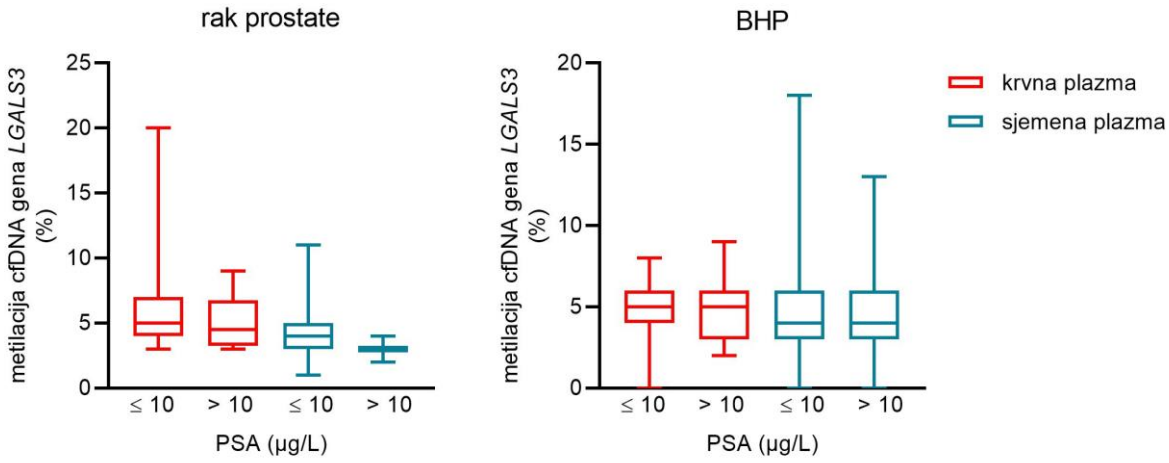
Jedan od ciljeva ovog rada bio je odrediti osjetljivost i specifičnost metilacije cfDNA gena *LGALS3* kao biomarkera za rak prostate. S obzirom na to da nije utvrđena statistički značajna razlika u metilaciji cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj plazmi, ne može se niti govoriti o osjetljivosti i specifičnosti biomarkera. Što se tiče metilacije cfDNA gena *LGALS3* u sjemenoj plazmi za koju je utvrđena statistički značajna razlika između raka prostate i BHP-a, napravljena je analiza ROC (engl. *receiver operating characteristics*) krivulje koja stavlja u odnos specifičnost i osjetljivost. ROC krivulja rezultirala je površinom ispod krivulje (engl. *area under curve,* AUC) od 0,6443 (Slika 28). Izračunavanjem Youden indeksa (osjetljivost (%) + specifičnost (%) – 100) dobivena je *cut-off* vrijednost prosječne metilacije cfDNA gena *LGALS3* u kojoj je kombinacija osjetljivosti i specifičnosti najveća. Utvrđeno je da pri prosječnoj metilaciji cfDNA iz sjemene plazme gena *LGALS3* nižoj od 3,5 %, osjetljivost za rak prostate iznosi 56,4 %, a specifičnost 70,4 %.



Slika 28. ROC krivulja za prosječnu metilaciju cfDNA gena *LGALS3* u sjemenoj plazmi za razlikovanje raka prostate od BHP-a.

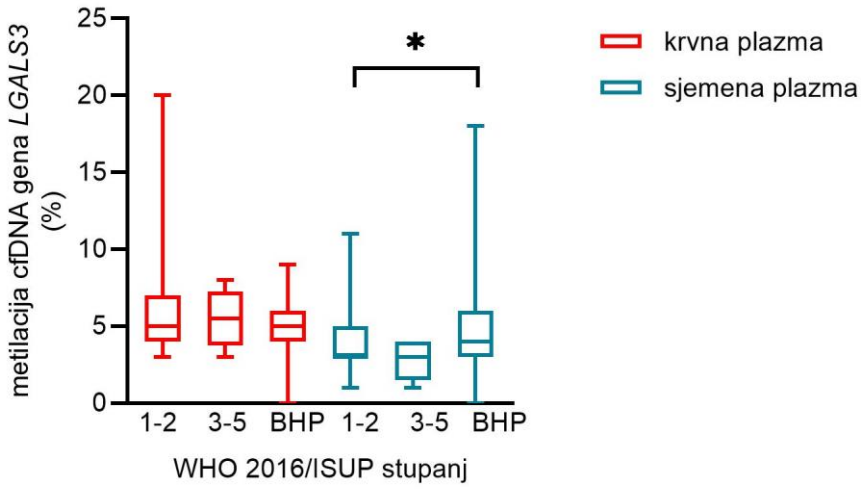
5.3.3. Metilacija cfDNA gena *LGALS3* u tekućinskim biopsijama i kliničke značajke

Unutar svake skupine ispitanika istraženo je postoji li razlika u prosječnoj metilaciji cfDNA gena *LGALS3* kod osoba sa serumskom koncentracijom PSA većom od 10 µg/L u odnosu na one s vrijednošću manjom ili jednakom 10 µg/L, s obzirom na to da se ta vrijednost smatra gornjom granicom tzv. „sive zone“. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika niti u krvnoj niti u sjemenoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate ili BHP-om (Slika 29).



Slika 29. Prosječan postotak metilacije cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj i sjemenoj plazmi ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Usporedba u uzorcima ispitanika sa serumskom koncentracijom PSA ≤ 10 µg/L („siva zona“) u odnosu na > 10 µg/L. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

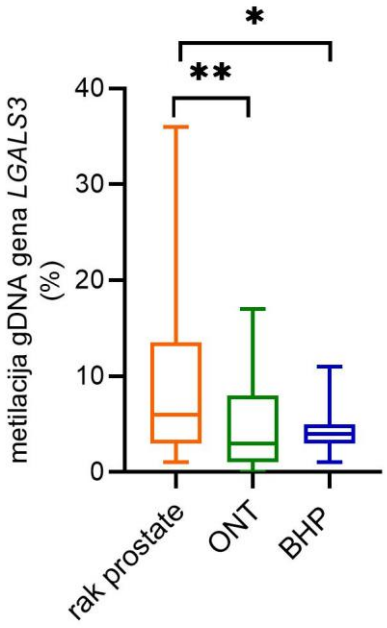
Ispitano je i postojanje razlike u prosječnoj metilaciji cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj i sjemenoj plazmi kod ispitanika s rakom prostate stupnja 1-3 prema WHO 2016/ISUP u odnosu na stupnjeve 3-5. Statistička analiza nije pokazala postojanje razlike između tih dviju prognostičkih skupina niti u jednoj od dvije vrste tekućinskih biopsija Zabilježeno je postojanje statistički značajne razlike između prosječne metilacije u ispitanika s rakom prostate WHO 2016/ISUP stupnja 1-2 naspram ispitanika s BHP-om ($p = 0,0303$), iako je medijan vrlo sličan. Iako grafički prikaz navodi na moguće postojanje razlike za drugu prognostičku skupinu naspram BHP-a, ono nije zabilježeno, ali je p iznosio 0,0526 (Slika 30).



Slika 30. Prosječan postotak metilacije cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj i sjemenoj plazmi ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Usporedba podataka dobivenih kod ispitanika čiji rak pripada WHO 2016/ISUP stupnju 1-2 u odnosu na stupanj 3-5 i na BHP. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću (* označava p-vrijednost < 0,05).

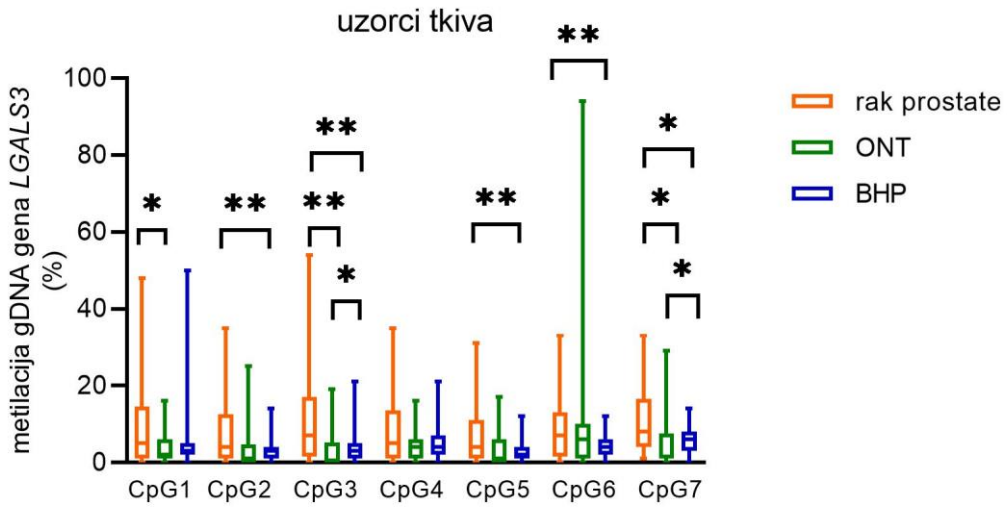
5.3.4. Analiza metilacije gDNA gena *LGALS3* u tkivu

U uzorcima tumorskog tkiva dobivenog radikalnom prostatektomijom, ONT-a i biopsija prostate s dijagnozom BHP-a također je analizirana metilacija gDNA gena *LGALS3*. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između prosječne metilacije gDNA u tumorskom u odnosu na ONT (Slika 30, p = 0,0093) te između tumorskog tkiva i BHP-a (Slika 31, p = 0,0367). U oba slučaja prosječna metilacija gDNA je veća u tumorskom tkivu.



Slika 31. Prosječni postotak metilacije gDNA gena *LGALS3* u uzorcima tumorskog tkiva dobivenog radikalnom prostatektomijom, ONT tih istih uzoraka i u uzorcima biopsija s potvrđenom dijagnozom BHP-a. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05, ** označava p-vrijednost ≤ 0,01).

Analizirana je i metilacija po CpG mjestima kod istih skupina uzoraka te je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između tumorskog tkiva i ONT u prvom, trećem i sedmom CpG mjestu. Vjerojatno je da zbog jednog uzorka ONT s izrazito visokom metilacijom (94 %, Slika 31) nije utvrđena statistički značajna razlika u metilaciji u šestom analiziranom CpG mjestu. Daljnjom usporedbom utvrđeno je da je metilacija gDNA statistički značajno veća kod tumorskog u odnosu na tkivo BHP u drugom, trećem, petom, šestom i sedmom CpG mjestu. Zabilježena je također statistički značajno različita metilacija između ONT i tkiva BHP-a u trećem i sedmom CpG mjestu (Slika 32).



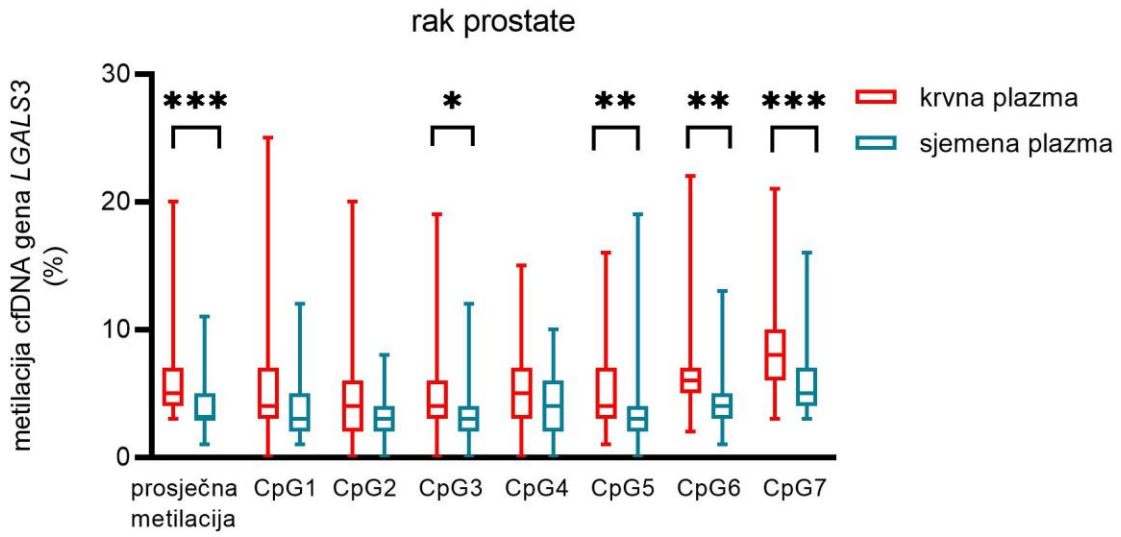
Slika 32. Postotak metilacije gDNA gena *LGALS3* u u uzorcima tumorskog tkiva dobivenog radikalnom prostatektomijom, ONT tih istih uzoraka i u uzorcima biopsija s potvrđenom dijagnozom BHP-a za pojedino CpG mjesto. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05, ** označava p-vrijednost ≤ 0,01, *** označava p-vrijednost ≤ 0,001).

5.3.5. Analiza metilacije DNA gena *LGALS3* unutar skupina ispitanika

Učinjena je statistička analiza metilacije cfDNA i gDNA unutar pojedine skupine ispitanika, tj. ispitano je postoji li razlika u prosječnoj i pojedinačnoj metilaciji između krvne plazme, sjemene plazme i uzoraka tkiva kod ispitanika s rakom prostate, odnosno BHP-a.

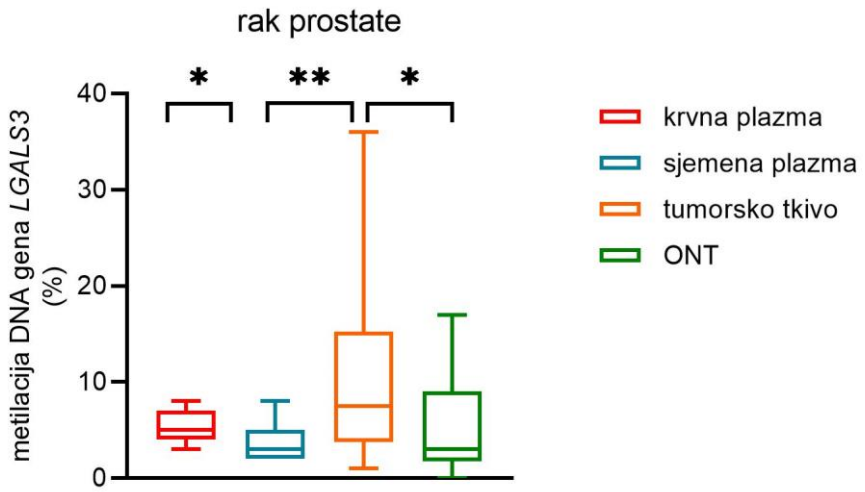
5.3.5.1. Analiza metilacije DNA gena *LGALS3* unutar skupine ispitanika s rakom prostate

Statistička analiza pokazala je da je prosječna metilacija cfDNA kod ispitanika s rakom prostate veća u uzorcima krvne u odnosu na sjemenu plazmu (p = 0.0009). Utvrđeno je također da je to posljedica statistički značajno više metilacije u krvnoj plazmi u analizranom trećem (p = 0,0331), petom (p = 0.,047), šestom (p = 0,0024) i sedmom (p = 0,0001) CpG mjestu. Navedeno je prikazano na Slici 33.



Slika 33. Postotak prosječne i pojedinačne metilacije po analiziranim CpG mjestima cfDNA gena *LGALS3* u uzorcima krvne i sjemene plazme ispitanika s rakom prostate. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05, ** označava p-vrijednost ≤ 0,01, *** označava p-vrijednost ≤ 0,001).

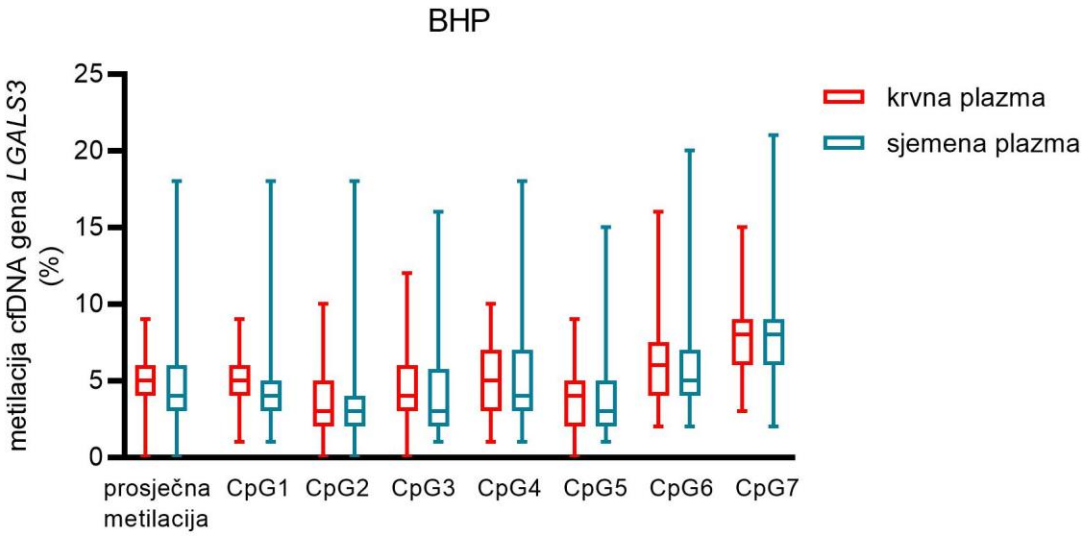
Kod 18 ispitanika s rakom prostate od kojih su prikupljene sve četiri vrste uzoraka (krvna i sjemena plazma, tumorsko i ONT) pokazalo se da je metilacija DNA u tumorskom tkivu statistički značajno veća od one u ONT te od one u sjemenoj plazmi (Slika 34).



Slika 34. Postotak prosječne metilacije cfDNA i gDNA gena *LGALS3* u uzorcima krvne i sjemene plazme te tumorskog i ONT ispitanika s rakom prostate. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05, ** označava p-vrijednost ≤ 0,01).

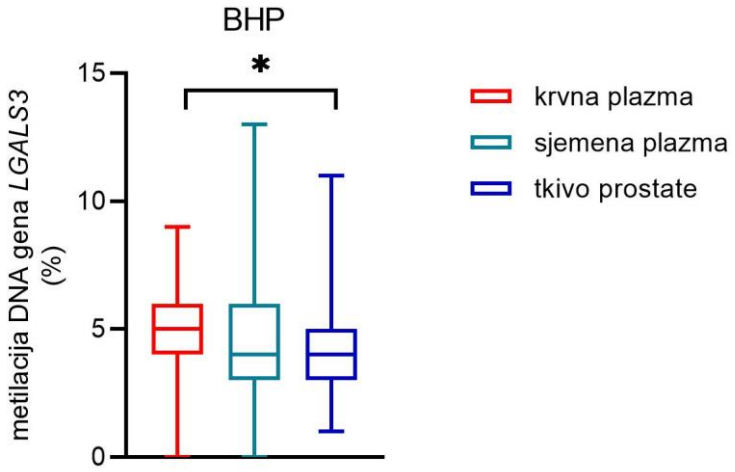
5.3.5.2. Analiza metilacije DNA gena *LGALS3* unutar skupine ispitanika s BHP-om

Statistička analiza nije pokazala postojanje razlike između prosječne, niti pojedinačne metilacije cfDNA u krvnoj u odnosu na sjemenu plazmu kod ispitanika s BHP-om (Slika 35).



Slika 35. Postotak prosječne i pojedinačne metilacije po analiziranim CpG mjestima cfDNA gena *LGALS3* u uzorcima krvne i sjemene plazme ispitanika s BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

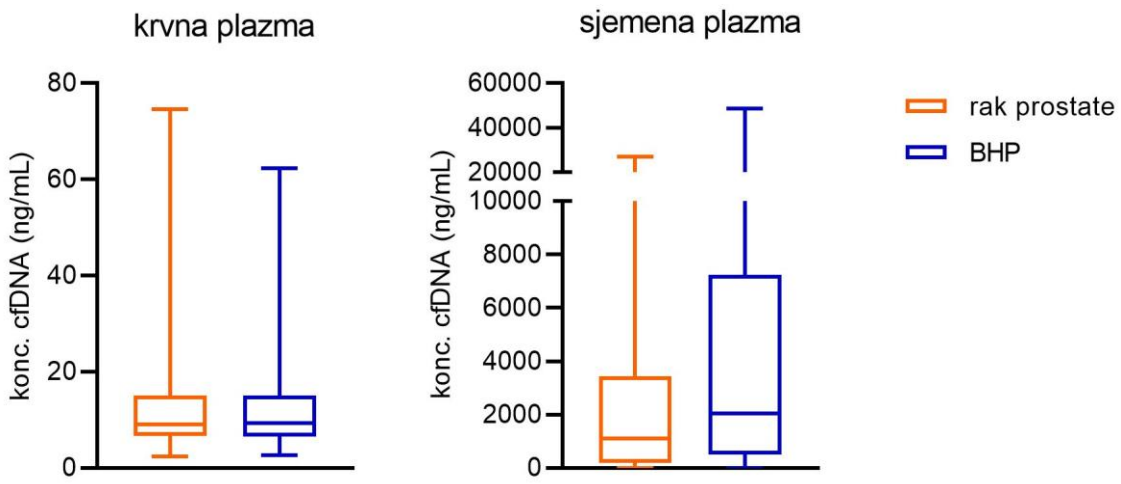
Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u metilaciji DNA između krvne plazme i BHP tkiva, iako se u oba slučaja radi o prilično niskom postotku metilacije (Slika 36).



Slika 36. Postotak prosječne metilacije cfDNA i gDNA gena *LGALS3* u uzorcima krvne i sjemene plazme te tkiva dobivenog biopsijom prostate ispitanika s BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05).

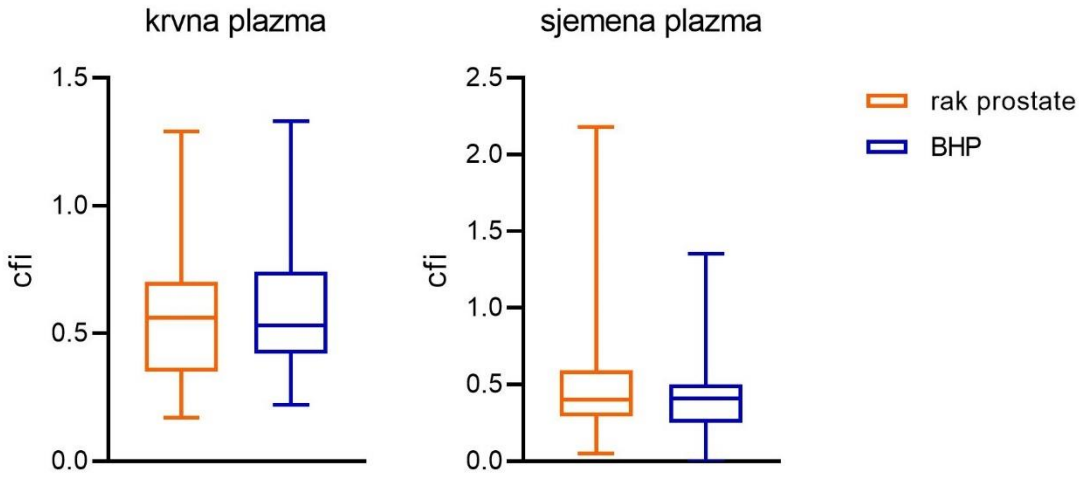
5.4. Analiza kvantifikacije cfDNA

Lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu mjereći ekspresiju kratkog fragmenta LINE-1 elementa kvantificiran je cfDNA u uzorcima krvne i sjemene plazme ispitanika. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji cfDNA između ispitanika s rakom prostate i onih s BHP-om, niti u krvnoj ($p = 0,9264$), niti u sjemenoj ($p = 0,0616$) plazmi. Kao što je vidljivo na Slici 37, medijani koncentracije cfDNA izražene kao ng po mL plazme su vrlo slični u krvnoj plazmi te iznose oko 10 ng/mL u obje skupine ispitanika. U sjemenoj plazmi medijan koncentracije cfDNA je gotovo dvostruko veći kod ispitanika s BHP-om te je interkvartilni raspon također širi u toj skupini u odnosu na ispitanike s rakom prostate. Vidljivo je također da koncentracije cfDNA puno značajnije variraju u sjemenoj, nego u krvnoj plazmi kod obje skupine ispitanika.



Slika 37. Koncentracija cfDNA u uzorcima krvne i sjemene plazme ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

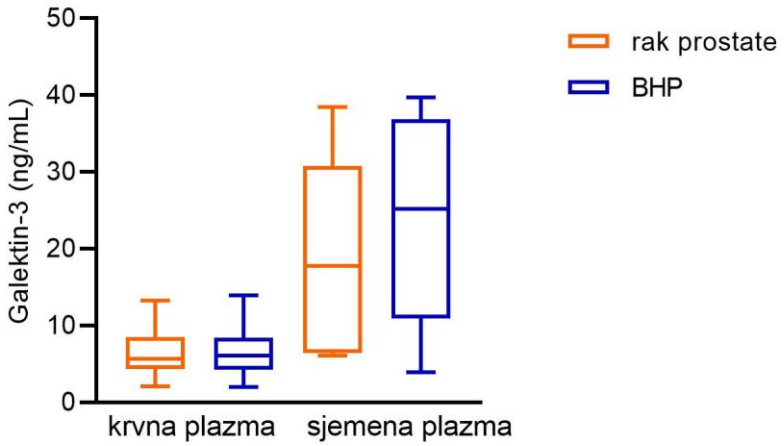
Analiza kratkih i dugih LINE-1 fragmenata qPCR-om omogućila je izračun cfi, kao što je opisano u poglavlju Materijali i metodam. Nije uočena razlika između cfi-ja u krvnoj ili sjemenoj plazmi između dviju skupina ispitanika (Slika 38). Medijani cfi-ja u krvnoj i sjemenoj plazmi vrlo su slični u obje skupine ispitanika, što govori o tome da ima podjednako kraćih i dužih cfDNA molekula u uzorcima obiju skupina ispitanika.



Slika 38. cfi u uzorcima krvne i sjemene plazme ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

5.5. Analiza kvantifikacije Gal-3 u krvnoj i sjemenoj plazmi

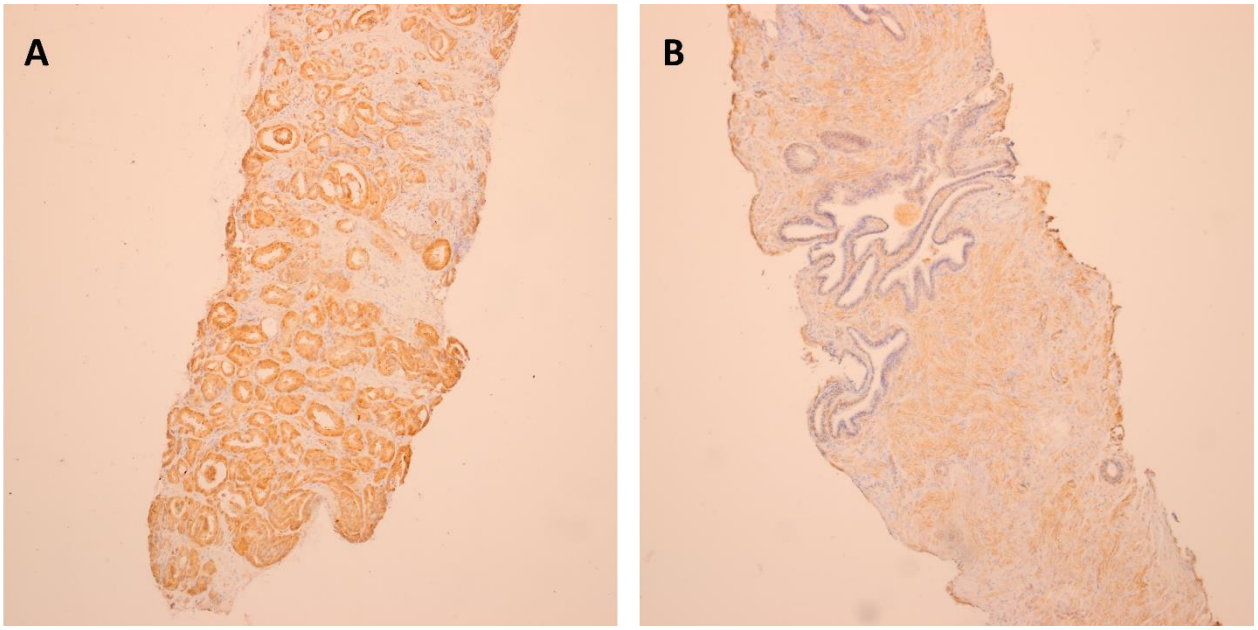
Mjerenjem koncentracije proteina Gal-3 u krvnoj i sjemenoj plazmi kod određenih ispitanika te analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između dviju skupina niti u jednoj od analiziranih tekućinskih biopsija (Slika 39). Analiza je na kraju uspješno napravljena na svim uzorcima krvne plazme koji su uključeni za mjerenje koncentracije Gal-3 te na 18 (6 s rakom prostate i 12 s BHP-om) od 24 uzoraka sjemene plazme jer je 6 uzoraka i nakon razrjeđenja imalo koncentraciju višu od gornje granice linearnosti metode.



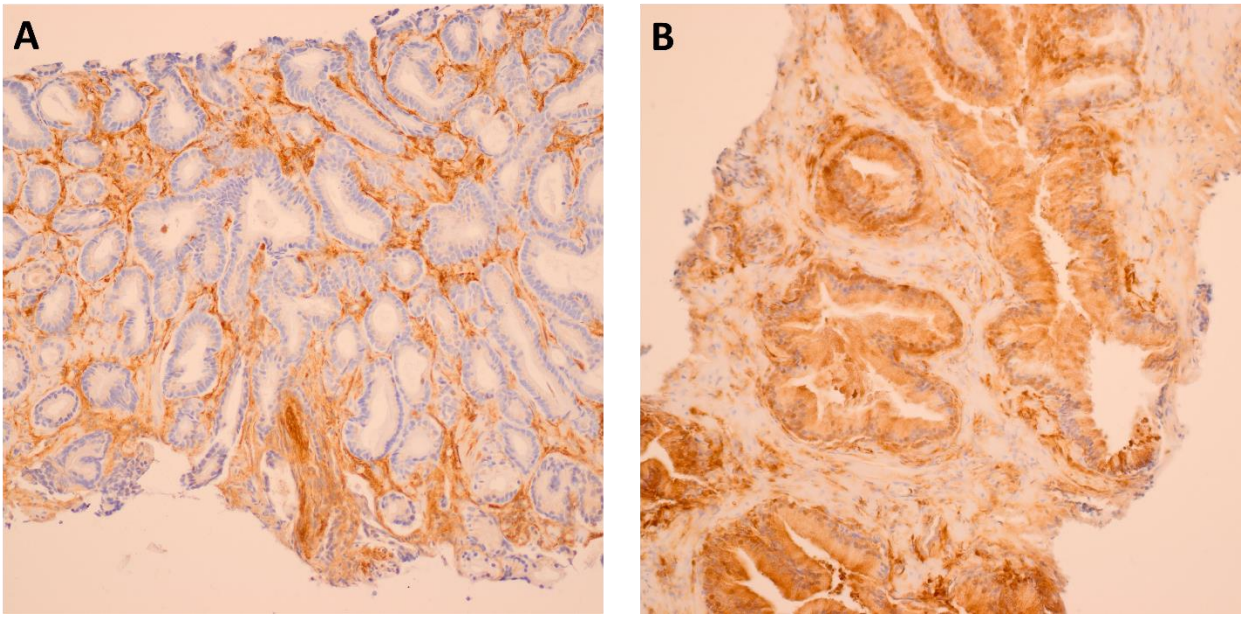
Slika 39. Koncentracija Gal-3 (ng/mL) u uzorcima krvne i sjemene plazme ispitanika s rakom prostate i BHP-om. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

5.6. Imunohistokemijska analiza proteina APC i Gal-3 u uzorcima tkiva dobivenih od bolesnika s rakom prostate ili BHP-om

Rezultati imunohistokemijske analize proteina APC i Gal-3 analizirani su u stromi i epitelu uzoraka biopsije raka prostate i BHP-a (Slike 40 i 41) te u uzorcima radikalne prostatektomije. U slučaju uzoraka bioptata, uspoređena je ekspresija gena *APC* i *LGALS3* na proteinskoj razini između raka prostate i ONT, raka prostate i BHP-a te BHP-a i ONT-a u epitelu te u stromi tkiva prostate. U uzorcima radikalne prostatektomije, međusobno je uspoređena ekspresija proteina u epitelu i stromi tumorskog tkiva i ONT-a te usporedba s tkivom BHP-a iz uzoraka bioptata.



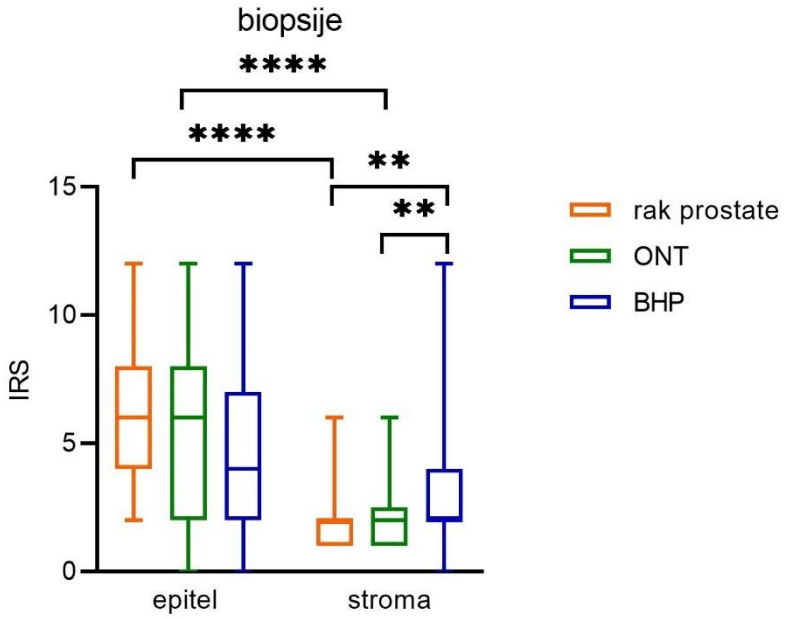
Slika 40. Intenzitet ekspresije APC. A. Biopsijski cilindar raka prostate, snažno obojen tumorski epitel i neobojena stroma, x100. B. Biopsijski cilindar BHP-a, obojena stroma i neobojen epitel, x100. DAB, pozadinsko obojenje hemalaun.



Slika 41. Intenzitet ekspresije Gal-3. A. Biopsijski cilindar raka prostate, neobojen tumorski epitel i obojena stroma, x200. B. Biopsijski cilindar BHP-a, obojen epitel i neobojena stroma, x100. DAB, pozadinsko obojenje hemalaun.

5.6.1. Imunohistokemijska analiza proteina APC u bioptatima prostate

Analizom ekspresije APC u uzorcima biopsije pokazalo se da u stromi postoji statistički značajno veća ekspresija proteina APC u BHP u odnosu na rak prostate ($p = 0,0018$) te u odnosu na ONT ($p = 0,0025$). Nasuprot tome, pokazalo se da u epitelu prostate istih uzoraka nema statistički značajne razlike, ali je važno istaknuti da je p-vrijednost za uspoređivanje raka prostate i BHP-a iznosila 0,0583. Postoji statistički značajno veća ekspresija APC u epitelu u odnosu na stromu u uzorcima tumorskog tkiva ($p < 0,0001$) te ONT ($p < 0,0001$), dok ona nije zabilježena u tkivu BHP-a ($p = 0,0598$). Navedeni podaci su prikazani na Slici 42.

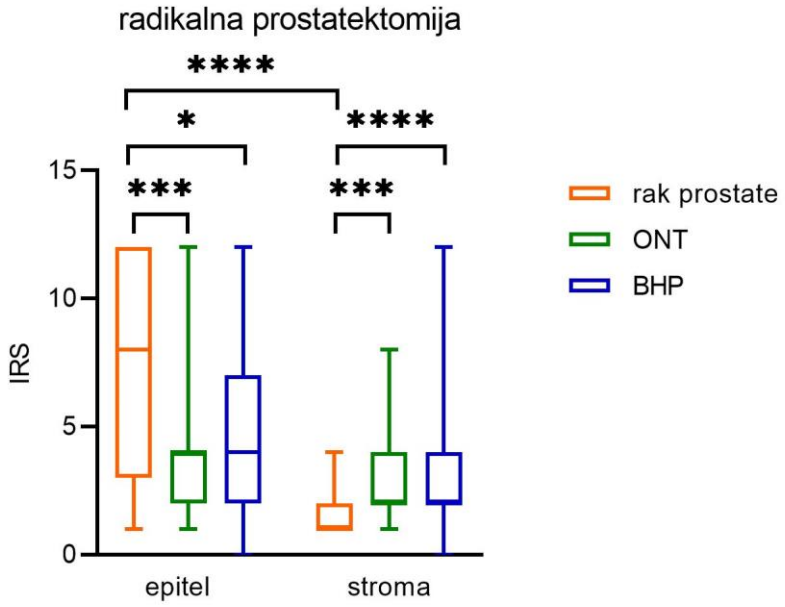


Slika 42. Razina ekspresije proteina APC u epitelu i stromi bioptata prostate ispitanika s rakom prostate (tumorsko tkivo i ONT) i BHP-om, izražena kao IRS. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (** označava p-vrijednost ≤ 0,01, **** označava p-vrijednost ≤ 0,0001).

5.6.2. Imunohistokemijska analiza proteina APC u uzorcima radikalne prostatektomije

Analizom ekspresije APC u uzorcima radikalne prostatektomije utvrđeno je da postoji statistički značajno veća ekspresija u epitelu tumorskog tkiva u odnosu na ONT ($p = 0,0006$), dok je

ekspresija značajno manja u stromi tumorskog tkiva (p = 0,0003) (Slika 43). Isti odnos potvrđen statistički značajnom p-vrijednošću (za epitel p = 0,0302, za stromu p < 0,0001) zabilježen je usporedbom rezultata dobivenih za epitel i stromu tumorskog tkiva s BHP-om. U tumorskom tkivu također postoji statistički značajno viša ekspresija u epitelu u odnosu na stromu (p < 0,0001), dok u ONT-u nije zabilježena razlika. Nema razlike u epitelnoj ili stromalnoj ekspresiji APC između ONT-a u radikalnoj prostatektomiji i BHP-a.

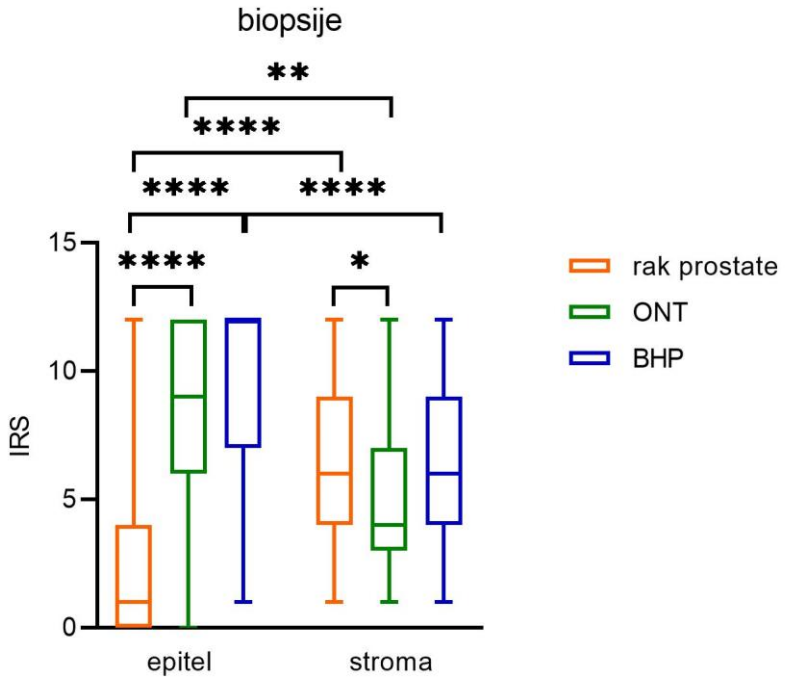


Slika 43. Razina ekspresije proteina APC u epitelu i stromi uzoraka radikalne prostatektomije ispitanika s rakom prostate izražena kao IRS, uspoređena s ONT u istim uzorcima te uzorcima bioptata BHP-a. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05, *** označava p-vrijednost ≤ 0,001, **** označava p-vrijednost ≤ 0,0001).

5.6.3. Imunohistokemijska analiza proteina Gal-3 u bioptatima prostate

Analizom ekspresije Gal-3 u uzorcima biopsije utvrđeno je da u epitelu postoji statistički značajno manja ekspresija u tumorskom tkivu u odnosu na ONT (p < 0,0001) te u odnosu na BHP (p < 0,0001). Međutim, pokazalo se da u stromi tumorskog tkiva bioptata prostate je ekspresija Gal-3 nešto veća u odnosu na ONT (p = 0,0302), dok u odnosu na BHP nema razlike. Analiza je pokazala da postoji statistički značajno veća ekspresija Gal-3 u stromi u odnosu na

epitel u uzorcima tumorskog tkiva ($p < 0,0001$), a obrnuto je zabilježeno u uzorcima bioptata BHP-a ($p < 0,0001$) i ONT-a ($p = 0,0011$). Prikaz navedenih rezultata nalazi se na Slici 44.

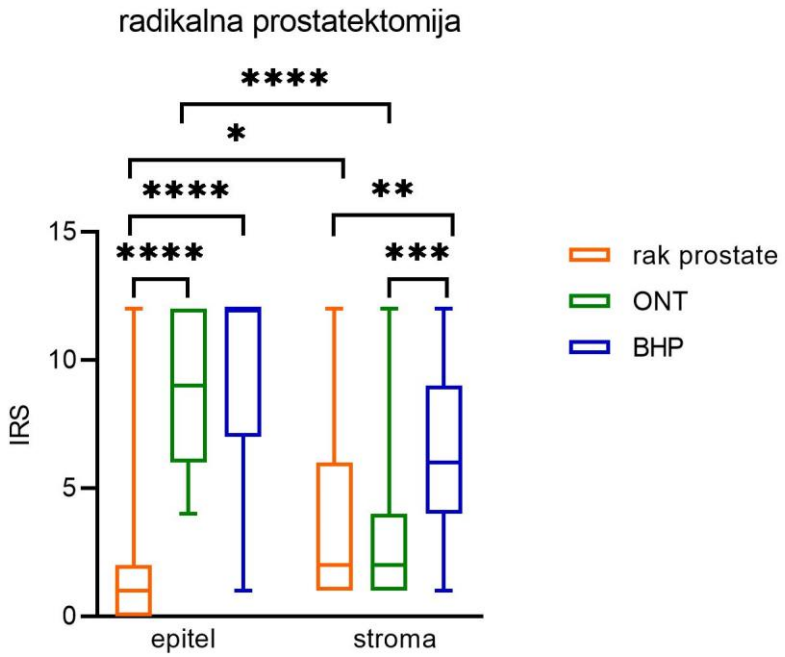


Slika 44. Razina ekspresije proteina Gal-3 u epitelu i stromi bioptata prostate ispitanika s rakom prostate (tumorsko i ONT) i BHP-om, izražena kao IRS. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05, ** označava p-vrijednost ≤ 0,01, **** označava p-vrijednost ≤ 0,0001).

5.6.4. Imunohistokemijska analiza proteina Gal-3 u uzorcima radikalne prostatektomije

Analizom ekspresije proteina Gal-3 u uzorcima radikalne prostatektomije pokazalo se da postoji statistički značajno manja ekspresija u epitelu tumorskog tkiva u odnosu na ONT u istim uzorcima ($p < 0,0001$) te u odnosu na BHP ($p < 0,0001$). U stromi je zabilježen jednak odnos između tumorskog tkiva i BHP-a ($p = 0,0048$), ali nema razlike u odnosu na ONT. No, ekspresija u ONT-u uzoraka radikalne prostatektomije je statistički značajno niža u odnosu na BHP-a iz uzoraka bioptata ispitanika s BHP-om ($p = 0,0005$). Nadalje, u tumorskom tkivu postoji

statistički značajno manja ekspresija u epitelu u odnosu na stromu (p = 0,0136), dok je u ONT-u stanje obrnuto (p < 0,0001). Prikaz navedenih rezultata nalazi se na Slici 45.



Slika 45 Razina ekspresije proteina Gal-3 u epitelu i stromi uzoraka radikalne prostatektomije ispitanika s rakom prostate izražena kao IRS, uspoređena s ONT u istim uzorcima te uzorcima bioptata BHP-a. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05, ** označava p-vrijednost ≤ 0,01, *** označava p-vrijednost ≤ 0,001, **** označava p-vrijednost ≤ 0,0001).

5.7. Korelacijske analize

5.7.1. Korelacijske analize metilacije gDNA i tkivne ekspresije na proteinskoj razini

Kako bi se istražilo postoji li povezanost metilacije gDNA izolirane iz uzoraka tkiva (radikalna prostatektomija kod ispitanika s rakom prostate i bioptati prostate kod ispitanika s BHP-om), Spearmanovom korelacijskom analizom ispitana je povezanost prosječne metilacije gDNA gena *APC* i *LGALS3* te pripadajuće proteinske ekspresije analizrane imunohistokemijski. Istražena je povezanost metilacije gDNA s proteinskom ekspresijom u epitelu i stromi tkiva prostate te u slučaju radikalne prostatektomije pojedinačno za tumorsku i ONT komponentu. Utvrđeno je da

metilacija gDNA nije u korelaciji s proteinskom ekspresijom u tkivu niti za jedan od dva gena (Tablica 13).

Tablica 13. Korelacijska analiza prosječne metilacije gDNA gena *APC* i *LGALS3* i proteinske ekspresije u tkivu. Prikazani su Spearmanovi korelacijski koeficijenti i pripadajuće p-vrijednosti.

	proteinska ekspresija u tkivu					
prosječna metilacija gDNA	tumorsko tkivo - epitel	tumorsko tkivo - stroma	ONT - epitel	ONT - stroma	biopsija BHP - epitel	biopsija BHP - stroma
APC	r = -0,012 (p = 0,958)	r = -0,218 (p = 0,329)	r = -0,119 (p = 0,637)	r = -0,057 (p = 0,823)	r = 0,1397 (p = 0,378)	r = -0,215 (p = 0,172)
LGALS3	r = -0,122 (p = 0,589)	r = -0,126 (p = 0,577)	r = 0,163 (p = 0,505)	r = 0,425 (p = 0,070)	r = -0,175 (p = 0,256)	r = 0,009 (p = 0,956)

5.7.2. Korelacijske analize koncentracije Gal-3 i prosječne metilacije cfDNA gena *LGALS3* u tekućinskim biopsijama

Ispitivanje povezanosti koncentracije Gal-3 određene u krvnoj i sjemenoj plazmi dijela ispitanika u obje skupine s prosječnom metilacijom cfDNA gena *LGALS3* provedeno je pomoću Spearmanove korelacijske analize. Kod ispitanika s rakom prostate pronađena je pozitivna povezanost koncentracije Gal-3 u krvnoj plazmi s prosječnom metilacijom gena *LGALS3* u cfDNA izoliranoj iz sjemene plazme (r = 0,490, p = 0,020). U skupini ispitanika s BHP-om nije pronađena povezanost (Tablica 14).

Tablica 14. Korelacijska analiza koncentracije Gal-3 u krvnoj i sjemenoj plazmi ispitanika i prosječne metilacije cfDNA gena *LGALS3*. Prikazani su Spearmanovi korelacijski koeficijenti i pripadajuće p-vrijednosti.

	prosječna metilacija cfDNA gena *LGALS3*			
	rak prostate		BHP	
konc. Gal-3	krvna plazma	sjemena plazma	krvna plazma	sjemena plazma
krvna plazma	r = 0,100 (p = 0,641)	r = 0,490 (p = 0,020)	r = -0,239 (p = 0,181)	r = -0,102 (p = 0,578)
sjemena plazma	r = -0,227 (p = 0,666)	r = -0,621 (p = 0,188)	r = 0,143 (p = 0,656)	r = -0,022 (p = 0,949)

5.7.3. Korelacijske analize prosječne metilacije cfDNA s kliničkim parametrima ispitanika

U skupini ispitanika s rakom prostate, pomoću Spearmanove korelacijske analize ispitano je postojanje povezanosti prosječne metilacije cfDNA analiziranih gena s dobi, serumskom koncentracijom PSA, Gleason zbrojem i WHO 2016/ISUP skupinom. U skupini ispitanika s BHP-om također je napravljena ista analiza, izuzev parametara karakterističnih za rak prostate (Gleason zbroj i WHO 2016/ISUP skupina). Kao što je vidljivo u Tablici 15, nije utvrđeno postojanje povezanosti između nijednog parametra i prosječne metilacije cfDNA analiziranih gena.

Tablica 15. Korelacijska analiza prosječne metilacije cfDNA gena *APC* i *LGALS3* i kliničkih parametara ispitanika. Prikazani su Spearmanovi korelacijski koeficijenti i pripadajuće p-vrijednosti.

			rak prostate		BHP	
prosječna metilacija cfDNA	dob	PSA	Gleason zbroj	WHO 2016/ISUP skupina	dob	PSA
krvna plazma *APC*	r = -0,034 (p = 0,832)	r = 0,129 (p = 0,420)	r = -0,123 (p = 0,437)	r = 0,087 (p = 0,583)	r = -0,200 (p = 0,144)	r = -0,079 (p = 0,567)
sjemena plazma *APC*	r = -0,177 (p = 0,280)	r = 0,129 (p = 0,655)	r = -0,045 (p = 0,784)	r = -0,035 (p = 0,834)	r = -0,037 (p = 0,790)	r = -0,024 (p = 0,862)
krvna plazma *LGALS3*	r = 0,227 (p = 0,148)	r = 0,061 (p = 0,704)	r = -0,006 (p = 0,970)	r = -0,012 (p = 0,939)	r = 0,109 (p = 0,428)	r = -0,137 (p = 0,317)
sjemena plazma *LGALS3*	r = -0,192 (p = 0,242)	r = -0,059 (p = 0,726)	r = -0,244 (p = 0,134)	r = -0,267 (p = 0,100)	r = -0,150 (p = 0,280)	r = -0,022 (p = 0,874)

6. RASPRAVA

Rak prostate najčešća je maligna bolest u muškoj populaciji Republike Hrvatske, a po prevalenciji najčešći je u cijelom svijetu. Dijagnostika se temelji na određivanju serumske koncentracije PSA i biopsiji, koja se kao alat za razlikovanje raka od simptomatski slične benigne bolesti BHP-a često koristi. Opetovane biopsije uslijed konzistentno povišenog PSA i programa aktivnog nadzora dodatni su aspekti koji opterećuju bolesnike i zdravstveni sustav, zbog mogućih komplikacija i financijskog troška. Zbog svega navedenog, znanstvena zajednica je u intenzivnoj potrazi za novim, manje invazivnim biomarkerima, poput onih iz tekućinskih biopsija. Među njima metilacija cfDNA predstavlja potencijalni epigenetički biomarker za rak prostate koji još nije značajnije istražen, a nudi velik potencijal zbog svoje stabilnosti i promjena karakterističnih za tumore.

Poznato je da ekspresija gena *APC* i *LGALS3* igra ulogu u razvoju i progresiji raka prostate. Puno značajnije je istražen *APC* čija je hipermetilacija DNA u tumorskom tkivu prostate prepoznata kao biljeg raka te uvrštena u komercijalno dostupni test. Međutim, još nije značajnije istražen njezin potencijal u tekućinskim biopsijama na cfDNA, posebice u sjemenoj plazmi. Prema dosadašnjim istraživanjima, metilacija gena *LGALS3* ovisi o stadiju raka prostate pa je tako hipermetilacija DNA snažno vezana uz rani stadij (74). Kao i u slučaju *APC*, metilacija cfDNA gena *LGALS3* još nije značajnije istražena u tekućinskim biopsijama, a ovo je prvo istraživanje provedeno u uzorcima sjemene plazme, sukladno dostupnoj literaturi. Nadalje, ovo je istraživanje fokusirano na diferencijaciju skupine pacijenata s rakom prostate od onih s BHP-om prije same biopsije prostate, što predstavlja klinički izazov, a još nije adekvatno adresirano u znanstvenim istraživanjima.

6.1. Metilacija DNA gena *APC*

Temeljem dobivenih podataka nije pronađena razlika između prosječne metilacije cfDNA gena *APC* u pacijenata s rakom prostate u odnosu na one s BHP-om, niti u krvnoj, niti u sjemenoj plazmi. Zbog toga nije moguće niti odrediti osjetljivost i specifičnost metilacije cfDNA gena *APC* kao biomarkera za rak prostate, iako je to bio jedan od ciljeva ovog doktorskog rada. U dosadašnjim istraživanjima metilacije *APC* u tekućinskim biopsijama objavljeni su nekad

suprotni rezultati. Najveći broj istraživanja rađen je na uzrocima krvi, prvenstveno plazmi (48). Određene istraživačke skupine pokazale su nepostojanje razlike u metilaciji između pacijenata s rakom prostate u odnosu na asimptomatske kontrole (48), dok su druge zabilježile hipermetilaciju kod raka u usporedbi s asimptomatskim kontrolama (83) ili BHP-om (84). Roupret i suradnici u svom dobro dizajniranom istraživanju usporedili su metilaciju cfDNA gena *APC* u krvi između bolesnika s i bez progresije raka prostate te onih s BHP-om. Zabilježili su hipermetilaciju cfDNA gena *APC* kod gotovo svih pacijenata s rakom u odnosu na one s BHP-om, ali su uključeni pacijenti s rakom imali vrlo visoku vrijednost PSA i uznapredovali stadij bolesti, odnosno patološki stadij T3 koji uključuje postojanje metastaza (84). Njihovi kontrolni bolesnici s BHP-om su imali vrlo niske vrijednosti PSA (medijan 3 ng/mL naspram 81 i 63 ng/mL u skupinama pacijenata s rakom). U tom slučaju, sama vrijednost PSA je odličan biomarker za razlikovanje ovih skupina pacijenata te zato razlikovanje njihovih skupina raka od BHP-a ne predstavlja klinički izazov, niti postojanje razlike u metilaciji cfDNA gena *APC* u tom slučaju ne daje dodatnu dijagnostičku korist, već samo znanstvenu. Za razliku od njihovog istraživanja, u ovom doktorskom radu je ispitivana razlika u metilaciji cfDNA gena *APC* kod bolesnika s rakom i BHP-om čije se serumske vrijednosti PSA statistički ne razlikuju, što kliničarima znatno otežava diferencijalnu dijagnostiku tih dviju bolesti.

Međutim, istraživanja metilacije gDNA gena *APC* u uzorcima tkiva redovito upućuje na postojanje hipermetilacije gDNA u tumorskom tkivu u odnosu na tzv. zdravo tkivo koje okružuje tumorsko, tkivo BHP-a ili tumorski negativno tkivo drugog izvora (49,50,60,62,85–88). Vasiljević i suradnici navode postotak metilacije od 26,5 % (analiziran pirosekvenciranjem) kao *cut-off* vrijednost za razlikovanje raka od BHP-a (50). Rezultati dobiveni u mojem istraživanju pokazuju znatno manju metilaciju gDNA u tkivu pa je tako ona iznosila najviše 10 % u obje skupine ispitanika. Premda se ispitanici u skupini raka prostate razlikuju između moje i navedene studije. Vasiljević i suradnici su uključili gotovo 20 % pacijenata s rakom prostate Gleason zbroja 9-10, što je vrlo uznapredovali stadij, dok je u ovom istraživanju obuhvaćena skupina s ranim stadijem raka prostate. To se očituje i u serumskoj koncentraciji PSA koja je kod velikog broja pacijenata bila preko 20 ng/mL, dok je u ovom istraživanju ta vrijednost bila isključni kriterij (50). Još veći intenzitet metilacije gDNA u tumorskom tkivu od 56,8 % zabilježili su Hoon Kang i suradnici, ističući kako je metilacija gDNA znatno učestalija u pacijenata s karcinomom a s višom koncentracijom PSA i višim Gleason zbrojem (85). Nešto manju

prosječnu razinu metilacije gDNA od 32 % bilježe Yoon i suradnici, također u tumorskom tkivu u usporedbi sa slabom metilacijom gDNA od 1,4 % kod BHP-a; te je niska *cut-off* vrijednost metilacije gDNA od 6,07 % bila dovoljna za vrlo visoke vrijednosti osjetljivosti i specifičnost. Bolesnici s rakom prostate koje su uključili imali su vrlo visoku prosječnu koncentraciju PSA od 135,4 ng/mL, a oni s BHP-om samo 4,4 ng/mL, kao i u njihovom ranijem istraživanju gdje su uspoređivali skupine bolesnika s istim dijagnozama i dobili vrlo slične rezultate (60,88). Navedeno se znatno razlikuje od ovog istraživanja gdje ne postoji statistička razlika u vrijednosti PSA između dviju skupina pacijenata, a medijan za bolesnike s rakom iznosi 6,72 ng/mL, a za bolesnike s BHP-om 7,10 ng/mL. Međutim, niti u ovom istraživanju, kao ni u dva od strane Yoon i suradnika nije pronađena korelacija između metilacije DNA i serumske koncentracije PSA ili stadija raka, a utvrdili su postojanje korelacije između metilacije DNA gena *APC* i Gleason zbroja (60). U ovom istraživanju nije pronađena razlika u metilaciji cfDNA gena *APC* kad su bolesnici razdijeljeni u skupine prema vrijednosti PSA, kao ni u do sad objavljenim studijama (60,88). Korelacija statusa metilacije DNA gena *APC* s kliničko-patološkim karakteristikama poput stadija, gradusa i prognoze zabilježena je u nekim istraživanjima (62,89), dok u drugima nije (90). S obzirom na to da većina istraživanja u kojima je analizirana metilacija DNA gena *APC* u raku prostate uključuje bolesnike s uznapredovalim stadijem (88), a u ovom istraživanju takvi nisu uključeni, moguće je da je to uzrok nepronalaženja razlike u tkivnoj metilaciji gDNA između raka i BHP-a. U tom slučaju nije moguća niti diferencijacija na temelju metilacije cfDNA, ako se radi o promjeni koja je značajna tek u uznapredovalim fazama bolesti. S druge strane, Richiardi i suradnici su pokazali da je metilacija gDNA gena *APC* u netumorskom tkivu smještenom do tumorskog u parafinskim blokovima prostate prisutna u nešto više od 40 % slučajeva te da je povezana s 5-godišnjom smrtnošću (91). Njihov rezultat podupire tezu da je metilacija gDNA rani događaj u karcinogenezi, no metilacija gDNA netumorskog tkiva koje okružuje tumorsko nije uvijek pronađena u drugim istraživanjima (49,85,87) pa tako niti u ovom doktorskom radu. U istraživanju grupe Richiardi i suradnika nema podataka o stadiju i gradusu tumora te o vrijednostima PSA, stoga je teško nagađati može li se raditi o tome da je metilacija gDNA u ONT prisutna kod osoba koje će razviti agresivniji oblik raka prostate, pogotovo imajući na umu da su zaključili da metilacija gDNA ONT ima prediktivnu mortalitetnu vrijednost (91). U prilog toj tezi govore i druga istraživanja koja pokazuju da intenzitet metilacije gDNA gena *APC* raste što je tumorsko tkivo prostate slabije diferencirano (92).

Istraživanja upućuju na to da hipermetilacija gDNA gena *APC* u raku prostate omogućuje razlikovanje tumorskog tkiva od onog u BHP-u s vrlo visokom vrijednošću AUC (engl. *area under curve*) koja govori o dijagnostičkoj vrijednosti biomarkera. Navedeno je pronađeno u uzorcima tumora dobivenih radikalnom prostatektomijom te u biopsijskim cilindrima (49,60,88). Metilacija gDNA gena *APC* također je omogućavala razlikovanje tkiva BHP od ONT koje je okruživalo tumor, iako sa slabijom performansom od one za razlikovanje tumora od BHP-a (49). Tkivna metilacija gDNA gena *APC* za sad pokazuje najbolje biomarkerske performanse u panelskim kombinacijama s metilacijom gDNA drugih gena (86), a uspješnost panelskih kombinacija za sad je utvrđena i u urinu pacijenata s rakom prostate (93). No, ponovno se radi o skupini pacijenata od kojih značajan broj ima uznapredovali stadij raka (93). Zanimljivo je da se tkivna metilacija gDNA gena *APC*, u kombinaciji s *RASSF1A* i *GSTP1* pokazala kao prediktor negativnog rezultata ponovljene biopsije nakon prvotno negativne, na temelju čega je razvijen test ConfirmMDX (94). U budućnosti bi bilo zanimljivo istražiti može li se ista kombinacija primijeniti na cfDNA iz tekućinskih biopsija. Dodatnu težinu istraživanju provedenom u ovom doktorskom radu dala bi analiza podataka koji govore tko je od ispitanika s negativnim rezultatom biopsije, odnosno dijagnozom BHP-a, razvio rak prostate u budućnosti, unutar određenog vremenskog perioda. Analiza metilacije ispitanika svrstanih u nove skupine s obzirom na taj podatak potencijalno bi mogla dati uvid i pokazati prognostičku vrijednost metilacije gena *APC* u cfDNA. Prognostička vrijednost tkivne metilacije gDNA gena *APC* već je pokazana u velikoj kohorti, gdje je utvrđeno da je ona značajno veća kod pacijenata s negativnom biopsijom koji će kasnije dobiti rak i razviti biokemijski relaps (95). Takvih istraživanja još nema u tekućinskim biopsijama.

Većina objavljenih istraživanja koristi MSP ili qMSP tehnologiju, za razliku od pirosekvenciranja korištenog u ovom istraživanju. Korištenje MSP tehnologije ima svoja ograničenja u analizi karcinomskih uzoraka jer benigne lezije mogu biti slabo pozitivne te onemogućiti razlikovanje od malignih. Nadalje, rezultati MSP-a se reportiraju kao metilirani ili nemetilirani, bez kvantifikacije ili identifikacije djelomične metilacije, što je posebno važno u kliničkim uzorcima s malim količinama DNA. S te strane, pirosekvenciranje je bolja metoda jer daje kvantitativnu informaciju za svako analizirano CpG mjesto (60).

6.2. Ekspresija *APC* na proteinskoj razini

S obzirom na to da metilacija DNA promotorske regije gena utječe na transkripciju, ispitano je postojanje korelacije između metilacije i ekspresije gena na proteinskoj razini korištenjem imunohistokemijske analize. U ovom istraživanju nije utvrđeno postojanje navedene korelacije u dvjema skupinama pacijenata. Međutim, Zhang i suradnici pokazali su da u tumorskom tkivu prostate većine uzoraka nije prisutna ekspresija *APC* na proteinskoj razini, a hipermetilacija jest, dok je u tkivu BHP-a situacija obrnuta (96). Istraživanje u ovom doktorskom radu nije potvrdilo te rezultate. Naime, utvrđena je ekspresija proteina APC u tumorskom epitelu, a odsutnost iste u tumorskoj stromi. Ekspresija proteina APC je statistički značajno veća u tumorskom epitelu naspram epitela ONT te epitela BHP-a u uzorcima dobivenim radikalnom prostatektomijom. No, u epitelu bioptata nije pronađena statistički značajna razlika, odnosno ekspresija je slična u svim navedenim uzorcima. Što se tiče strome, i u uzorcima radikalne prostatektomije, kao i u uzorcima bioptata prisutna je statistički značajno niža ekspresija APC u tumoru naspram ONT i BHP-a. Zanimljivo, u literaturi nema drugih istraživanja koja su analizirala ekspresiju proteina APC u raku prostate, osim gore navedenog pa je teško donijeti konkretnije zaključke. Zhang i suradnici u svoje su istraživanje uključili najviše uzoraka sa slabo diferenciranim rakom, odnosno uznapredovalim stadijem, ali ne daju dodatne podatke o Gleason zbroju. S obzirom na to da se u našoj studiji radi o ranijim stadijima raka, moguće je da je ekspresija proteina APC zbog tog još prisutna u tumorskom epitelu, posebno jer je hipermetilacija u tumorskom tkivu u istraživanima povezana s progresijom i kasnijim stadijima.

6.3. Metilacija DNA gena *LGALS3*

U ovom istraživanju nije utvrđena razlika u metilaciji cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj plazmi u pacijenata s rakom prostate u odnosu na one s BHP-om. Unatoč tome, vidljivo je da frekvencija prosječne metilacije kod pacijenata s rakom doseže i do 20 %, dok kod onih s BHP-om ne ide preko 10 %. Dosadašnja istraživanja metilacije cfDNA gena *LGALS3* u tekućinskim biopsijama bolesnika s rakom prostate su vrlo oskudna, iako su rezultati na tkivnim uzorcima dali obećavajuće rezultate (73,74). Točnije, do sad je objavljeno samo jedno istraživanje na serumskim uzorcima četiri ispitanika s rakom prostate gdje je hipermetilacija cfDNA zabilježena samo u dva uzorka ranog stadija raka, a u dva uzorka uznapredovalog stadija i jednom uzorku BHP-a nije (74). Isti autori navode da je hipermetilacija cfDNA gena *LGALS3* prisutna i u urinu osoba s rakom prostate, premda su te rezultate opisali kao neobjavljene (38). Istraživanje u svrhu

izrade ovog doktorskog rada predstavlja značajan korak s obzirom na neznatnu količinu do sad objavljenih radova na temu metilacije cfDNA gena *LGALS3* u tekućinskim biopsijama, osobito imajući na umu broj uključenih ispitanika. No, ono nije potvrdilo implicirani potencijal metilacije cfDNA gena *LGALS3* iz krvne plazme kao biomarkera. Dodatno razdvajanje pacijenata s rakom prostate u skupine prema vrijednostima PSA i WHO 2016/ISUP stupnju raka i međusobno uspoređivanje nije donijelo statistički značajnu razliku u metilaciji u krvnoj plazmi, kao ni u usporedbi s BHP-om. Ono što je vidljivo nakon navedene diferencijacije ispitanika jest da je u raku prostate frekvencija metilacije cfDNA gena *LGALS3* u krvnoj plazmi koja postiže vrijednosti do 20 % prisutna isključivo u skupini WHO 2016/ISUP 1-2. Odnosno, iako svi uključeni ispitanici s rakom prostate prema patološkom nalazu biopsije pripadaju u rane stadije, veće su vrijednosti frekvencije metilacije cfDNA ipak prisutne u skupini ispitanika s manje uznapredovalim stadijem raka, unatoč izostanku statistički značajne razlike. No, na temelju ovog istraživanja ne može se zaključiti da metilacija gena *LGALS3* u cfDNA iz krvne plazme ima prognostičku vrijednost.

Što se tiče cfDNA iz sjemene plazme, radi se o prvom istraživanju metilacije cfDNA gena *LGALS3* te je utvrđeno postojanje statistički značajno više frekvencije metilacije cfDNA u ispitanika s BHP-om naspram onih s rakom prostate. No, medijan frekvencije metilacije cfDNA je nizak u obje skupine, iznoseći 3 % u raku i 4 % u BHP-u. Ispitivanje biomarkerskog potencijala metilacije cfDNA gena *LGALS3* u sjemenoj plazmi konstrukcijom ROC krivulje pokazalo je da je osjetljivost 56 % i specifičnost 70 %, za *cut-off* vrijednost metilacije cfDNA manju od 3,5 %. Odnosno, u slučaju specifičnosti to bi značilo da od 100 ispitanika koji imaju BHP i nemaju rak prostate, analiza metilacije cfDNA iz sjemene plazme gena *LGALS3* bi za 70 ispitanika dala rezultat niži od 3,5 % što bi smatrali negativnim testom na rak prostate, a za 30 ispitanika bi dala rezultat viši od 3,5 % što bi smatrali pozitivnim. Uz prilično nisku dobivenu osjetljivost, ovu specifičnost bi trebalo svakako provjeriti na većem uzorku, tako da nažalost ne možemo reći da metilacija cfDNA gena *LGALS3* kao dijagnostički biomarker nudi velik potencijal.

Razdvajanjem ispitanika s rakom prostate u prognostičke skupine i usporedbom prosječne metilacije cfDNA gena *LGALS3* s metilacijom u BHP-u, utvrđena je statistički značajna razlika u sjemenoj plazmi između pacijenata koji pripadaju WHO 2016/ISUP skupini 1-2 naspram BHP-a.

Gotovo da je utvrđena statistički značajna razlika između WHO 2016/ISUP 3-5 i BHP-a budući da je p vrijednosti iznosila 0,0526 pa se može zaključiti da utvrđenoj razlici u prosječnoj frekvenciji metilacije između raka prostate i BHP-a jednako pridonose sve WHP 2016/ISUP skupine. Analizirajući ove rezultate, može se ustvrditi da metilacija cfDNA gena *LGALS3* u sjemenoj plazmi nije karakteristična za rak prostate, s obzirom na to da kod pojedinih ispitanika u BHP-u iznosi i do 20 %. Ostaje neodgovoreno pitanje ima li metilacija cfDNA gena *LGALS3* u sjemenoj plazmi dijagnostičku vrijednost u skupini ispitanika s BHP-om za predviđanje budućeg raka prostate. U svrhu rasvjetljavanja tog pitanja, trebalo bi nakon određenog vremenskog perioda vidjeti koliko je ispitanika s BHP-om razvilo rak prostate te je li metilacija cfDNA gena *LGALS3* kod njih bila povišena u usporedbi s onima koji nisu razvili rak u trenutku kad su svi imali negativan nalaz biopsije. Unatoč tome što sjemena plazma nije u ovom istraživanju potvrđena kao potencijalni izvor cfDNA čija bi metilacija mogla biti biomarker za rak prostate, ona svejedno predstavlja tekućinsku biopsiju koju bi bilo vrijedno dalje istražiti, makar u svrhu otkrivanja drugih vrsta biomarkera za rak. Naime, prvo istraživanje koje je pokazalo da postoje promjene u ejakulatu bolesnika s rakom prostate, na citološkoj razini, objavljeno je još 1996. godine (97). Od tada područje nije puno napredovalo te su istraživanja biomarkera u ejakulatu još uvijek vrlo ograničena. Do sad jedino objavljeno istraživanje metilacije DNA odnosi se na metilaciju *GSTP1* u karcinomskim stanicama prostate iz ejakulata. Rađeno je na svega nekoliko ispitanika, a rezultat je izražen kao prisutnost hipermetilacije kod polovine uključenih pacijenata (98,99). Stoga, ejakulat i sjemena plazma zahtijevaju daljnju pozornost istraživača, a mogao bi koristiti sveobuhvatni pristup analize proteoma, metaboloma, metiloma i ostalih -oma koji bi na više razina pokazao postoje li obrasci karakteristični za rak prostate u ovoj tekućinskoj biopsiji.

U do sad objavljenim radovima, analiza tkiva upućivala je na snažnu metilaciju promotora gDNA gena *LGALS3* u ranom stadiju raka prostate, laganu u kasnijim stadijima te njenu odsutnost u BHP-u i zdravoj prostati (73,74). U ovom istraživanju potvrđeni su navedeni rezultati jer je zabilježena znatno viša frekvencija prosječne metilacije gDNA gena *LGALS3* u tumorskom tkivu dobivenom radikalnom prostatektomijom naspram ONT i tkiva BHP-a, a isti je obrazac zabilježen u gotovo svakom od sedam CpG mjesta. Navedena opažanja se ne preslikavaju na cfDNA iz tekućinskih biopsija, kao što je ranije opisano. Tumorske stanice procesom apoptoze, nekroze i aktivne sekrecije ispuštaju cfDNA u tekućinske biopsije, a tumorski cfDNA čini samo jednu od frakcija ukupnog cfDNA (100). Međutim, pokazalo se da osobe s tumorima različitog

tkivnog podrijetla nemaju jednake količine cfDNA u cirkulaciji, što porijeklom iz tumora, a što iz drugih stanica (101). Analiza metilacije cfDNA iz tekućinskih biopsija je stoga i predložena kao robusniji i osjetljiviji pristup za dijagnozu raka budući da se promjene događaju rano u tumorigenezi i prisutne su u velikoj količini, za razliku od npr. detekcije mutacija vezanih uz rak u cfDNA (102). Najvažnije, metilacijski obrasci cfDNA odgovaraju onima u stanicama ili tkivima iz kojih potječu (103). No, uspjeh u istraživanjima cfDNA u svrhu identifikacije tumorskog biomarkera za sad pokazuje primarno analiza velikog broja CpG mjesta, odnosno *array*, koji na temelju analize metilacije više tisuća CpG mjesta uspješno detektira tumorske promjene specifične za određeno tkivo (103). Neslaganje između razlike u metilaciji cfDNA i gDNA kod dviju skupina ispitanika u ovom istraživanju može biti posljedica više čimbenika. U raku, cfDNA ne potječe samo iz tumorskih stanica, već i iz stanica u tumorskom mikrookolišu, kao i iz drugih stanica nevezanih uz tumor poput imunosnih i endotelnih stanica; a sve te stanice otpuštaju cfDNA različitim tempom i u različitoj količini (35). Za rak prostate se pokazalo da je cfDNA koji porijeklom pripada tumoru detektabilan u manje od 50 % oboljelih (104). Premda je navedeno istraživanje uključivalo samo pet ispitanika, implicira da rak prostate, za razliku od nekih drugih karcinoma poput kolorektalnog, otpušta znatno manje cfDNA u cirkulaciju. Nadalje, ne ulijeva nadu činjenica da se radilo o metastaznoj bolesti u kojoj se očekuju još i više količine tumorskog cfDNA. No, postoje i oprečna istraživanja metastaznog raka prostate koja pokazuju da je metilom jedne trećine cfDNA u krvi specifičan za rak (105). Moguće je da je u našem slučaju samo dio ispitanika s rakom prostate imao u krvnoj plazmi cfDNA porijeklom iz prostate pa hipermetilacija DNA gena *LGALS3* nije mogla biti uočena zbog nedovoljne osjetljivosti metode. Nedavno objavljeno istraživanje pokazalo je da je metilacija cfDNA gena *RASSF1A* u serumu ispitanika s rakom prostate znatno veća u ranom stadiju u odnosu na ispitanike s BHP-om. No, autori ističu da je za otkrivanje navedene razlike bila ključna stroga optimizacija preamlifikacijskog koraka i korištenje *digital droplet* PCR tehnike kako bi se uspješno detektirale minimalne količine tumorskog cfDNA u pozadinskoj fiziološkoj buci cfDNA drugog porijekla (106). Količina cfDNA u cirkulaciji također korelira s količinom tumorskog tkiva, a ovdje se radi o ranim stadijima raka pa je i tumorsko opterećenje manje (107). S obzirom na tu činjenicu, postoji mogućnost da je količina tumorskog cfDNA u krvnoj plazmi prisutna u toliko niskim količinama da je izoliran njegov minimalni udio, a manja količina fragmentiranog tumorskog cfDNA je dodatno podložan degradaciji DNAzama (106). Osim toga,

bisulfitnom konverzijom se gubi i oštećuje dio DNA pa to vodi do dodatno snižene mogućnosti detekcije metilacije cfDNA pirosekvenciranjem. Tim mogućnostima u prilog govori koncentracija cfDNA koja je u ovom istraživanju izmjerena kod ispitanika s rakom prostate - prosječno nešto manje od 10 ng/mL krvne plazme, kao i kod ispitanika s BHP-om, iako je taj broj jako varirao u obje skupine. Druga mogućnost je da hipermetilacija DNA gena *LGALS3* jest rani događaj u raku prostate te da je u skupini ispitanika s BHP-om dio onih koji će u budućnosti razviti klinički detektabilan rak prostate koji je već u začetku; a time su zasjenili razliku između raka prostate i BHP-a. No, bilo bi za očekivati da će promjene u cfDNA iz sjemene plazme reflektirati one u tkivu budući da prostata doprinosi volumenu ejakulata s oko 40 % (3). S obzirom da to nije uočeno, vjerojatnije je da se radi o činjenici da hipermetilacija DNA gena *LGALS3* nije događaj specifičan za rani razvoj raka prostate. U tom smjeru govore i istraživanja u kojima su promjene u tkivnoj metilaciji tumorskog tkiva zabilježene u cfDNA porijeklom iz urina kamo su dospjeli otpuštanjem tumorskih stanica i cfDNA tijekom prolaska urina kroz prostatu, kao što je slučaj za gene *GSTP1, APC* i *RASSF1A* (47,108–110). Ako urin reflektira metilacijske promjene DNA u tumoru, za očekivati bi bilo da ih ejakulat također reflektira, u još većoj mjeri pa posljedično boljom dijagnostičkom osjetljivošću. No, hipermetilacija DNA navedenih gena nije pronađena u svakom urinskom uzorku ispitanika s rakom prostate, tako da niti urin ne odražava sve tkivne promjene. Ipak, čini se da analiza metilacije DNA više gena ima puno bolje dijagnostičke performanse od analize gena pojedinačno (108). Treća mogućnost, sukladno rezultatima imunohistokemijske analize koji su suprotni u epitelu i stromi kod raka prostate i BHP-a, jest da je metilacija u nekom dijelu tkiva intezivna, a u drugom je nema. S obzirom na to da je za analizu tkivne metilacije DNA uzimana smjesa epitela i strome, moguće je da je taj način analize zamaskirao potencijalno vidljive promjene u metilaciji epitela, odnosno strome.

6.4. Ekspresija *LGALS3* na proteinskoj razini

Imunohistokemijska analiza ekspresije *LGALS3* na proteinskoj razini pokazala je da je ona statistički značajno manja u tumorskom epitelu naspram epitela ONT i BHP-a, u uzorcima bioptata te u onima dobivenim radikalnom prostatektomijom. Navedeno je u skladu s do sad objavljenim istraživanima koja redom bilježe slabu ili odsutnu ekspresiju u tumorskom epitelu, naspram zdravog tkiva ili tkiva BHP-a (71,72,75,111–113). Istraživanja uglavnom analiziraju

samo ekspresiju u žljezdanom epitelu, ne govoreći o rezultatima ekspresije u stromi. Ono što je zanimljivo jest da je u našem istraživanju pronađen potpuno različit obrazac ekspresije u epitelu i stromi između raka prostate i BHP-a. Naime, u tumorskim uzorcima je zabilježena odsutnost ekspresije u epitelu, dok je stromalna ekspresija snažna; a u uzorcima BHP-a prisutna ekspresija u epitelu, dok je u stromi ona odsutna ili prisutna vrlo oskudno. U uzorcima ispitanika s rakom prostate gdje je prisutno i tumorsko i tkivo BHP-a, zabilježena je odsutnost ekspresije u tumorskom epitelu te prisustvo u hiperplastičnom epitelu (kao i u uzorcima ispitanika s BHP-om), dok je ekspresija u stromi bila jednako izražena u ta dva entiteta. Merseburger i suradnici su objavili jednak obrazac ekspresije u BHP-u, dok u raku prostate uglavnom bilježe manjak ekspresije i u epitelu i u stromi; ali tamo gdje nalaze ekspresiju ona je citoplazmatska kao i u ovom istraživanju (72). Knapp i suradnici također bilježe pad ekspresije od benignog, preko ONT do manjka ekspresije u tumorskom tkivu, ali govore o ekspresiji u epitelu, a potpunom odsustvu ekspresije u stromi, što je obrnuto od ovog istraživanja (75). Gotovo sve istraživačke skupine bilježe tumorsku ekspresiju u citoplazmi, ako je ekspresija prisutna, a odsutnost u jezgri. Navedeno ide u prilog različitim ulogama Gal-3 u razvoju tumora, ovisno o njegovoj staničnoj sublokalizaciji. Osim toga, često se bilježi heterogena ekspresija u ONT, što bi moglo upućivati na zone u prostati u kojima dolazi do daljnjeg širenja karcinoma. Poznato je da tumorska stroma, koja se sastoji od fibroblasta, miofibroblasta, endotelnih i imunosnih stanica te ekstracelularnog matriksa, vaskulature i živaca, ima važnu ulogu u rastu primarnog tumora prostate (114,115). Tijekom razvoja tumora epitel uzrokuje promjene u različitim vrstama stanica strome koje onda pak povratno utječu na epitel, a pokazalo se da je obrazac ekspresije stromalnih gena izmijenjen tijekom progresije raka prostate (116). Poznavajući ove činjenice i ulogu strome u razvoju raka prostate, ekspresija Gal-3 u tumorskoj stromi može upućivati na daljnji razvoj tumora i njegovu agresivnost, s obzirom na to da je odsutna kod ispitanika s BHP-om, a prisutna u hiperplastičnom tkivu uzoraka pozitivnih na rak.

S obzirom na podatak da je ekspresija gena *LGALS3* u tkivu prostate kontrolirana metilacijom, za očekivati je da će pronalazak povišene metilacije gena *LGALS3* u tkivu pratiti smanjena ekspresija na proteinskoj razini, što je i zabilježeno u ovom istraživanju. Unatoč tomu, nije pronađena statistički značajna korelacija između tih dviju bioloških karakteristika. Hipermetilacija gena *LGALS3* u DNA izoliranoj iz tumorskog tkiva mogla bi biti djelomično zasjenjena odsutnošću metilacije ili njenim sniženim intenzitetom u tumorskoj stromi.

6.5. Koncentracija Gal-3 u krvi i ejakulatu

Nakon što je potvrđena uloga Gal-3 u tumorigenezi raka prostate, istražena je njegova koncentracija u krvi kao potencijalnog biomarkera. Prvo poznato istraživanje njegove koncentracije pokazalo je da ona u serumu omogućuje diferencijaciju pacijenata s metastaznim rakom prostate od kontrolne skupine bez poznatih maligniteta, iako na vrlo malom uzorku od 8 osoba u svakoj skupini (117). U ovom doktorskom radu nije pronađena razlika u plazmatskoj koncentraciji Gal-3 između raka prostate i BHP-a, niti u krvi, kao niti u ejakulatu. Medijan koncentracije Gal-3 u krvnoj plazmi u obje skupine ispitanika bio je znatno viši od onih u prethodno spomenutom radu – 5,72 ng/mL /(rak) i 6,14 ng/mL (BHP) naspram 0,32 ng/mL (metastazni rak) i 0 ng/mL (kontrole). Daljnje prospektivno kliničko istraživanje na nešto većoj skupini ispitanika pokazalo je da nema razlike između zdravih kontrola, novodijagnosticiranih slučajeva raka i metastaznih slučajeva. No, rezultati su izraženi kao relativni Gal-3, odnosno korigirani za prisutnost autoantitijela na Gal-3 pa tako nisu prikazane koncentracije po skupinama ispitanika (118). Autori su objavili još jedan rad s potpuno istim skupinama i dizajnom istraživanja u kojem iznose serumske koncentracije Gal-3, 12,24 ng/mL u novodijagnosticiranih ispitanika i 13,49 ng/mL u zdravih kontrola (119). Navedene su koncentracije više nego u ovom radu, a uzrok je vjerojatno korištenje različitih ELISA kitova. Naime, protutijela koja se koriste za vezanje Gal-3 u ovom istraživanju prepoznaju isključivo intaktni Gal-3, dok to ne mora biti slučaj za ostale ELISA kitove. S obzirom na to da PSA hidrolitički kida Gal-3, a ovdje se radi o bolesnicima s rakom prostate čija je serumska koncentracija PSA povišena, povećanoj koncentraciji bi mogli pridonijeti dijelovi molekule Gal-3. Imajući taj podatak na umu, treba oprezno pristupati usporedbi rezultata dobivenih imunokemijskim metodama popust ELISA-e. No, i jedni i drugi rezultati upućuju na isti zaključak, a to je da koncentracija Gal-3 u krvi i njenim derivatima nema biomarkerski potencijal za rak prostate. Što se tiče ejakulata, Gal-3 je u toj tekućinskoj biopsiji prvi put detektiran prije nešto više od jednog desetljeća, kad je utvrđeno da je uglavnom asociran uz prostasome, kolesterolom bogate membranske vezikule koje izlučuje prostata u sjemenu plazmu tijekom ejakulacije (120). U literaturi do sad nema objavljenih podataka o koncentraciji Gal-3 u sjemenoj plazmi tako da je ovo istraživanje prvo koje ih daje. Nije zabilježena razlika između pacijenata s rakom i BHP-om, a koncentracija Gal-3 u sjemenoj plazmi je nekoliko puta veća nego ona u krvnoj plazmi. Ranije spomenuto istraživanje upućuje na ulogu Gal-3 u prostasomskoj regulaciji funkcije ejakulata i imunosupresije u ženskom

reproduktivnom traktu, s obzirom na njegovu lokalizaciju na površini prostasoma, uz imunomodulatorne funkcije i ulogu u staničnom povezivanju (120). Gal-3 očito ima važnu ulogu u funkciji prostasoma, koji su prisutni u ejakulatu u dvostruko većem broju od spermatozoa te drugih elemenata ejakulata, koja razjašnjava njegovu visoku koncentraciju u sjemenoj plazmi (120). Na temelju gore navedenih rezultata u sjemenoj plazmi, čini se da biologiju Gal-3 u tkivu prostate ne možemo preslikati na sjemenu plazmu, tj. da su to dva različita etniteta s jedinstvenim ulogama.

6.6. Koncentracija i integritet cfDNA u krvi i ejakulatu

U ovom doktorskom radu dodatno je ispitan potencijal koncentracije cfDNA iz tekućinskih biopsija te integriteta cfDNA kao biomarkera za razlikovanje raka prostate od BHP-a. Nekoliko objavljenih istraživanja dalo je naslutiti da bi koncentracija cfDNA ili integritet cfDNA, odnosno omjer dužih i kraćih fragmenata cfDNA, mogli biti korisni kao dijagnostički biomarker za cfDNA (121,122). Za kvantifikaciju smo koristili qPCR koji je u literaturi prepoznat kao najpreciznija metoda za tu svrhu, ispred često korištenih spektrofotometrijskih i fluorimetrijskih metoda kao što su Nanodrop i Qubit (123). Nismo potvrdili dosadašnja istraživanja koja upućuju na diskriminacijski potencijal cfDNA za rak prostate u krvnoj i sjemenoj plazmi. Treba napomenuti da nisu sve istraživačke grupe utvrdile razliku u koncentraciji cfDNA između raka prostate i BHP-a ili zdravih kontrola, a tamo gdje jesu je često pokazano da je povišena koncentracija posebno karakteristična za metastazni karcinom (121,124).

Integritet cfDNA izražen kao omjer dužeg i kraćeg fragmenta cfDNA kvantificiranog preko *LINE-1* ili *ALU* elementa je predložen kao biomarker za rak na temelju pretpostavke da tumorske stanice pojačano prolaze kroz nekrozu kao oblik stanične smrti pa zato otpuštaju više cfDNA različitih fragmenata, za razliku od zdravih stanica koje uglavnom umiru apoptozom te otpuštaju ujednačene fragmente veličine do 200 pb (125). Više istraživanja je za različite karcinome pokazalo povišen indeks integriteta cfDNA u serumu ili plazmi u usporedbi sa zdravim kontrolama (126), među njima i u raku prostate (127) gdje raste sa stadijem raka (124). Zanimljivo je da je pokazano da integritet cfDNA iz urina nije pogodan biomarker za rak prostate (128). U našem slučaju nije bilo razlike između integriteta cfDNA u ispitanika s rakom u odnosu na one s BHP-om u niti jednoj od ispitanih tekućinskih biopsija.

Ponti i suradnici nisu utvrdili postojanje statistički značajne razlike u koncentraciji cfDNA iz krvne plazme između ispitanika s rakom prostate i zdravih kontrola (79). Ista istraživačka grupa je 2018. god. objavila da bi koncentracija cfDNA u sjemenoj plazmi mjerena fluorimetrijski mogla biti prikladan biomarker za razlikovanje raka prostate od zdravih ispitanika (129). Govore o koncentraciji od nešto više od 2200 ng/uL cfDNA u raku u odnosu na 57,7 ng/uL u zdravih kontrola, a važno je napomenuti da se radi o vrlo malom istraživanju na svega šest bolesnika i tri kontrole. No, također treba istaknuti da se radi o bolesnicima s ranim stadijem raka s obzirom na koncentracije PSA manje od 10 ng/mL i Gleason score-u 6 i 7. Rezultate su zatim potvrdili na većoj kohorti (18 bolesnika s rakom) gdje su uključili i ispitanike s BHP-om, a prema njihovom grafičkom prikazu izgleda da cfDNA iz sjemene plazme ima idealne dijagnostičke karakteristike (130). Nažalost, u našem istraživanju nisu potvrđeni navedeni rezultati jer su zabilježene podjednake koncentracije u raku i BHP-u, više od 1000 ng/mL plazme. Ono što zbunjuje je činjenica da Ponti i suradnici izražavaju rezultate kao ng/uL uzorka, vjerojatno eluata, iako nije jasno navedeno. Oni su koristili kit za izolaciju proizvođača različitog od onog korištenog u ovom istraživanju, a poznato je da je to jedan od uzoraka nesuglasja u ovakvim istraživanjima (123). Kvantificirali su cfDNA pomoću fluorimetrijske metode koristeći kit za jednostruki cfDNA koji prema navodima proizvođača kvantificira i dvostruki cfDNA, a u našem slučaju je korišten qPCR koji kvantificira LINE-1 element i u dvostrukom i u jednostrukom cfDNA. Posljednje istraživanje grupe Ponti i suradnika na 30 pacijenata s rakom, 33 s BHP-om i 21 zdravih osoba polučilo je zaključak da je cfDNA u sjemenoj plazmi kod ispitanika s rakom značajno viši (428,45 ng/mL) naspram onih s BHP-om (77,4 ng/mL) te da su duži fragmenti i različit elektroforetski obrazac prisutni u raku (131). Ovaj su put izrazili rezultate po mL, iako ne govore čega – eluata ili plazme. No, njihovi rezultati su obećavajući, iako mi nismo potvrdili navedeno te smo zabilježili više koncentracije cfDNA. Bilo bi korisno usporediti metode na istoj skupini ispitanika kako bi se donio konačni zaključak o koncentraciji cfDNA u sjemenoj plazmi kao biomarkera za rak prostate. Moguće je da se izostajanje pronalaska razlike u koncentraciji i integritetu cfDNA u krvnoj i sjemenoj plazmi u ovom istraživanju može pripisati prikrivenom raku u određenih pacijenata s BHP-om koji će tek biti otkriven, kao što je i pretpostavljeno u slučaju metilacije cfDNA.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave moguće je zaključiti sljedeće:

1. Metilacija cfDNA gena *APC* i *LGALS3* nije pogodan biomarker za dijagnozu ranog stadija raka prostate i njegovo razlikovanje od BHP-a, u krvnoj i sjemenoj plazmi.
2. Ne može se zaključiti je li metilacija gDNA gena *APC* rani događaj u razvoju raka prostate, s obzirom na obrazac ekspresije proteina APC u tumorskom tkivu, ONT i tkivu BHP-a.
3. Tumorsko tkivo je moguće razlikovati od ONT-a i tkiva BHP-a na temelju analize metilacije gDNA gena *LGALS3*.
4. Ekspresija gena *LGALS3* na proteinskoj razini (Gal-3) u tkivu prostate predstavlja pogodan biomarker za razlikovanje raka od BHP-a jer je snažna ekspresija prisutna u tumorskoj stromi, a odsutna u tumorskom epitelu, dok je u BHP-u ekspresija obrnuta.
5. Na temelju koncentracije Gal-3 u krvnoj i sjemenoj plazmi nije moguće razlikovati bolesnike s rakom prostate od onih s BHP-om.
6. Koncentracija i integritet cfDNA u krvnoj i sjemenoj plazmi nisu potvrđeni kao potencijalni biomarkeri za rak prostate, suprotno očekivanju na temelju dostupne literature.

Stoga, zaključujemo da hipoteza ovog istraživanja nije potvrđena te da promjene u metilaciji cfDNA gena *APC* i *LGALS3* vjerojatno ne predstavljaju rane događaje u raku prostate te posljedično nisu potencijalni biomarkeri za njegovu dijagnostiku.

8. SAŽETAK

Rak prostate je maligna bolest s visokom incidencijom u Hrvatskoj. Klinički izazov predstavlja njezino razlikovanje od benigne hiperplazije prostate (BHP), zbog niske specifičnosti rutinski korištenog biomarkera PSA. S obzirom da metilacija DNA ima veliku ulogu u razvoju raka prostate, istraživao se metilacijski obrazac cfDNA gena *APC* i *LGALS3* u krvi i ejakulatu ispitanika s rakom prostate te njihov potencijal za razlikovanje raka od BHP-a.. Nije pronađena statistički značajna razlika u metilaciji cfDNA gena *APC*. U slučaju gena *LGALS3*, pronađena je statistički značajno viša metilacija cfDNA u sjemenoj plazmi kod raka u odnosu na BHP, iako se u oba slučaja radi o niskom stupnju metilacije. U tumorskom tkivu detektirana je statistički značajna hipermetilacija gDNA *LGALS3* u odnosu na okolno netumorsko tkivo (ONT) i tkivo BHP-a. Imunohistokemijska analiza ekspresije na proteinskoj razini pokazala je da je *APC* značajno više eksprimiran u tumorskom epitelu u odnosu na epitel ONT i tkiva BHP-a, dok je obrnuto u slučaju *LGALS3*. Dodatne analize kvantifikacije cfDNA i koncentracije proteina Gal-3 nisu pokazale razliku između dviju grupa ispitanika. Iz navedenog slijedi da metilacija cfDNA gena *APC* i *LGALS3* nije potencijalan biomarker za rak prostate i njegovu diferencijaciju od BHP-a.

9. ABSTRACT

Cell free DNA methylation of *APC* and *LGALS3* in blood and ejaculate of patients with prostate cancer, Irena Abramović, 2022

Prostate cancer represents a malignancy with a high incidence in Croatia. Its differentiation from benign prostate hyperplasia (BPH) represents a challenge for clinicians, due to the low specificity of routinely used biomarker PSA. Since DNA methylation has an important role in prostate cancer development, this study investigated the cfDNA methylation patterns of the *APC* and *LGALS3* genes in blood and ejaculate of prostate cancer patients and their potential as biomarkers for differentiation between cancer and BPH. There was no significant difference in cfDNA methylation of *APC*. Regarding *LGALS3*, statistically significant higher cfDNA methylation in seminal plasma of BPH was found compared to cancer. Still, in both groups, low methylation frequency was found. In tumor tissue, there was a statistically significant gDNA hypermethylation of *LGALS3* compared to surrounding healthy tissue and BPH tissue. Immunohistochemical analysis of protein expression showed that *APC* has higher expression in tumor epithelia than epithelia of surrounding healthy or BPH tissue. The results were the opposite for *LGALS3*. Additional analysis of cfDNA and galectin-3 quantification in liquid biopsies showed no difference between cancer and BPH. Finally, cfDNA methylation of *APC* and *LGALS3* in blood and ejaculate does not have the potential as a biomarker for prostate cancer and its differentiation from BPH.

10. POPIS LITERATURE

1. 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, str. 3-19.
2. Aboumarzouk OM, ur. Blandy's urology. 3. izd. Oxford: Wiley; 2019, str. 511-20.
3. Roberts MJ, Richards RS, Gardiner RA, Selth LA. Seminal fluid: A useful source of prostate cancer biomarkers? Biomark Med 2015;9:77-80.
4. Milenkovic U, Albersen M, ur. Smoking and men's health. In: Effects of Lifestyle on Men's Health. 1. izd. Oxford: Elsevier; 2019, str. 303-319.
5. Globocan Prostate Cancer [pristupljeno 03.08.2021]. Dostupno na: https://gco.iarc.fr/
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40, Zagreb, 2018. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-maligne-bolesti/
7. Kuliš T, Krhen I, Kaštelan Ž, Znaor A. Trends in prostate cancer incidence and mortality in Croatia, 1988-2008. Croat Med J 2012;53:109–114.
8. Globocan prostate cancer estimated new cases [pristupljeno 04.08.2021]. Dostupno na: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/trends?types=0&sexes=1&mode=cancer&group_populations=0&multiple_populations=0&multiple_cancers=1&cancers=20_27&populations=191.
9. Robinson BD, Mosquera JM, Ro JY, Divatia M, ur. Precision Molecular Pathology of Prostate Cancer. 1. izd. Cham: Springer; 2018, str. 3-25.
10. Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Wever E, Gulati R i sur. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: Importance of methods and context. J Natl Cancer Inst 2009;101:374–83.
11. Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, Milford Ward A, Patnick J, Price CP i sur. Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/ml: Systematic review and meta-analysis. Eur Urol 2005;48:386-99.
12. Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. J Urol 1984;132:474-9.
13. Stamatiou K, Alevizos A, Agapitos E, Sofras F. Incidence of impalpable carcinoma of the prostate and of non-malignant and precarcinomatous lesions in Greek male population: An autopsy study. Prostate 2006;66:1319-28.
14. Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE. Abeloff's Clinical Oncology: Fifth Edition. 5. izd. Oxford: Elsevier; 2013, str. 1463-96.
15. Brawer MK. Prostatic intraepithelial neoplasia: an overview. Rev Urol 2005;7Suppl 3:11-8.

16. Totaro A, Di Gianfrancesco L, Pinto F, Racioppi M, Palermo G, Campetella M i sur. Rate of clinically significant prostate cancer on repeat saturation biopsy after a diagnosis of atypical small acinar proliferation. Urol J 2021;88:194-9.

17. Schwartzmann I, Celma A, Regis L, Planas J, Roche S, de Torres IM i sur. The current value of histological findings in negative prostate biopsies to predict the future risk of clinically significant prostate cancer. Actas Urológicas Españolas (English Ed) 2021;45:447-54.

18. Gordetsky J, Epstein J. Grading of prostatic adenocarcinoma: Current state and prognostic implications. Diagn Pathol 2016;11:25.

19. Krušlin B, Džombeta T, Tomas D, Ulamec M. Određivanje gradusa adenokarcinoma prostate prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2016. godine. Liječ Vjesn 2017;139:72-5.

20. 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;67:245-53.

21. de Bono JS, Guo C, Gurel B, De Marzo AM, Sfanos KS, Mani RS i sur. Prostate carcinogenesis: inflammatory storms. Nat Rev Cancer 2020;20:455-69.

22. Isaacs W, De Marzo A, Nelson WG. Focus on prostate cancer. Cancer Cell 2002;2:113-6.

23. Fujita K, Nonomura N. Role of androgen receptor in prostate cancer: A review. World J Mens Helath 2019;37:288-95.

24. Adamo P, Ladomery MR. The oncogene ERG: A key factor in prostate cancer. Oncogene 2016;35:403-14.

25 Zhou F, Gao S, Han D, Han W, Chen S, Patalano S i sur. *TMPRSS2-ERG* activates NO-cGMP signaling in prostate cancer cells. Oncogene 2019;38:4397-411.

26. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. Bioch Biophys Acta 2016;1863:1238-60.

27. Sugiura M, Sato H, Kanesaka M, Imamura Y, Sakamoto S, Ichikawa T, Kaneda A. Epigenetic modifications in prostate cancer. Int J Urol 2021;28:140-9.

28. Sfanos KS, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. Nat Rev Urol 2018;15:11-24.

29. Albany C, Alva AS, Aparicio AM, Singal R, Yellapragada S, Sonpavde G, Hahn NM. Epigenetics in Prostate Cancer. Prostate Cancer 2011 Nov [pristupljeno 03.08.2021];580318. Dostupno na: https://www.hindawi.com/journals/pc/2011/580318/

30. Jerónimo C, Bastian PJ, Bjartell A, Carbone GM, Catto JWF, Clark SJ i sur. Epigenetics in prostate cancer: Biologic and clinical relevance. Eur Urol 2011;60:753-66.

31. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. Aust Med J 1869;14:146-7.

32. Campos-Fernández E, Barcelos LS, de Souza AG, Goulart LR, Alonso-Goulart V. Research landscape of liquid biopsies in prostate cancer. Am J Cancer Res 2019;9:1309-28.

33. González-Billalabeitia E, Conteduca V, Wetterskog D, Jayaram A, Attard G. Circulating tumor DNA in advanced prostate cancer: transitioning from discovery to a clinically implemented test. Prostate Cancer Prostatic Dis 2019;22:195-205.

34. Yan YY, Guo QR, Wang FH, Adhikari R, Zhu ZY, Zhang HY i sur. Cell-Free DNA: Hope and Potential Application in Cancer. F Front Cell Dev Biol 2021 Feb [pristupljeno 28.08.2021.];9:639233. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC79383/

35. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. Biomol Detect Quantif 2019 Mar [pristupljeno 28.08.2021.];17:100087. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6425120/

36. Tollefsbol T. Epigenetics in Human Disease. 1. izd. Oxford: Elsevier; 2012. str. 40-56.

37. Flores BCT, Correia MP, Rodríguez JG, Henrique R, Jerónimo C. Bridging the gaps between circulating tumor cells and dna methylation in prostate cancer. Cancers 2021;13:4209.

38. 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 Feb [pristupljeno 28.08.2021.];2:BIC.S3187. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908742/

39. Levenson VV. DNA methylation as a universal biomarker. Expert Rev Mol Diagn 2010;10:481-8.

40. Locke WJ, Guanzon D, Ma C, Liew YJ, Duesing KR, Fung KYC, Ross JP. DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. Front Genet 2019 Nov [pristupljeno 29.08.2021.];10:1150. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6870840/

41. Sorroche BP, Talukdar FR, Lima SCS, Melendez ME, de Carvalho AC, de Alameida GC i sur. DNA methylation markers from negative surgical margins can predict recurrence of oral squamous cell carcinoma. Cancers (Basel). 2021;13:2915.

42. The BLUEPRINT consortium. Quantitative comparison of DNA methylation assays for biomarker development and clinical applications. Nat Biotechnol 2016;34:726-37.

43. Šestáková Š, Šálek C, Remešová H. DNA Methylation Validation Methods: A Coherent Review with Practical Comparison. Biol Proced Online 2019 Oct [pristupljeno 29.08.2021.];21:19. Dostupno na: https://biologicalproceduresonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12575-019-0107-z

44. Whiteford N. String Matching in DNA Sequences: Implications for Short Read Sequencing and Repeat Visualisation, Ph.D. thesis, University of Southampton, 2007.

45. Kohaar I, Petrovics G, Srivastava S. A rich array of prostate cancer molecular biomarkers: Opportunities and challenges. Int J Mol Sci 2019;20:1813.

46. Abramovic I, Ulamec M, Bojanac Katusic A, Bulic-Jakus F, Jezek D, Sincic N. MiRNA in prostate cancer: Challenges toward translation. Epigenomics 2020;12:543-58.

47. Bakavicius A, Daniunaite K, Zukauskaite K, Barisiene M, Jarmalaite S, Jankevicius F. Urinary DNA methylation biomarkers for prediction of prostate cancer upgrading and upstaging. Clin Epigenetics 2019 Aug [pristupljeno 29.08.2021.];11:115. Dostupno na: https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-019-0716-z

48. Constâncio V, Nunes SP, Moreira-Barbosa C, Freitas R, Oliveira J, Pousa I i sur. Early detection of the major male cancer types in blood-based liquid biopsies using a DNA methylation panel. Clin Epigenetics 2019 Dec [pristupljeno 29.08.021.];11:175. Dostupno na: https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-019-0779-x

49. Paziewska A, Dabrowska M, Goryca K, Antoniewicz A, Dobruch J, Mikula M i sur. DNA methylation status is more reliable than gene expression at detecting cancer in prostate biopsy. Br J Cancer 2014;111:781-9.

50. 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.

51. Aghabozorgi AS, Bahreyni A, Soleimani A, Bahrami A, Khazaei M, Ferns GA i sur. Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. Biochimie 2019;157:64-71.

52. Zhu L, Li X, Yuan Y, Dong C, Yang M. *APC* Promoter Methylation in Gastrointestinal Cancer. Front Oncol 2021 Apr [pristupljeno 30.08.2021.];11:653222. Dostupno na: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.653222/full

53. Hankey W, Frankel WL, Groden J. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. Cancer Metastasis Rev 2018;37:159-72.

54. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. Eur J Cancer 2002;38:867-71.

55. Wnt-signaling [slika s interneta] [pristupljeno 30.08.2021]. Dostupno na: https://targetedcancercare.massgeneral.org/My-Trial-Guide/Diseases/Colorectal-Cancer/APC.aspx.

56. Liang TJ, Wang HX, Zheng YY, Cao YQ, Wu X, Zhou X, Dong SX. APC hypermethylation for early diagnosis of colorectal cancer: A meta-analysis and literature review. Oncotarget 2017;8:46468-79.

57. Swellam M, Abdelmaksoud MDE, Sayed Mahmoud M, Ramadan A, Abdel-Moneem W, Hefny MM. Aberrant methylation of APC and RARβ2 genes in breast cancer patients. IUBMB Life 2015;67:61-8.

58. Chen Y, Li J, Yu X, Li S, Zhang X, Mo Z, Hu Y. APC gene hypermethylation and prostate

cancer: A systematic review and meta-analysis. Eur J Hum Genet 2013;21:929-35.

59. Lai YC, Wang WC. Genetic Analysis Reveals the Important Role of the APC Gene in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Anticancer Res. 2021;41:4295–304.

60. Yoon HY, Kim YW, Kang HW, Kim WT, Yun SJ, Lee SC i sur. Pyrosequencing analysis of APC methylation level in human prostate tissues: A molecular marker for prostate cancer. Korean J Urol 2013;54:194-8.

61. Zhang W, Jiao H, Zhang X, Zhao R, Wang F, He W i sur. Correlation between the expression of DNMT1, and GSTP1 and APC, and the methylation status of GSTP1 and APC in association with their clinical significance in prostate cancer. Mol Med Rep 2015;12:141-6.

62. Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO, Mambo E, Ribeiro FR, Varzim G i sur. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. Clin Cancer Res 2004;10:8472-8.

63. Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: An open-ended story. Bioch Biophys Acta 2006;1760:616-35.

64. Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS, Raz A. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. Cancer Res 1999;59:6239-45.

65. Saraswati S, Block AS, Davidson MK, Rank RG, Mahadevan M, Diekman AB. Galectin-3 is a substrate for prostate specific antigen (PSA) in human seminal plasma. Prostate 2011;71:197-208.

66. Kovak MR, Saraswati S, Goddard SD, Diekman AB. Proteomic identification of galectin-3 binding ligands and characterization of galectin-3 proteolytic cleavage in human prostasomes. Andrology 2013;1:682-91.

67. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, Yuan H. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). Int J Mol Med 2018;41:599-614.

68. Hsu DK, Liu FT. Regulation of cellular homeostasis by galectins. Glycoconj J 2002;19:507-15.

69. Iacobini C, Amadio L, Oddi G, Ricii C, Barsotti P, Missori S i sur. Role of galectin-3 in diabetic nephropathy. JASN 2003;14Suppl 3:264-70.

70. Martínez-Bosch N, Rodriguez-Vida A, Juanpere N, Lloreta J, Rovira A, Albanell J i sur. Galectins in prostate and bladder cancer: tumorigenic roles and clinical opportunities. Nat Rev Urol 2019;16:433-45.

71. Pacis RA, Pilat MJ, Pienta KJ, Wojno K, Raz A, Hogan V, Cooper CR. Decreased galectin-3 expression in prostate cancer. Prostate 2000;44:118-23.

72. Merseburger AS, Kramer MW, Hennenlotter J, Simon P, Knapp J, Hartmann JT i sur. Involvement of decreased galectin-3 expression in the pathogenesis and progression of prostate cancer. Prostate 2008;68:72-7.

73. Ahmed H, Banerjee PP, Vasta GR. Differential expression of galectins in normal, benign and malignant prostate epithelial cells: Silencing of galectin-3 expression in prostate cancer by its promoter methylation. Biochem Biophys Res Commun 2007;358:241-6.

74. Ahmed H, Cappello F, Rodolico V, Vasta GR. Evidence of heavy methylation in the galectin 3 promoter in early stages of prostate adenocarcinoma: Development and validation of a methylated marker for early diagnosis of prostate cancer. Transl Oncol 2009;2:146-56.

75. Knapp JS, Lokeshwar SD, Vogel U, Hennenlotter J, Schwentner C, Kramer MW i sur. Galectin-3 expression in prostate cancer and benign prostate tissues: Correlation with biochemical recurrence. World J Urol 2013;31:351-8.

76. Nikolac N, Šupak-Smolčić V, Šimundić AM, Ćelap I. Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine: National recommendations for venous blood sampling. Biochem Med 2013;23:242-54.

77. Pérez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, Jiménez-Sánchez C, Calvo V, Gutierrez-Sanz L i sur. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: Impact on biomarker testing. Transl Lung Cancer Res 2016;5:665-72.

78. Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minarik G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. Biol Proced Online. 2013 Feb [pristupljeno 30.08.2021.];15:5. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576356/

79. Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, Kaleci S, Mandrioli M, Pellacani G i sur. The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients. Clin Chim Acta 2018;479:14-9.

80. Rostami A, Lambie M, Yu CW, Stambolic V, Waldron JN, Bratman SV. Senescence, Necrosis, and Apoptosis Govern Circulating Cell-free DNA Release Kinetics. Cell Rep 2020 Jun [pristupljeno 30.08.2021.];31:13. Dostupno na: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124720308111

81. 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 Dec [pristupljeno 30.08.2021.];5:18425. Dostupno na: https://www.nature.com/articles/srep18425

82. Brahmachari V, Jain S. Bisulfite Conversion. In: Dubitzky W., Wolkenhauer O., Cho KH., Yokota H. (eds) Encyclopedia of Systems Biology. Springer; 2013.

83. Hendriks RJ, Dijkstra S, Smit FP, Vandersmissen J, Van de Voorde H, Mulders PFA i sur. Epigenetic markers in circulating cell-free DNA as prognostic markers for survival of castration-resistant prostate cancer patients. Prostate 2018;78:336-42.

84. 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;122:952-6.

85. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. J Pathol 2004;202:233-40.

86. Van Neste L, Bigley J, Toll A, Otto G, Clark J, Delree P i sur. A tissue biopsy-based epigenetic multiplex PCR assay for prostate cancer detection. BMC Urol 2012 Jun [pristupljeno 31.08.2021.];12:16. Dostupno na: https://bmcurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2490-12-16

87. Patel PG, Wessel T, Kawashima A, Okello JBA, Jamaspishvili T, Guerard KP, Lee L i sur. A three-gene DNA methylation biomarker accurately classifies early stage prostate cancer. Prostate 2019;79:1705-14.

88. Yoon HY, Kim SK, Kim YW, Kang HW, Lee SC, Ryu KH i sur. Combined hypermethylation of APC and GSTP1 as a molecular marker for prostate cancer: Quantitative pyrosequencing analysis. J Biomol Screen 2012;17:987-92.

89. Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Li LC i sur. Multigene methylation analysis for detection and staging of prostate cancer. Clin Cancer Res 2006;47.

90. Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N, Heukamp LC, Müller SC, von Ruecker A. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. Clin Cancer Res 2005;11:4097-106.

91. Richiardi L, Fiano V, Grasso C, Zugna D, Delsedime L, Gillio-Tos A, Merletti F. Methylation of APC and GSTP1 in Non-Neoplastic Tissue Adjacent to Prostate Tumour and Mortality from Prostate Cancer. PLoS One 2013 Jul [pristupljeno 31.08.2021.];8:7-e68162. Dostupno na: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0068162

92. Zhang W, Jiao H, Zhang X, Zhao R, Wang F, He W i sur. Correlation between the expression of DNMT1, and GSTP1 and APC, and the methylation status of GSTP1 and APC in association with their clinical significance in prostate cancer. Mol Med Rep 2015;12:141-6.

93. Moreira-Barbosa C, Barros-Silva D, Costa-Pinheiro P, Torres-Ferreira J, Constancio V, Freitas R i sur. Comparing diagnostic and prognostic performance of two-gene promoter methylation panels in tissue biopsies and urines of prostate cancer patients. Clin Epigenetics 2018 Oct [pristupljeno 31.08.2021.];10:132. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6206889/

94. Partin AW, Van Neste L, Klein EA, Marks LS, Gee JR, Troyer DA i sur. Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. J Urol 2014;192:1081-7.

95. Rybicki BA, Rundle A, Kryvenko ON, Mitrache N, Do KC, Jankowski M i sur. Methylation in benign prostate and risk of disease progression in men subsequently diagnosed with prostate cancer. Int J Cance. 2016;138:2884-93.

96. Zhang Y, Li B, Sun Q, Wu X, Chen Q, Li Z, Mo J. Association between APC promoter

methylation and clinicopathological features of patients with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis with PRISMA guideline. Transl Cancer Res 2017;6:2.

97. Gardiner RA, Samaratunga MLTH, Gwynnej RA, Clague A, Seymour GJ, Lavin MF. Abnormal prostatic cells in ejaculates from men with prostatic cancer - A preliminary report. Br J Urol 1996;78:414-8.

98. Suh CI, Shanafelt T, May DJ, Shroyer KR, Bobak JB, Crawford ED i sur. Comparison of telomerase activity and GSTP1 promoter methylation in ejaculate as potential screening tests for prostate cancer. Mol Cell Probes 2000;14:211-7.

99. Goessl C, Müller M, Heicappell R, Krause H, Miller K. DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates. Ann NY Acad Sci 2001;945:51-8.

100. Fernandez-Garcia D, Hills A, Page K, Hastings RK, Toghill B, Goddard KS i sur. Plasma cell-free DNA (cfDNA) as a predictive and prognostic marker in patients with metastatic breast cancer. Breast Cancer Res 2019 Dec [pristupljeno 31.08.2021.];21:149. Dostupno na: https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-019-1235-8

101. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. Biol Rev Camb Philos Soc 2018;93:1649-83.

102. Huang J, Wang L. Cell-free DNA methylation profiling Analysis— Technologies and bioinformatics. Cancers 2019;11:1741.

103. Moss J, Magenheim J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A i sur. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. Nat Commun 2018 Nov [pristupljeno 31.08.2021.];9:5068. Dostupno na: https://www.nature.com/articles/s41467-018-07466-6

104. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N i sur. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med. 2014;6:224.

105. Silva R, Moran B, Baird AM, O'Rourke CJ, Finn SP, McDermott R i sur. Longitudinal analysis of individual cfDNA methylome patterns in metastatic prostate cancer. Clin Epigenetics 2021 Aug [pristupljeno 01.09.2021.];13:168. Dostupno na: https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-021-01155-w

106. Friedemann M, Horn F, Gutewort K, Tautz L, Jandeck C, Bechmann N i sur. Increased Sensitivity of Detection of RASSF1A and GSTP1 DNA Fragments in Serum of Prostate Cancer Patients: Optimisation of Diagnostics Using OBBPA-ddPCR. Cancers (Basel) 2021;13(17).

107. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. Cancer Metastasis Rev 2016;35:347-76.

108. Daniunaite K, Jarmalaite S, Kalinauskaite N, Petroska D, Laurinavicius A, Lazutka JR, Jankevicious F. Prognostic value of RASSF1 promoter methylation in prostate cancer. J Urol 2014;192:1849-55.

109. Jatkoe TA, Karnes RJ, Freedland SJ, Wang Y, Le A, Baden J. A urine-based methylation signature for risk stratification within low-risk prostate cancer. Br J Cancer 2015;112:802-8.

110. Bryzgunova OE, Morozkin ES, Yarmoschuk SV, Vlassov VV, Laktionov PP. Methylation-specific sequencing of GSTP1 gene promoter in circulating/extracellular DNA from blood and urine of healthy donors and prostate cancer patients. Ann NY Acad Sci 2008;1137:222-5.

111. Van Den Brûle FA, Waltregny D, Liu FT, Castronovo V. Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of Galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. Int J Cancer 2000;89:361-7.

112. Araújo-Filho JL, Melo-Junior MR, Beltrão EIC, de Lima LRA, Antunes CBL, de Carvalho LB. Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate. Int J Clin Exp Pathol 2013;6:1861-7.

113. Ellerhorst J, Troncoso P, Xu XC, Lee J, Lotan R. Galectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostate cancer. Urol Res 1999;27:362-7.

114. Krušlin B, Ulamec M, Tomas D. Prostate cancer stroma: An important factor in cancer growth and progression. Bosn J Basic Med Sci 2015;15:1-8.

115. Levesque C, Nelson PS. Cellular constituents of the prostate stroma: Key contributors to prostate cancer progression and therapy resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8:a030510.

116. Hägglöf C, Bergh A. The stroma-a key regulator in prostate function and malignancy. Cancers 2012;4:531-48.

117. Balan V, Wang Y, Nangia-Makker P, Kho D, Bajaj M, Smith D i sur. Galectin-3: A possible complementary marker to the PSA blood test. Oncotarget 2013;4:542-9.

118. Nakajima K, Heilbrun LK, Hogan V, Smith D, Heath E, Raz A. Positive associations between galectin-3 and PSA levels in prostate cancer patients: A prospective clinical study-I. Oncotarget 2016;7:82266-72.

119. Nakajima K, Heilbrun LK, Smith D, Hogan V, Raz A, Heath E. The influence of PSA autoantibodies in prostate cancer patients: A prospective clinical study-II. Oncotarget 2017;8:17643-50.

120. Jones JL, Saraswati S, Block AS, Lichti CF, Mahadevan M, Diekman AB. Galectin-3 is associated with prostasomes in human semen. Glycoconj J 2010;27:227-36.

121. Ellinger J, Müller SC, Stadler TC, Jung A, von Ruecker A, Bastian PJ. The role of cell-free circulating DNA in the diagnosis and prognosis of prostate cancer. Urol Oncol 2011;29:124-9.

122. Yin C, Luo C, Hu W, Ding X, Yuan C, Wang F. Quantitative and Qualitative Analysis of Circulating Cell-Free DNA Can Be Used as an Adjuvant Tool for Prostate Cancer Screening: A Meta-Analysis. Dis Markers. 2016;2016:3825819.

123. Krasic J, Abramovic I, Vrtaric A, Nikolac Gabaj N, Kralik-Oguic S, Katusic Bojanac A i

sur. Impact of Preanalytical and Analytical Methods on Cell-Free DNA Diagnostics. Front Cell Dev Biol 2021 Sep [pristupljeno 07.09.2021.];6:686149. Dostupno na: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.686149/full

124. Arko-Boham B, Aryee NA, Blay RM, Owusu EDA, Tagoe EA, Shackie ESD i sur. Circulating cell-free DNA integrity as a diagnostic and prognostic marker for breast and prostate cancers. Cancer Genet 2019;235:65-71.

125. Sobhani N, Generali D, Zanconati F, Bortul M, Scaggiante B. Cell-free DNA integrity for the monitoring of breast cancer: Future perspectives? World J Clin Oncol 2018;9:26-32.

126. Salvianti F, Giuliani C, Petrone L, Mancini I, Vezzosi V, Pupilli C, Pinzani P. Integrity and quantity of total cell-free DNA in the diagnosis of thyroid cancer: Correlation with cytological classification. Int J Mol Sci 2017;18:1350.

127. Fawzy A, Sweify KM, El-Fayoumy HM, Nofal N. Quantitative analysis of plasma cell-free DNA and its DNA integrity in patients with metastatic prostate cancer using ALU sequence. J Egypt Natl Canc Inst. 2016;28:235-42.

128. Salvi S, Gurioli G, Martignano F, Foca F, Gunelli R, Cicchetti G i sur. Urine Cell-Free DNA Integrity Analysis for Early Detection of Prostate Cancer Patients. Dis Markers 2015 May [pristupljeno 07.09.2021.];6:686149. Dostupno na: https://www.hindawi.com/journals/dm/2015/574120/

129. Ponti G, Maccaferri M, Mandrioli M, Manfredini M, Micali S, Cotugno M i sur. Seminal Cell-Free DNA Assessment as a Novel Prostate Cancer Biomarker. Pathol Oncol Res 2018;24:941-5.

130. 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;38:5121-5.

131. Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, Micali M, Torricelli F, Milandri R i sur. Quick assessment of cell-free DNA in seminal fluid and fragment size for early non-invasive prostate cancer diagnosis. Clin Chim Acta 2019;497:76-80.

11. ŽIVOTOPIS

Irena Abramović, djevojački Dobrović, rođena je 9. lipnja 1994. u Zagrebu gdje je pohađala osnovnu školu i XV. gimnaziju. Godine 2013. upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer medicinska biokemija gdje je diplomirala 2018. Tijekom studija dobila je stipendiju za izvrsnost Sveučilišta u Zagrebu te stipendiju za dvomjesečni boravak u Sveučilišnoj bolnici u Padovi u sklopu Erasmus stručne prakse, pod vodstvom prof. Plebanija. Pripravnički staž završila je u KB Dubrava, a stručni i državni ispit polaže 2020. godine. Doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2018. godine. Na istoj instituciji zapošljava se 2018. u suradničkom zvanju, na radnom mjestu asistenta za rad na HRZZ projektu „Epigenetički biomarkeri raka prostate (epiPro)“, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sinčića. Također aktivno sudjeluje u znantsvenom radu Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu (CERRM) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U okviru navedenog HRZZ projekta i CERRM-a Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu autor je niza znanstvenih publikacija u indeksiranim časopisima i sažetaka predstavljenih na nacionalnim i međunarodnim kongresima. Sudjelovala je na brojnim nacionalnim i međunarodnim edukacijama. Aktivni je član Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDMBM), Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku dijagnostiku (HDMBLM) te Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB).