Metilacija nestaničnoga DNA gena RASSF1A u krvi i ejakulatu kao epigenetički biomarker u pacijenata sa seminomom testisa

Raos, Dora

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:105:812948

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

Dora Raos

Metilacija nestaničnoga DNA gena *RASSF1A* u krvi i ejakulatu kao epigenetički biomarker u pacijenata sa seminomom testisa

DISERTACIJA



Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Dora Raos

Metilacija nestaničnoga DNA gena *RASSF1A* u krvi i ejakulatu kao epigenetički biomarker u pacijenata sa seminomom testisa

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

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 u krvi i ejakulatu bolesnika sa seminomom testisa“ (epiSem, IP-2016-06-3692) i projektom Razvoja karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti (DOK-01-2018), voditelja prof.dr.sc. Davora Ježeka, dr. med. Ovu je disertaciju poduprijela 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: prof. dr. sc. Davor Ježek, dr.med.

Suvoditelj rada: izv. prof. dr. sc. Nino Sinčić, dr. med.

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Davoru Ježeku i komentoru izv. prof. dr. sc. Ninu Sinčiću na pomoći u izradi doktorske disertacije.

Veliko hvala svim sudionicima istraživanja.

Jedno veliko hvala Sobici, a posebno kolegicama Ireni i Tihani koje su uvijek bile tu kad mi je trebala pomoć, riječ ohrabrenja i podrška.

Neizmjerno hvala svim mojim prijateljima i Marku koji su slušali moje muke i koji su uvijek bili uz mene, bodrili me, smijali se te me hrabrili i navijali za mene kada je bilo najteže.

Veliko hvala članovima moje obitelji koja je bila tu tijekom cijelog mog obrazovanja i koji su ulagali u moje obrazovanje i profesionalni razvitak. Hvala im na neizmjernoj podršci i pomoći svaki puta kada bi nešto zapelo. Veliko im hvala za povjerenje i za to što ste me uvijek poticali da budem bolja i tjerali ste me do mojih maksimuma.

KRATICE

TT – tumori testisa

TGCT – tumori zametnih stanica testisa (engl. *testicular germ cell tumour*)

SE – seminom

GCNIS – neoplazija zametnih stanica *in situ* (engl. *germ cell neoplasia in situ*)

PGC – primordijalne zametne stanice (engl. *primordial germ cells*)

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

DNMT – DNA metiltransfreaza (engl. *methyltransferases*)

MBD – metil vezujući proteini (engl. *methyl- CpG-biding domain proteins*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

AFP – α-feto protein

hCG – humani korionski gonadotropin

LDH – laktat dehidrogenaza

ZDR – okolno tkivo testisa sa očuvanom spermatogenezom

OT – okolno tkivo

ZD – zdravi dobrovoljci

Preop – predoperativni uzorci

Postop – postoperativni uzorci

gDNA – genomski DNA (engl. *genomic DNA*)

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

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Anatomija testisa 1

1.2. Spermatogeneza 3

1.3. Tumori testisa 4

1.3.1. Epidemiologija 4

1.3.2. Klasifikacija tumora testisa 6

1.3.3. Etiologija 9

1.3.3.1. Čimbenici rizika 9

1.3.3.2. Embrionalna hipoteza razvoja TGCT-a 10

1.3.3.3. Genetičke promjene u TGCT-u 11

1.4. Klinička slika 13

1.5. Dijagnostika 13

1.5.1. Serumski biomarkeri 14

1.5.1.1. α-feto protein 14

1.5.1.2. Humani korionski gonadotropin 15

1.5.1.3. Laktat dehidrogenaza 16

1.5.1.4. Drugi serumski biomarkeri 16

1.6. Liječenje, dijagnoza i prognoza 17

1.7. Slobodni nestanični DNA 18

1.8. Metilacija DNA 19

1.9. Biomarkeri 22

1.10. *RASSF1A* 26

2. HIPOTEZA 31
3. SVRHA I CILJEVI RADA 32
4. ISPITANICI I METODE 33
4.1. Ispitanici 33
4.2. Metode 35
4.2.1. Prikupljanje i obrada uzoraka 35
4.2.2. Prikupljanje i obrada seminomskog tkiva 36
4.2.3. Imunohistokemijsko bojenje 36
4.2.4. Morfološka analiza imunohistokemijskog bojenja 38
4.2.5. Izolacija i kvantifikacija cfDNA iz krvne i sjemene plazme 38
4.2.6. Izolacija gDNA iz parafinskih blokova tkiva 40
4.2.7. Početnice za PCR i pirosekvenciranje 42
4.2.8. Bisulfitna konverzija izoliranoga gDNA i cfDNA 43
4.2.9. PCR (lančana reakcija polimerazom) 44
4.2.10. Pirosekvenciranje 47
4.2.11. Analiza podataka dobivenih pirosekvenciranjem 49
4.2.12. Statistička obrada podataka 50
5. REZULTATI 51
5.1. Pacijenti i dobrovoljci 51
5.2. Analiza ekspresije gena *RASSF1A* na proteinskoj razini u tkivu 51
5.3. Metilacija gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u tkivu 53
5.4. Odnos metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* s ekspresijom na proteinskoj razini u tkivu 56

5.5. Analiza metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u tekućinskim biopsijama 58
5.5.1. Krv 58
5.5.2. Ejakulat 62
5.6. Usporedba metilacije gDNA u tkivu seminoma i metilacije cfDNA iz tekućinskih biopsija 64
6. RASPRAVA 68
6.1. Odnos ekspresije gena *RASSF1A* na proteinskoj razini i metilacije gDNA u SE 69
6.2. Odraz metilacije gDNA iz tkiva SE na cfDNA 71
6.3. Metilacija cfDNA kao biomarker za probir pacijenata 72
6.4. Metilacija cfDNA kao biomarker za praćenje pacijenata 73
6.5. Analiza metilacije DNA na razini svakog pojedinog CpG-a 74
7. ZAKLJUČAK 76
8. SAŽETAK 77
9. SUMMARY 78
10. POPIS LITERATURE 79
11. ŽIVOTOPIS 90

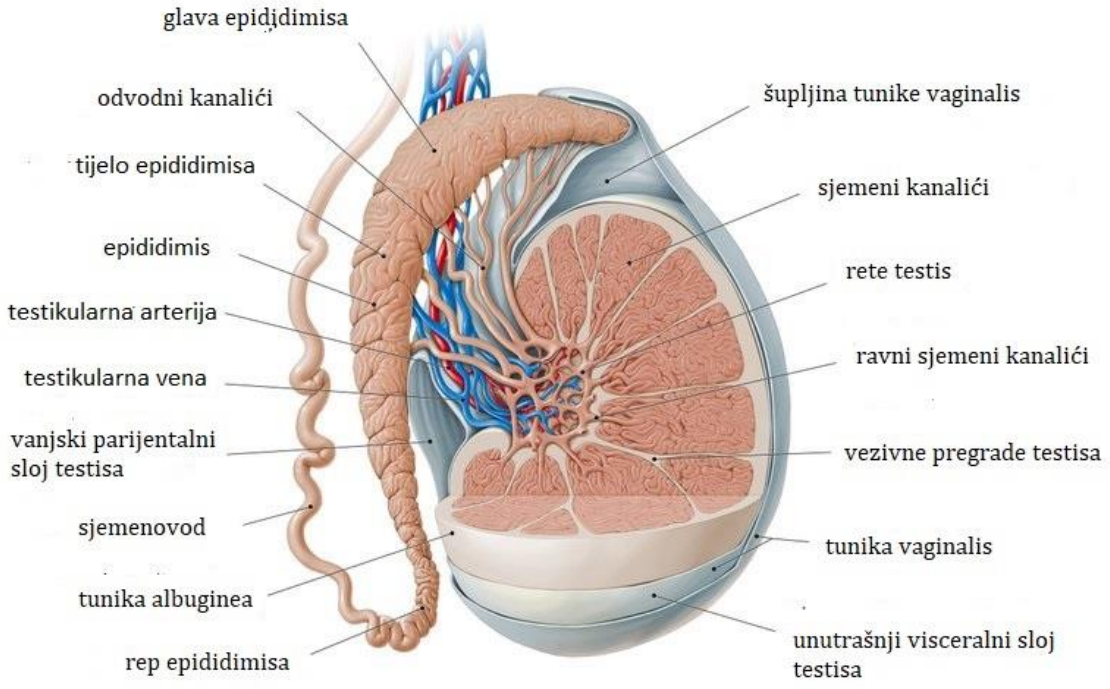
1. UVOD

1.1. Anatomija testisa

Sjemenik ili testis je parna žlijeda, ovalnog oblika koji igra važnu ulogu u muškom reproduktivnom sustavu. Iako se nalazi u mošnji (skrotumu), izvan tjelesnih šupljina, to je unutarnji muški spolni organ. U testisu se stvaraju, umnožavaju i sazrijevaju spermiji te izlučuju muški spolni hormoni. Testis je spljoštenog, elipsoidnog obika. U zdravih odraslih muškaraca testis je obično volumena 15-25 ml (1) i dužine između 4,5 do 5,1 cm (2). Lijevi i desni testis razlikuju se po tome što je lijevi testis obično većeg promjera i nalazi se niže od desnog testisa. Na svakom testisu razlikujemo dvije strane, medijalnu (lat. *facies medialis*) i lateralnu (lat. *facies lateralis*), dva ruba, prednji (lat. *margo anterior*) i stražnji (lat. *margo posterior*) te dva pola, gornji i donji (lat. *polus superior et inferior*). Prednji rub je gladak i konveksan, dok je stražnji rub prekriven epididimisom (pasjemenikom) koji prelazi u sjemeni tračak (funikulus) i kroz njega prolaze žile, živci te odvodni kanalić spermija. Hilus je početni dio funikulusa (3).

Parenhim svakog testisa obavijen je kapsulom koju čine tunika vaginalis (lat. *tunica vaginalis)*, tunika albuginea (lat. *tunica albuginea*) i tunika vaskuloza (lat. *tunica vasculosa).* Tunika vaginalis je serozna vreća koja potječe od potrbušnice. Ona se se sastoji od 2 sloja, vanjskoj parijentalnog (lat. *lamina parietalis tunicae vaginalis testis*) i unutrašnjeg visceralnog (lat. *lamina visceralis tunicae vaginalis testis*), a prekriva tuniku albugineu na prednjoj i lateralnim stranama testisa. Tunika albuginea je debela, vezivna čahura koja testisu daje karakterističnu bijelu boju i čvrstoću, dok je tunika vaskuloza bogata krvnim žilama. Na stražnjoj strani testisa nalazi se zadebljanje tunike albuginee koje se naziva medijastinum (lat. *mediastinum testis)*. Od medijastinuma kroz tkivo testisa na sve strane protežu se uske vezivne pregrade (lat. *septae)* i dijele parenhim testisa na 250 odjeljaka piramidalnog oblika koji se nazivaju režnjići testisa (lat. *lobuli testis*). Pregrade su nepotpune pa su režnjići međusobno povezani. U svakom se režnjiću nalazi od 1 do 4 zavijenih sjemenih kanalića koji su uloženi u rahlo vezivno tkivo bogato limfnim i krvnim žilama, živcima i

intersticijskim (Leydigovim) stanicama. Funkcija Leydigovih stanica je sinteza androgenih hormona, stimulirana luteinizirajućim hormonom iz hipofize. Baza režnjića okrenuta je prema površini testisa, a vrhovi prema medijastinumu. Na vrhovima režnjića, spajanjem sjemenih kanalića nastaju ravni kanalići (lat. *tubuli seminiferi recti*). Oni povezuju sjemene kanaliće s mrežom međusobno povezanih kanalića (lat. *rete testis*), koja se nalazi u vezivnom tkivu medijastinuma. Rete testis su s 10-20 odvodnih kanalića (lat. *ductuli efferentes*) povezane s glavom epididimisa. Epididimis ili nadsjemenik prekriva gornji i stražnji kraj testisa i služi za pohranu spermija. Od epididimisa nastavlja se struktura cjevastog oblika, sjemenovod (lat. *ductus deferens*) (Slika 1). Sjemenovod se spaja s odvodnim kanalom sjemenog mjehurića (lat. *vesicula seminalis*) i čini uski kanalić (lat. *ductus ejaculatorius*) koji prolazi kroz stražnji dio baze prostate i otvara se u uretru (4).

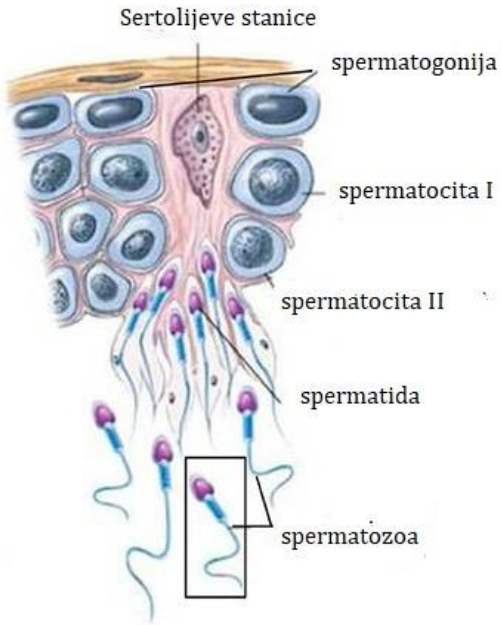


Slika 1. Anatomija testisa. Testis je građen od parenhima kojeg obavija vezivna čahura i u uskoj je vezi s epididimisom. (Preuzeto i prilagođeno prema *https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-testes* (5)).

1.2. Spermatogeneza

Spermatogeneza je proces nastajanja muških spolnih stanica, spermija. Spermiji se proizvode u sjemenim kanalićima. Sjemeni kanalići sastoje se od vezivno-mišićne ovojnice, bazalne membrane i zametnog epitela. Zametni epitel sastoji se od 2 vrste stanica: Sertolijevih stanica i stanica koje čine spermatogenetsku lozu. Sertolijeve stanice su potporne stanice koje ne prolaze kroz spermatogenezu nego ju omogućuju svojom morfologijom i fiziologijom. Stanice spermatogenetske loze odgovorne su za proizvodnju spermija. Spermatogeneza započinje s primitivnom spolnom stanicom, spermatogonijom koja je smještena uz bazalnu membranu. Mitotičke diobe spermatogonija omogućavaju kontinuiranu obnovu populacije matičnih stanica spermatogeneze. Novonastale stanice, u određenim uvjetima diferenciraju se u primarne spermatocite koje se dijele mejozom. Prvom mejotskom diobom nastaju sekundarne spermatocite s haploidnim brojem kromosoma (n=23). One se dalje dijele te diobom svake sekundarne spermacite nastaju 2 haploidne spermatide. Završni stadij sazrijevanja spermija naziva se spermiogeneza. U toj fazi spermatide se pretvaraju u spermije. Pod utjecajem testosterona koji aktivira odstranjivanje nepotrebne citoplazme i organela, iz spermatida se formiraju spermiji koje se nalaze u lumenu sjemenih kanalića. Spermiji imaju svojstven oblik i imaju bič, flagel, koji je iznimno bitan za uspješno spajanje sa ženskom spolnom stanicom. Faza spermiogeneze završava kada sazrijeli spermiji napuste zametni epitel testisa (Slika 2) (6).

Mikroskopski pogled na sjemeni kanalić pokazuje da spermatogeneza počinje uz bazalnu membranu sjemenih kanalića te se prema lumenu pojavljuju sve kasniji stanični oblici do spermija u lumenu. Spermatogeneza se ne odvija sinhrono u svim sjemenim kanalićima ili njihovim dijelovima, stoga se mikroskopskim pregledom parenhima testisa mogu uočiti svi stanični stadiji spermatogeneze istovremeno (7).



Slika 2. Spermatogeneza. Spermatogeneza je proces nastajanja muških spolnih stanica koji osim morfoloških i fizioloških procesa uključuje i biološki proces diobe stanica mitozom i mejozom. (Preuzeto i prilagođeno prema *Sharma R. and Agarwal A, Springer (New York), 2011.* (8)).

1.3. Tumori testisa

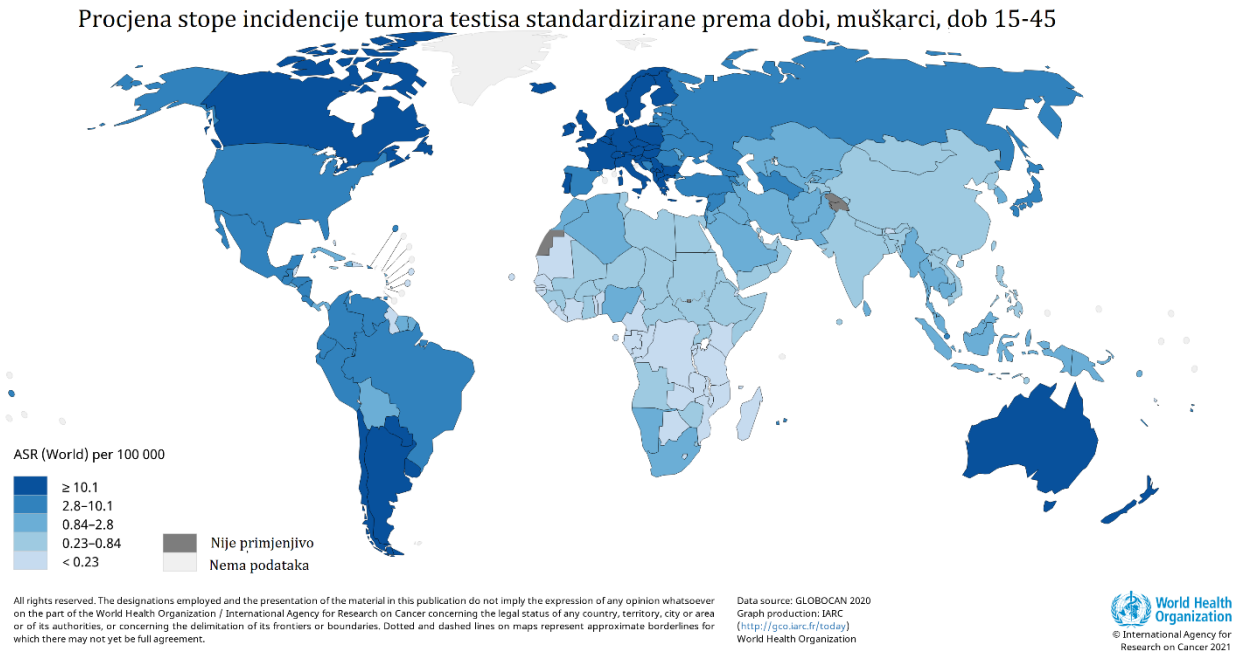
1.3.1. Epidemiologija

Tumori testisa (TT) predstavljaju jedan od najčešćih solidnih malignih tumora u mladih muškaraca između 15. i 45. godine života. Različiti TT čine samo 1 % svih tumora u muškaraca i 5 % svih uroloških tumora. Međutim, najučestaliji su tumori u najreproduktivnijoj dobi muškaraca zbog čega imaju negativan zdravstveni, socioekonomski i demografski učinak na društvo (9,10). Incidencija TT značajno varira ovisno o rasi. Incidencija je izrazito visoka u populaciji europskog podrijetla (6-12 na 100.000 stanovnika), pogotovo u skandinavskim zemljama, a godišnje povećanje stope incidencije je 3-6 % (Slika 3) (11). U populaciji afričkog podrijetla rizik od TT je puno manji, stopa incidencije je 0,3 na 100.000 stanovnika i ne povećava se značajno ili uopće na godišnjoj razini (12).

U zadnjih 20 godina, incidencija tumora testisa na globalnoj razini, porasla je za 70 % (13,14). Populacija Republike Hrvatske ima srednju stopu učestalosti u odnosu na druga europska društva, ali ima brz i stalan porast godišnje incidencije (15). U mnogim istraživanjima uočeno je da stopa incidencije TT stagnira ili čak lagano opada. Međutim za Hrvatsku nije uočen isti trend, nego upravo suprotno. Na temelju „*model-based"* istraživanja koje je koristilo registrirane podatke o stanovništvu u 40 zemalja, otkriveno je da se Republika Hrvatska nalazi među tri europske države s najvećom stopom rizika od TT te je procijenjeno da će godišnje oko 1 od 100 muškaraca biti dijagnosticirano s TT do 2025. godine (16).

Stopa mortaliteta TT pokazuje obrnuti trend od stope incidencije. Stopa mortaliteta blago opada ili je stabilna u većini ekonomski razvijenih zapadnih zemalja (17,18). Međutim, iako zdravstveni sustav u Republici Hrvatskoj primjenjuje jednake smjernice i najnovija postignuća kao i zapadne zemlje, takav trend nije uočen za hrvatsku populaciju. Dapače stopa mortaliteta je u blagom porastu.

Zbog toga se usprkos činjenici da je razvoj medicinske dijagnostike i terapije doveo do stope izlječenja veće od 95 %, još uvijek istražuju i unaprjeđuju različiti pristupi liječenju TT (19,20). Dodatno, budući da se TT i dalje snažno tabuiziraju u društvu, veliki udio pacijenata s TT prvi se puta javlja u zdravstveni sustav s već uznapredovanom bolesti (21). Stoga postoji potreba za razvojem novih dijagnostičkih pretraga koje će biti manje invazivne i pacijentima prihvatljivije, a u svrhu pravovremenog odlaska na zdravstveni pregled tijekom kojeg se bolest može dijagnosticirati u ranijem stadiju.



Slika 3. Globalna incidencija TT. Stopa incidencije TT u svijetu određena na 100.000 stanovnika. Tamno plava boja označava vrlo visoku, dok svjetliji tonovi označavaju nisku stopu incidencije. (Preuzeto i prilagođeno prema *Sung i sur., CA Cancer J Clin , 2021.* (22))

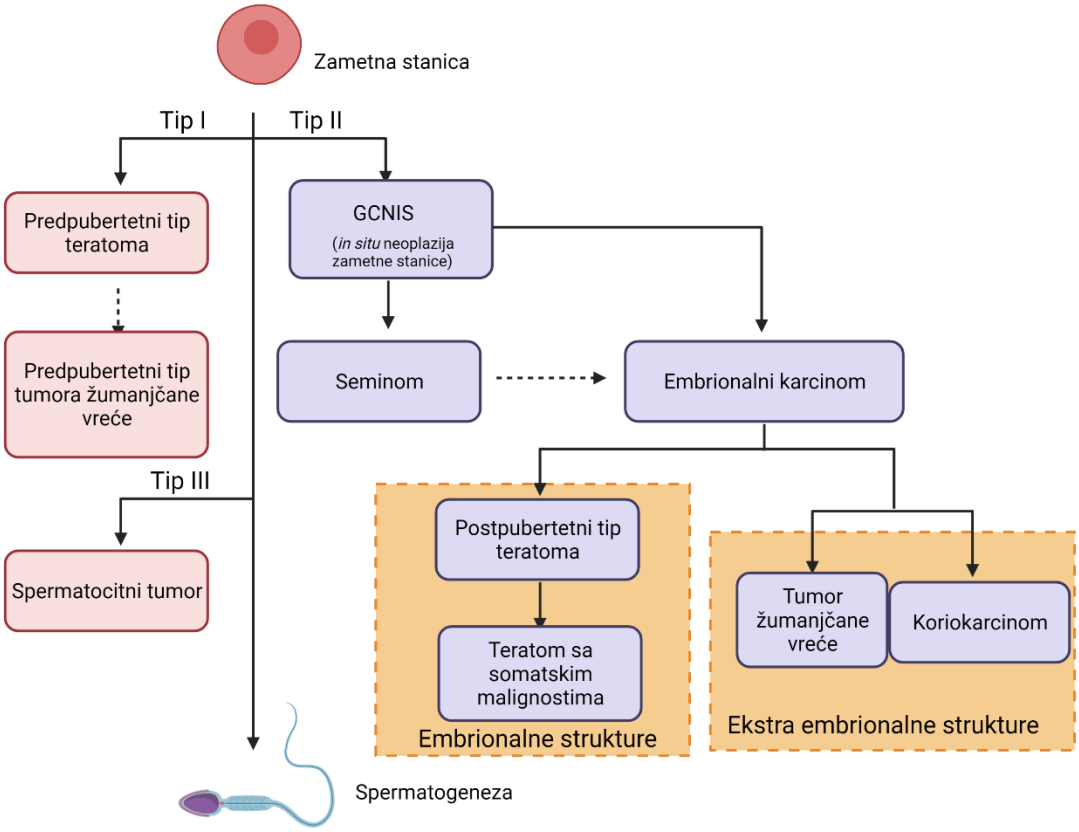
1.3.2. Klasifikacija tumora testisa

Većinu TT čine tumori zametnih stanica testisa (engl. *testicular germ cell tumours, TGCT*), dok su tumori nezametnih stanica testisa i stromalni tumori spolnog tračka izrazito rijetki. Prema današnjem klasifikacijskom sistemu kojeg je 2016. objavio WHO (23), TGCT se dijele na TGCT koji potječu od neoplazije zametnih stanica *in situ* (engl. *germ cell neoplasia in situ, GCNIS*) i TGCT koji ne potječu od GCNIS-a (Slika 4). Ta klasifikacija odražava potencijal razvoja TGCT iz stanica različitog podrijetla o čemu ovisi patogeneza tumora. Doista, svi TGCT-ovi predstavljaju aberantan razvoj zametne stanice (u različitim fazama sazrijevanja) prema potpunoj spermatogenezi, što objašnjava njihovu histološku različitost. TGCT koji ne potječu od GCNIS-a pripadaju skupinama TGCT tipa I i TGCT tipa III. TGCT tipa I obuhvaćaju predpubertetske teratome i tumore žumanjčane vreće, dok TGCT tipa III obuhvaćaju spermatocitne tumore, čije stanice nalikuju sekundarnim spermatocitama i uglavnom se javljaju kod muškaraca starije dobi.

TGCT koji potječu od GCNIS-a su klasificirani kao TGCT tipa II te su najčešći TT. GCNIS je premaligna lezija koja se uvijek nalazi u okolini TGCT-a tipa II, a odnosi se na proliferaciju displastičnih stanica koje se još uvjek nalaze unutar sjemenih kanalića. GCNIS se može razviti u bilo koji TGCT tipa II (24).

TGCT tipa II histološki je vrlo heterogena grupa koja je podijeljena na dvije glavne skupine; seminome (SE) i neseminome. Čisti SE čine oko 55% TGCT-a. Najveću incidenciju imaju u muškaraca u tridestim i četrdesetim godinama života, a vrlo rijetko mogu se pojaviti i kasnije. Također, ali vrlo rijetko se mogu pojaviti prije adolescentske dobi.

SE potječu iz zametnog epitela sjemenih kanalića i čine homogene neoplazije. Sastoje se od gonocita s karakteristikama zametnih stanica i imaju neinvazivan fenotip (25). Neseminomi se javljaju u mlađoj životnoj dobi sa srednjom starosti pacijenata oko 25 godina. Neseminomi predstavljaju heterogenu skupinu tumora koji imaju različite histološke i biološke značajke. Mogu se sastojati od čistih ili mješovitih komponenata embrionalnog karcinoma, teratoma, tumora žumanjčane vreće i koriokarcinoma. Komponente se najčešće nalaze u različitim kombinacijama i udjelima, a u mješovitoj formi može biti prisutna i SE forma (26). Ova se doktorska disertacija odnosi na TGCT tip II, te će se zbog jednostavnijeg razumijevanja u daljnjem tekstu TGCT koristiti isključivo za taj tip tumora.



Slika 4. Klasifikacija TGCT-a prema WHO klasifikaciji. TGCT se klasificiraju prema tome potiču li iz premaligne lezije *in situ* ili ne. Prema takvom klasifikacijskom sistemu postoje 3 tipa TGCT-a, a najčešći su TGCT tipa II. (Izrađeno s *BioRender.com*)

1.3.3. Etiologija

Etiologija TGCT-a nije posve razjašnjena, ali pretpostavlja se da je razvoj TGCT dio sindroma testikularne disgeneze (27). Smatra se da je ovaj sindrom posljedica izloženosti endogenim ili okolišnim čimbenicima, osobito ksenoestrogenskim hormonskim disruptorima, koji negativno utječu na normalan razvoj muške spolne žlijezde. Iz toga slijedi da veliku ulogu u nastanku TGCT-a imaju razni (epi)genetički čimbenici i (mikro)okolišni (13).

1.3.3.1. Čimbenici rizika

Sindrom testikularne disgeneze predstavlja niz povezanih poremećaja koji predstavljaju rizik za nastanak tumora testisa. Neki od tih poremećaja su kriptorhizam, hipospadija i poremećena spermatogeneza (28).

Kriptorhizam je jedan od najvažnijih čimbenika rizika, no ako je učinjena orhidopeksija prije 10. godine života, rizik za tumor testisa je manji. Kriptorhizam se odnosi na nespuštene testise koji se nalaze negdje unutar ingvinalnog kanala ili abdominalne šupljine jer nije došlo do potpunog spuštanja u mošnje. Incidencija kriptorhizma je 3 % pri rođenju, više unilateralno nego bilateralno. U približno 80 % svih slučajeva testis će se ipak spontano spustiti u skrotum, te je incidencija kriptorhizma u prvoj godini života tek 1 %. Kriptorhizam dovodi do degeneracije Sertolijevih stanica i gubitka Leydigovih stanica zbog čega dolazi do atrofije i abnormalne spermatogeneze (29). Dugotrajne komplikacije kriptorhizma su 40 puta veći relativni rizik za nastanak tumora testisa od kojih su najviše zastupljeni SE. Također se blago povećava i rizik za razvoj tumora u kontralateralnom, normalno spuštenom testisu (30).

Hipospadija je kongenitalna deformacija gdje se uretra (lat. *meatus urethrae*) pojavljuje s donje strane penisa, bilo gdje od glansa do perineuma i to u 1 od 250 novorođene muške djece. Približno 8 % slučajeva se javlja u djece čiji otac ima hipospadiju i 14 % djece čija braća imaju hipospadiju. Nastaje kao posljedica nepotpunog zatvaranja uretralnih nabora s donje strane penisa tijekom embrionalnog razvoja, što je povezano s oštećenom produkcijom ili metabolizmom fetalnih androgena (31).

Čimbenici rizika za nastanak TGCT-a su još neoplazija u kontralateralnom testisu i neplodnost te pozitivna obiteljska anamneza i određeni okolišni čimbenici (15).

Obiteljska genetika pridonosi više od 40 % TGCT što je treća po redu najveća stopa među svim vrstama raka, samo tumor štitnjače i tumori endokrinih žlijezda imaju veću stopu utjecaja genetike. Unatoč tome, više od 90 % muškaraca koji imaju TGCT, nemaju pozitivnu obiteljsku anamnezu (32). Međutim za muškarce s pozitivnom obiteljskom anamnezom rizik je znatno povećan. Naime braća pacijenata oboljelih od TGCT-a imaju 8 do 10 puta, očevi 4 puta, a sinovi 6 puta veći rizik od obolijevanja u usporedbi s općom populacijom (30,31). Također, u monozigotnih blizanca ako jedan razvije TGCT, drugi blizanac ima veći rizik za razvitak TGCT-a u odnosu na opću populaciju (34).

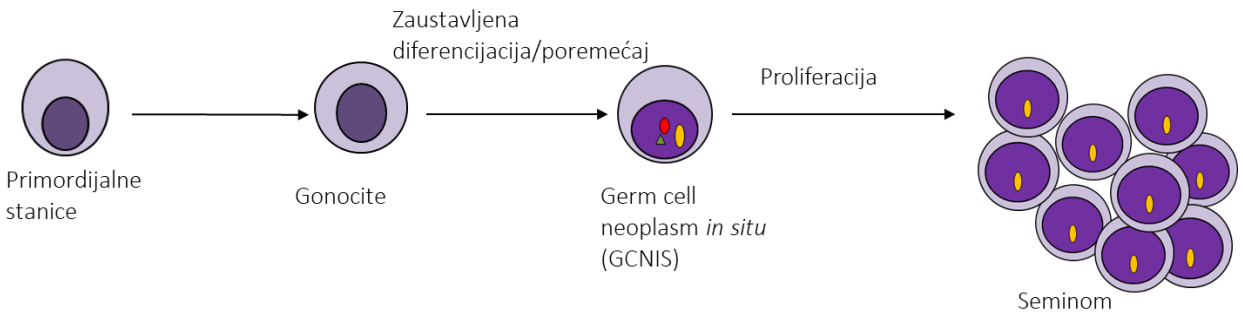
Što se tiče okolišnih čimbenika, uočeno je da su muška djeca majki koje su tijekom trudnoće uzimale velike koncentracije sintetskog estrogena, dietilstilbestrola (DES), imala veću incidenciju abnormalnosti testisa. Osim dietilstilboestrola, povećani rizik od oboljevanja primijećen je i kod dugotrajnog izlaganja polivinil-kloridu (35).

1.3.3.2. Embrionalna hipoteza razvoja TGCT-a

Primordijalne zametne stanice (engl. *primordial germ cells, PGC*) su spolne prastanice koje putuju iz proksimalnog epiblasta kroz mezenterij do spolnog nabora i postaju gonocite. Za migraciju i diferencijaciju PGC-a ključan je signalni put *KIT/KITLG*. U PGC-u i gonocitama eksprimiran je veliki broj markera matičnosti, PLAP, NANOG, KIT, SOX2, SALL4 i POU5F1 koji su karakteristični za rani embrionalni razvoj (36).

PGC i gonocite su rane embrionalne stanice koje su prošle kroz proces demetilacije DNA kako bi se mogle razviti zametne stanice ovisno o spolu djeteta (37). U slučaju prisutstva Y kromosoma, *Sry* regija koja se nalazi na Y kromosomu aktivira *SOX9* te dolazi do rasta Sertolijevih stanica (38). Sertolijeve stanice stvaraju mikrookoliš u kojem se gonocite diferenciraju u pre-spermatogonije i spermatogonije. Proteinska ekspresija gena u gonocitama i prespermatogonijama značajno se mijenja tijekom embriogeneze: broj specifičnih embrionalnih proteina postupno se smanjuje, a većina ih na kraju nestaje (39–41). Međutim tijekom procesa diferencijacije, unutar sjemenih

kanalića može doći do nastanka premaligne lezije koju prema WHO klasifikaciji nazivamo GCNIS (23). Valja ponoviti da od GCNIS-a potječu i SE i NS tumori. Smatra se da do nastanka GCNIS-a dolazi već *in utero*. Naime, fetalne zametne stanice zaustavljaju diferencijaciju te ostaju u stadiju PGC/gonocita. Kako PGC i gonocite imaju izbrisani prirodni obrazac metilacije DNA, podložne su (epi)mutacijama za vrijeme replikacije DNA (42). To može dovesti do supresije gena supresora tumora i aktivacije onkogena te se gonocite preobražavaju u GCNIS. Smatra se da tijekom puberteta zbog utjecaja hormona dolazi do intenzivne proliferacije stanica GCNIS-a nakon čega dolazi do progresije i razvoja invazivnih TGCT-a (Slika 5) (43).



Slika 5. Razvoj GCNIS-a iz zaustavljenih gonocita. Pod utjecajem (epi)genetičkih i mikrookolišnih čimbenika dolazi do zaustavljanja ili poremećaja razvoja gonocita i nastaje GCNIS. Stanice GCNIS-a sadrže mutacije gena i poremećenu metilaciju DNA (crveni, zeleni i žuti oblici predstavljaju redom mutacije gena i aberantnu metilaciju DNA). Iz stanica GCNIS-a dolazi do nastanka seminoma i sve stanice seminoma nose istu mutaciju, npr. mutaciju *KIT* gena.

1.3.3.3. Genetičke promjene u TGCT-u

Unatoč histološkoj heterogenosti, većina TGCT-a ima dodatni genetički materijal na 12p kromosomu. U 80 % TGCT-a to je izokromosom kratkog kraka kromosoma 12 (i12p) što ga zbog tolike zastupljenjosti čini specifičanim genetskim markerom TGCT-a. Njegova biološka funkcija

u tumoru još uvijek nije poznata. Međutim, kako u GCNIS-u nedostaje amplifikacija 12p kromosoma, smatra se da su onkogeni i geni supresori tumora na 12p uključeni u razvoj TGCT-a iz GCNIS-a (44,45).

Osim kromosomskih duplikacija za TGCT su karatkteristični gubitak heterozigotnosti, delecije gena, i polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotid polymorphism*, *SNP*) (46,47).

Za seminome je karakteristična hipertriploidija, dok je za neseminome karakteristična hipotriploidija (48).

Ekspresija *KIT* tirozin kinaze iznimno je važna za normalan razvoj zametnih stanica tijekom ranog embrionalnog razvoja, nakon čega njegova ekspresija naglo pada. To je najčešće mutirani gen u TGCT. *KIT* je rijetko eksprimiran u normalnim zametnim stanicama međutim njegova ekspresija je uočena u GCNIS-u, u slučaju kada je GCNIS bio jedina patologija, ali i kada je bio pronađen uz invazivne TGCT (49). Kod TGCT-a, *KIT* je često mutiran u SE dok je u neseminomima vrlo rijetko mutiran ili mutacija uopće nije uočena (49). Uz *KIT*, najčešće mutirani geni u TGCT-u su *TP53, KRAS/NRAS* i *BRAF* koji se smatraju uključenim u patogenezu nastanka tumora (50,51).

U TGCT-u nađeno je 14 polimorfizama gena koji su povezani s većim rizikom od TGCT-a (13). *KITLG* SNP ima najjaču povezanost s razvojem TGCT-a (47). *KITLG* je potreban za više aspekata razvoja PGC/ gonocita. Ključan je za *KIT/KITLG* signalni put koji regulira preživljenje, proliferaciju i migraciju embrionalnih zametnih stanica. Zaustavljena diferencijacija PGC/gonocita te razvoj TGCT-a može biti rezultat zadržane aktivacije ovog signalnog puta (52).

Ostali polimorfizmi gena usko su povezani s *KIT/KITLG* signalim putom koji predstavlja središnji dio molekularne patologije TGCT-a i jako je osjetljiv na onkogene stimulanse.

1.4. Klinička slika

Dokazano je da 5 % pacijenata s TGCT-om u jednom testisu, imaju GCNIS u drugom testisu. Premaligna lezija ne stvara simptome jer se ne nalazi tumorska masa, iako u pojedinim slučajevima može stvarati probleme neplodnosti (53).

TGCT se najčešće prezentiraju kao jednostrana, bezbolna tvorba u testisu koju pacijent napipa u skrotumu. Tupa bol u skrotumu se pojavljuje u 27 % slučajeva, dok se akutna jaka bol javlja tek u 10 % slučajeva (54). Od ostalih simptoma može se javiti ginekomastija, međutim u samo 1 % slučajeva nalazi se i tumor zametnih stanica/gonadalni tumor testisa (55). Također u 11 % slučajeva, bol se prezentira u leđima i u lumbalnom dijelu te se pri obradi suspektnog pacijenta mora uključiti pregled abdomena, toraksa i supraklavikularnih područja (21). U 10 % oboljelih, TGCT oponaša orhiepididimitis zbog čega dolazi do otežane i zakašnjele dijagnoze. U slučaju TGCT-a u metastatskom stadiju, može se primijetiti i niz drugih simptoma poput gubitka tjelesne težine, prisutnosti tvorbe u vratu, tegoba s disanjem i boli u kostima.

Ponekad se sumnja na TGCT postavi kao slučajan nalaz prilikom ultrazvuka testisa u sklopu obrade drugih bolesti, kao što je neplodnost (56).

Kako se TGCT ipak najčešće javlja kao izraslina u skrotumu, prema svakom pacijentu s tom smetnjom postupa se kao da ima tumor testisa dok se dijagnostičkim postupcima ne dokaže suprotno (57).

1.5. Dijagnostika

Uz uzimanje osobne i obiteljske anamneze, u dijagnostici TT prvo se radi fizikalni pregled kako bi se otkrila tvorba u skrotumu testisa. Ako postoji sumnja na TT, sljedeći korak je ultrazvuk (UTZ). Ultrazvukom testisa možemo ustanoviti nalazi li se tvorba unutar ili izvan testisa te odrediti volumen i lokaciju tumora. UZV pregled uključuje i obavezni pregled kontralateralnog testisa kako bi se isključila kontralateralna lezija. Specifičnija i osjetljivija metoda od UTZa je magnetska

rezonanca (MR), ali se ne koristi zbog cijene i dostupnosti u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Nakon potvrde dijagnoze TT kompjutoriziranom tomografijom (CT) određuje se stadij bolesti tj., utvrđuje se je li se tumor proširio na područje toraksa, abdomena i zdjelice. Postoji nekoliko stanja kao što su torzija testisa, epididimitis, hidrokela, varikokela, hernija, hematom, spermatokela i cista epididimisa, koja mogu diferencijalno dijagnostički upućivati na tumor testisa (58).

1.5.1. Serumski biomarkeri

Serumski biomarkeri izrazito su važni u rutinskoj dijagnostici određivanju stadija TGCT-a i praćenju pacijenata s TGCT-om. Doista, dijagnoza TT se donosi tek nakon fizikalnog pregleda, UZVa i određivanja vrijednosti triju glavnih serumskih biomarkera (59). Tri glavna serumska biomarkera su α-feto protein, humani korionski gonadotropin i laktat dehidrogenaza. Uz njih se još koriste i dodatni serumski bio markeri, a to su gamaglutamiltranspeptidaza i placentalne alkalne fosfataze. Osim u dijagnostici, oni se koriste za određivanje uspješnosti orhidektomije, u nadzoru progresije, povratka bolesti i odgovora na terapiju. Međutim, iako imaju veliku ulogu prilikom dijagnostike i praćenja pacijenata nakon orhidektomije, postoje slučajevi gdje TT može postojati i uz uredne serumske vrijednosti navedenih biomarkera. Također serumski biomarkeri mogu biti povišeni kod drugih malignih, ali i nemalignih stanja (60). Zbog takvih slučajeva istražuju se drugi biomarkeri koji bi potencijalno bili specifičniji i osjetljiviji od dosada korištenih biomarkera.

1.5.1.1. α-feto protein

α-feto protein (AFP) je glikoprotein koji su prvi opisali Bergstrand i Czar 1950-ih godina (61). On se normalno sintetizira tijekom trudnoće u žumanjčanoj vreći, fetalnoj jetri i u crijevu. Tijekom trudnoće, njegova uloga je supresija imunosnog sustava majke kako njezino tijelo ne bih odbacilo fetus. Najveća koncentracija AFP-a je između 12. i 14. tjedna trudnoće, a godinu dana nakon rođenja njegova koncentracija značajno pada (62).

Kod TGCT-a, AFP izlučuju stanice neseminomskih komponenti, embrionalnog karcinoma i tumora žumanjčane vreće (engl. *yolk-sac tumor*), dok stanice čistog SE uopće ne izlučuju AFP. U slučaju detekcije povišenog AFP-a pri dijagnozi SE, smatra se da se SE komponenta nalazi uz neku

od neseminomskih komponenata te se liječi kao mješoviti TSZT (63–65). Poluvrijeme razgradnje AFP-a je 5-7 dana.

Osim kod TGCT-a, najviša razina AFP javlja se u serumu pacijenata s hepatocelularnim karcinomom. Ostala maligna stanja u kojima je uočen povišeni AFP su rak gušterače, rak želuca, kolorektalni rak i rak bronha (66).

AFP može biti povišen i kod nemalignih stanja, kao što su virusni hepatitis, ciroza i trauma jetre (67).

1.5.1.2. Humani korionski gonadotropin

Humani korionski gonadotropin (hCG) je glikoprotein čija je povišena koncentracija otkrivena u tumorima zametnih stanica 1930. godine (68).

Tijekom normalne trudnoće, proizvode ga sinciciotrofoblastne stanice posteljice, kako bi održale žuto tijelo (lat. *corpus luteum*). Nakon trudnoće, povišenje hCG-a u serumu povezano je s brojnim zloćudnim tumorima kao što su rak jetre, pluća, gušterače, želuca i TGCT (69).

Povišene koncentracije hCG-a detektirane su i kod neseminoma i kod SE. Svi bolesnici s koriokarcinomom i 40-60 % pacijenata s embrionalnim karcinomom imaju povišene serumske razine hCG -a. U slučaju pacijenata s čistom formom seminoma, povišeni hCG detektiran je u 18-31 % slučajeva. Pacijenti sa SE kod kojih je uočena povišena razina serumskog hCG-a imaju istu prognozu kao i oni kod kojih nije uočena povišena razina hCG-a. Poluživot hCG-a je 24-36 sati (70).

Razvojem osjetljivijih i specifičnijih testova, otkriveno je da hipofiza također može lučiti hCG (71). Također zbog hipogonadizma može doći do poticaja hipofize na proizvodnju LH i hGC-a (72), a povezano je i konzumiranje marihuane, iako su prijavljeni oprečni podaci (73).

1.5.1.3. Laktat dehidrogenaza

Laktat dehidrogenaza (LDH) je stanični enzim koji se nalazi u svim tkivima u tijelu, a najveća koncentracija mu je u mišićima, jetri i mozgu.

Godine 1977., Boyle i Samuels dokazali su da razina LDH u serumu korelira s pojavom neseminoma, a potom je uočena i korelacija s čistom formom uznapredovalog SE (74). LDH, za razliku od AFP-a i hCG-a, nije specifičan marker za TGCT nego je marker koji ukazuje na destrukciju tkiva. Zbog toga se njegova koncentracija u serumu uvijek mora gledati u odnosu na druge serumske biljege kako bi se zaključilo da se radi o TGCT-u (70). Postoji pet izoformi LDH od kojih je u TGCT-u najčešće povišen LDH-1 (75). LDH je posebno koristan za praćenje pacijenata s uznapredovalim SE jer njegova povišena koncentracija korelira s volumenom tumora.

1.5.1.4. Drugi serumski biomarkeri

Osim tri glavna serumska biljega, postoje i drugi biomarkeri povezani s TGCT-om. Gamaglutamiltranspeptidaza (GGT) je enzim koji se prvenstveno nalazi u jetri i najčešće se koristi kao biljeg bolesti jetre, bilijarnog sustava i gušterače. Međutim, kod trećine pacijenata sa SE uočen je povišen GGT u serumu (76). Također, povišena koncentracija placentalne alkalne fosfataze (PLAP), često je uočena kod bolesnika sa SE, iako su povećane koncentracije PLAP -a također povezane s nizom drugih zloćudnih bolesti, ali i s pušenjem (77).

Spomenuti serumski tumorski biomarkeri od iznimne su kliničke važnosti u rutinskoj obradi pacijenata s TGCT-om i određivanju stadija tumora. Uistinu, u većini slučajeva TGCT-a, oko 60% pacijenata s TGCT-om prezentira se s povišenim klasičnim tumorskim markerima. Međutim, ostaje 40% pacijenata s tvorbom u testisu za koje se ne zna sa sigurnošću imaju li TGCT ili neku drugu bolest. Kod SE je to posebno važno jer pacijenti u samo 18-31% slučajeva imaju povišen hCG, dok je AFP uvijek negativan (78). Nakon orhidektomije potrebno je odrediti serumske biljege kako bi se vidio učinak operacije. Povišene vrijednosti biljega ili čak povećanje vrijednosti nakon učinjene orhidektomije upućuju na metastatsku bolest. Međutim, normalizacija vrijednosti tumorskih biljega nakon orhidektomije ne isključuje postojanje metastatske bolesti (78,79). Postojeći

serumski biomarkeri su doista izrazito važni i neizostavni u današnjoj kliničkoj praksi, ali zbog navedenih ograničenja intenzivno se istražuju drugi serumski biomarkeri koji bi potencijalno bili osjetljiviji i specifičniji za SE.

1.6. Liječenje, dijagnoza i prognoza

Prvi korak u liječenju TGCT-a je preoperativna obrada pacijenta zbog određivanja stadija bolesti, a nakon čega slijedi ingvinalna orhidektomija (80). Kod stadija bolesti I nije potrebna daljnja terapija, a ukoliko je bolest uznapredovala tj. prisutne su metastaze u limfnim čvorovima ili udaljenim organima, uz orhidektomiju slijedi kemoterapija bazirana na cisplatini i radioterapija. SE su radiosenzitivni tumori te adjuvantna radioterapija smanjuje mogućnost relapsa bolesti na 1-3 % (81). Zbog potencijalnih nuspojava radioterapija se primijenjuje samo kod pacijenata koji ne mogu dobiti kemoterapiju i kod starijih bolesnika.

Nakon orhidektomije, tkivo se šalje na patohistološku analizu te se makroskopski i mikroskopski detaljno pregledava. Makroskopski se opisuje veličina tumora, smještaj te odnos prema okolnim strukturama testisa, tuniki vaginalis, epididimisu i funikulusu. U mikroskopskom pregledu prati se histologija tumora, invazija tumora u krvne i limfne žile te u ovojnice testisa, rete testis, funikulus i epididimis (58). U slučaju nejasnog nalaza, upotreba imunohistokemijske analize može pomoći u dijagnozi tumora testisa pri čemu SE pokazuje pozitivnu reakciju na CD-117 (c-KIT), OCT ¾, SALL4, PLAP.

Temeljem patohistološkog nalaza SE se klasificira prema patološkoj TNM klasifikaciji te se određuje stadij bolesti. Prvi stadij označava lokaliziranu bolest unutar testisa, bez metastaza, u stadiju II nalaze se metastaze u regionalne limfne čvorove, a u stadiju III i u udaljene limfne čvorove i organe. (82).

Kod SE s obzirom na prognozu postoje pacijenti s dobrom prognozom i srednje rizični pacijenti, a ne postoje pacijenati s lošom prognozom. Petogodišnje preživljenje bez progresije u skupini pacijenata s dobrom prognozom povećalo se na 89 %, dok je u srednje rizičnoj skupini ono na 79%.

Na temelju toga ukupno preživljenje pacijenata je 95 % u skupini pacijenata s dobrom prognozom, odnosno 88 % u srednje rizičnoj skupini pacijenata.

1.7. Slobodni nestanični DNA

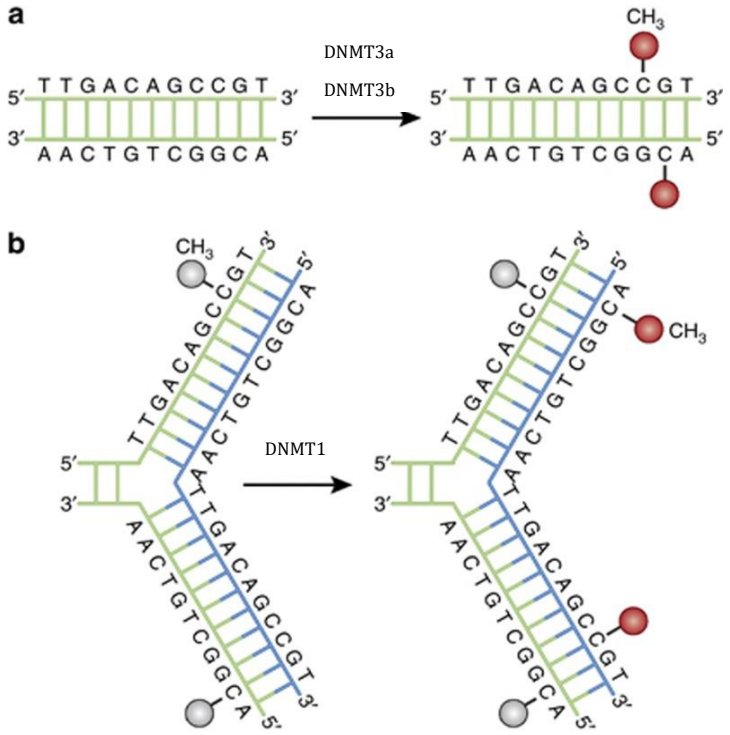
Slobodni nestanični DNA (engl. *cell-free DNA, cfDNA*) je dvostruki, fragmentirani DNA koji se nalazi izvan stanica, u tjelesnim tekućinama. Svojom veličinom odgovara veličini nukleosoma i sastoji se od 150 do 200 parova baza. CfDNA u tjelesne tekućine dolazi nekrozom, apoptozom ili aktivnom sekrecijom stanica (83). Većina cfDNA potječe iz stanica te može biti slobodni ili pakirani u mono- ili oligonukleosome. CfDNA prvo je bio opisan u krvi pacijenta s eritematoznim lupusom 1948 (84), a kasnije je detektiran i u ostalim tjelesnim tekućinama poput urina, sline, peritonealne tekućine itd. (85). Koncentracija cfDNA u zdravih pojedinaca je općenito mala i nije veća od 10 ng/mL plazme, dok je u onkoloških pacijentata koncentracija cfDNA povišena. Osim kod onkoloških pacijenata, povišene koncentracije cfDNA detektirane su i u plazmi trudnica i pacijenata koji su bili podvrgnuti transplantaciji organa (86,87). Također, povišene koncentracije cfDNA mogu biti odraz fizioloških (npr. pojačana tjelovježba) (88) i nemalignih patoloških procesa poput upale, dijabetesa, sepse i infarkta miokarda (89). Poluživot cfDNA ovisi o različitim čimbenicima koji uključuju povezanost cfDNA s molekularnim kompleksima koji sprečavaju degradaciju cfDNA, vrstom i stadijem tumora te načinom liječenja. Prosječno vrijeme poluživota cfDNA u plazmi je varijabilno te može biti između par minuta do 1-2 sata (90). U krvi, cfDNA degradiraju prvenstveno enzimi poput Dnaze 1, plazma faktora VII- aktivirajuće proteaze (FSAP) i faktora H (91). Eliminacija cfDNA događa se u jetri, slezeni i bubrezima (92,93). Kupferove stanice u jetri i makrofagi u slezeni odgovorni su za eliminaciju cfDNA i nukleosoma, dok se u bubrezima eliminacija cfDNA događa kroz glomerule (94).

CfDNA koji se nalazi u krvnoj plazmi predstavlja mješavinu DNA iz različitih tkiva i organa (95). Mogućnost identifikacije tkiva iz kojeg određeni cfDNA potječe, je od velike biološke i dijagnostičke važnosti. CfDNA na sebi nosi genetičke i epigenetičke oznake (96) koje reflektiraju stanje genoma i epigenoma vrste stanice od koje cfDNA potječe pa je moguće odrediti iz kojeg je točno tkiva određena cfDNA. To je iznimno važno u kontekstu cfDNA kao tumorskog biomarkera.

1.8. Metilacija DNA

Mutacije su nasljedne promjene gena koje utječu na aktivnost i funkciju gena. To su promjene u DNA sekvenci koje uključuju različite delecije, insercije i translokacije. Međutim, osim mutacija, na aktivnost i funkciju gena utječu i epigenetičke promjene. Epigenetičke promjene (epimutacije) su također nasljedne promjene, no suprotno genetičkim (mutacijama), one ne uzrokuju promjenu u sekvenci DNA (97). Na njih utječu genetički i okolišni čimbenici (98). Iako gotovo sve stanice u organizmu sadrže istu genetičku informaciju, nisu svi geni jednako eksprimirani u svim stanicama. Upravo mehanizmi epigenetičke regulacije uzrokuju različitu ekspresiju gena u različitim stanicama i tkivima (99). Postoje tri mehanizma epigenetičke regulacije, a to su posttranslacijske modifikacije histona, RNA interferencija i metilacija DNA. Metilacija DNA je prvi i najbolje proučeni epigenetički mehanizam (100).

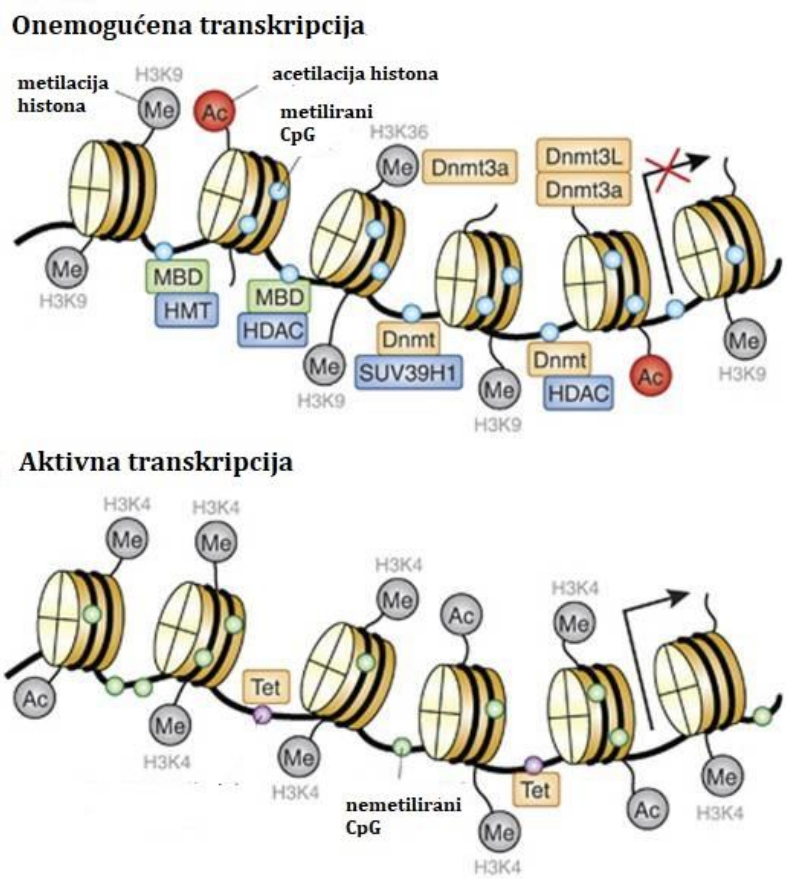
Metilaciju DNA kataliziraju enzimi DNA metiltransferaze (DNTMs) tako da prenose metilnu skupinu (CH_3) sa S-adenil metionina (SAM) na peti ugljikov atom citozinskog ostatka i stvaraju 5mC (101). Enzimi DNMT3a i DNMT3b mogu uspostaviti metilaciju *de novo* što znači da mogu uspostaviti potpuno novi obrazac metilacije DNA, neovisan o roditeljskom DNA metilacijskom obrascu (Slika 6.a). Enzim DNMT1, tijekom replikacije DNA, kopira roditeljski obrazac metilacije DNA iz lanca kalupa u novo-sintetizirani lanac (Slika 6.b) (102). Sva tri DNTM enzima uključeni su u razvoj embrija, sve dok se stanice u potpunosti ne diferenciraju, kada se njihova ekspresija reducira. Iz toga se zaključuje da je obrazac metilacije DNA u postmitotičkim stanicama stabilan. Iznimka su postmitotički neuroni kod odraslih sisavaca (103).



Slika 6. Mehanizam metilacije DNA. A. *De novo* metilacija DNA katalizirana enzimima DNMT3a i DNMT3b B. Metilacija DNA katalizirana DNMT1 prema obrascu metilacije DNA ishodišne molekula DNA. (Peuzeto i prilagođeno prema *Moore L.D i sur., NPP, 2013*. (97))

Do metilacije DNA većinom dolazi na citozinima iza kojih slijede gvanini i takve sekvence u DNA se nazivaju CpG dinukleotidi. Područja DNA koja imaju visoku gustoću CpG zovu se CpG otoci (104). Većina genskih promotora nalazi se u području CpG otoka koji su kod ljudi, tijekom evolucije, ostali visoko sačuvani, što upućuje na njihovu funkcionalnu važnost (105). Metilacija DNA CpG otoka regulira gensku ekpresiju tako što regulira strukturu nukleosoma i otvorenost veznog mjesta za transkripcijske faktore (106). DNMTs aktivno dodaju metilnu skupinu na CpG mjesta što pokreće kaskadu reorganizacije kromatina. Metilaciju DNA prepoznaju metil-vezajući proteini (engl. *methyl-biding proteins*, MBDs) koji zajedno s DNMTs regrutiraju enzime zaslužne za modifikaciju histonskih repova, čime struktura nukleosoma postaje još kompaktnija i genska ekspresija se još više suprimira. Na mjestima gdje dolazi do transkripcije DNA, dolazi do DNA

demetilacije tako da protein TET izbriše metilne skupine i struktura nukleosoma postaje rahlija te vezno mjesto za transkripcijski faktor postaje dostupno (107–109) (Slika 7).



Slika 7. Regulacija strukture nukleosoma posredovana DNA metilacijom. Dodavanjem metilne skupine struktura kromatina postaje kompaktna pa se smanjuje ekspresija gena. Demetilacijom DNA gena, struktura kromatina postaje rahlija pa je omogućeno vezanje transkripcijskog faktora i ekspresija gena. (Preuzeto i prilagođeno prema *Moore L.D i sur., NPP, 2013*. (97))

Tijekom gametogeneze i embrionalnog razvoja CpG otoci se različito metiliraju. Regulacija genske ekspresije DNA metilacijom CpG otoka, posebno je važna za uspostavljanje genomskog utiska (engl. *genomic imprinting*) (110). Tijekom gametogeneze dolazi do demetilacije svih gena, tj. brisanja genomskog utiska roditelja i postavlja se novi metilacijski utisk, ovisno o spolu roditelja od kojeg je gen naslijeđen. Kada oplodnjom nastane zigota, u njoj se mora naći metilacijski obrazac oba roditelja. Tada slijedi period brisanja DNA metilacije većine gena, osim onih koji su utisnuti i dolazi do diferencijalne ekspresije gena (111). Osim utisnutih gena, metilacija DNA CpG otoka regulira ekspresiju gena tijekom razvoja i diferencijacije te poremećajem DNA metilacije dolazi do nastanka bolesti kao što su tumori. Poremećena metilacija DNA definira se kao hipo- ili hipermetilacija. Za tumore je karakteristična globalna hipometilacija DNA praćena lokalnom hipermetilacijom, često detektiranom u promotorskoj regiji gena supresora tumora (112). Upravo zbog toga, metilacija DNA se intenzivno istražuje kao potencijalni tumorski biomarker, a kod određenih tumora već se i koristi u praksi (Tablica 1).

1.9. Biomarkeri

Biomarkeri mogu biti bilo koja biološka karakteristika koja može biti objektivno mjerena i vrednovana kao indikator fiziološkog biološkog procesa, patološkog procesa ili farmakološkog odgovora na terapiju (113). Biomarkeri mogu biti povezani s različitim stadijima bolesti, a dijelimo ih prema njihovoj povezanosti s uzrokom ili latencijom bolest (biomarker rizika), početkom bolesti (dijagnostički biomarker), kliničkim tijekom bolesti (prognostički biomarkeri) ili odgovorom na liječenje (prediktivni biomarkeri) (114–116). Također, biomarkeri mogu biti povezani i s određenim okolišem i tada su to biomarkeri izloženosti. Idealan biomarker mora davati precizne i klinički relevantne informacije te se mora moći precizno izmjeriti unutar populacije (115).

Metilacija DNA danas je vrlo istraživana u kontekstu tumorskih biomarkera, ponajviše zbog njezine visoke frekvencije i izrazite kemijske i biološke stabilnosti, mogućnosti detekcije u bilo kojem biološkom uzorku tkiva ili tjelesnih tekućina i otpornosti na promjene povezane s pohranom samih uzoraka. Potencijalni nedostaci metilacije DNA kao biomarkera su velika varijabilnost u

zdravoj populaciji i postojanje dovoljno velike razlike između zdrave populacije i pacijenata (117). Međutim, ovi nedostaci nisu specifični samo za metilaciju DNA, već za biomarkere općenito.

Za dijagnozu i probir većine tumora, biopsija tkiva je zlatni standard (118–120). Biopsija tkiva je najčešće rađena na primarnom tumoru i reflektira molekularno stanje tumora u vremenu uzorkovanja. Mnogi tumori su heterogeni te postoji mogućnost da se biopsijom primarnog tumora ne detektiraju mogući agresivni tumorski subklonovi što utječe na učinkovitost liječenja (121). Također, za pacijenta, biopsija tumora predstavlja bolan i donekle rizičan postupak.

U slučaju TGCT-a, svaka promjena na testisu tretira se kao tumor pa se odmah obavlja hitna orhidektomija (118–120). To je invazivan postupak sa značajnim rizikom od komplikacija poslije zahvata i ima veliki utjecaj na kvalitetu života pacijenata (122).

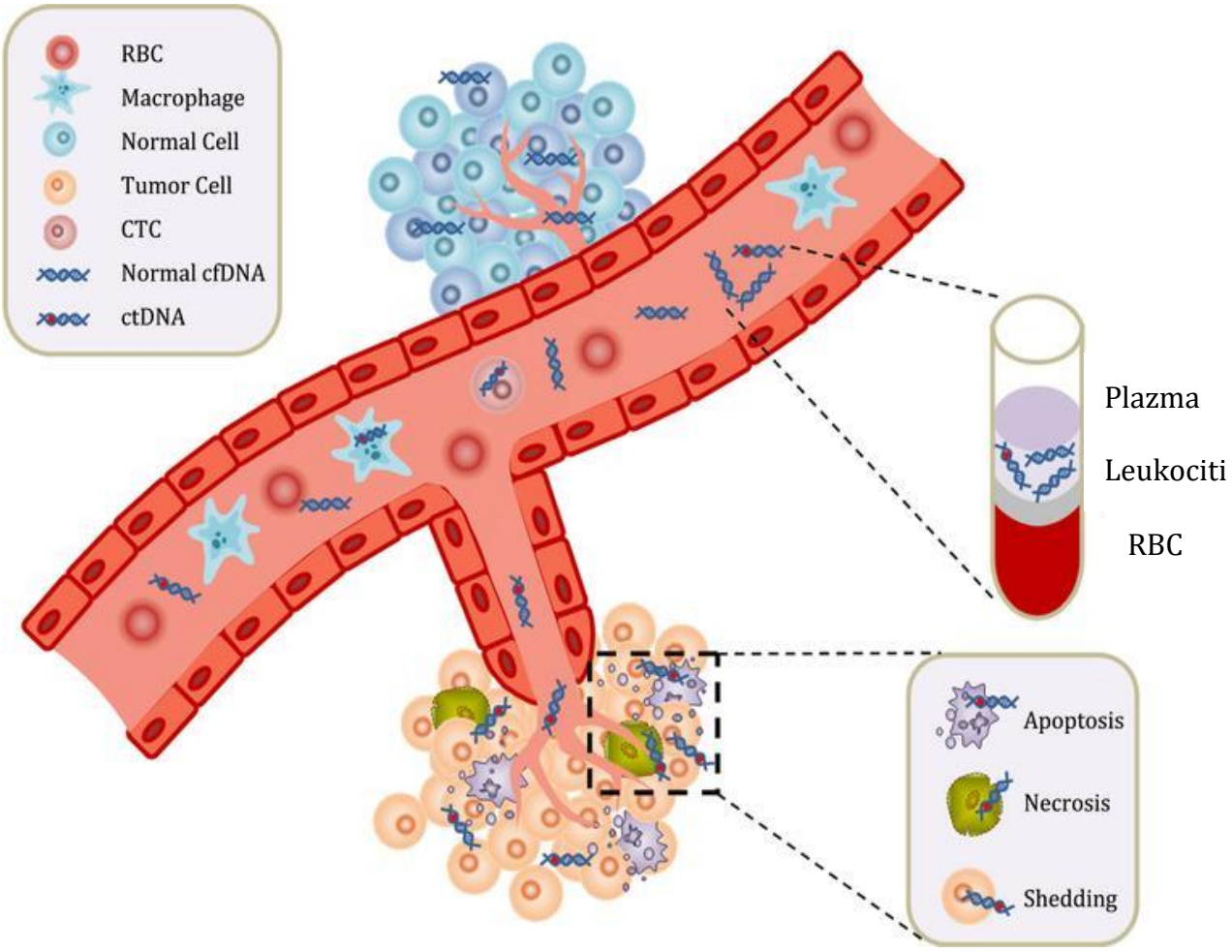
Tekućinske biopsije predstavljaju neinvazivan i manje rizičan postupak pri kojem se uzorkuju tjelesne tekućine iz kojih bi se pomoću tumorskih biomarkera mogla dijagnosticirati i pratiti bolest (123). Zbog svoje neinvazivnosti i niskog rizika za pacijente, postupak uzimanja i analiziranja uzorka mogao bi se ponoviti kada god bi to bilo potrebno i na taj bi se način mogle pratiti dinamičke promjene tumora koje nastaju tijekom liječenja (124). Sve tjelesne tekućine mogu biti izvor tumorskih biomarkera, a metilacija DNA se već koristi kao tumorski biomarker za određene tumore (125) (Tablica 1).

Tablica 1. Geni, čija se metilacija DNA koristi u predikciji ili dijagnostici određenih tumora.

Gen	Vrsta biomarkera	Vrsta tumora	referenca
VIM	dijagnostički	Kolorektalni	(126)
SEPT9	dijagnostički	Kolorektalni	(127)
SHOX2	dijagnostički	Kolorektalni	(128)
GSTP1/APC/RASSF1A	dijagnostički	Prostata	(129,130)
MGMT	prediktivni	Glioblastom	(131)

Tekućinske biopsije uključuju cirkulirajuće tumorske stanice, cfDNA (uz frakciju tumorske DNA), cirkulirajuće egzosome ili mikroRNA(83). Krv je najistraživanija tjelesna tekućina budući da ispire većinu, ako ne i sve zloćudne bolesti i detektira njihovu prisutnost u tijelu pacijenta (132)

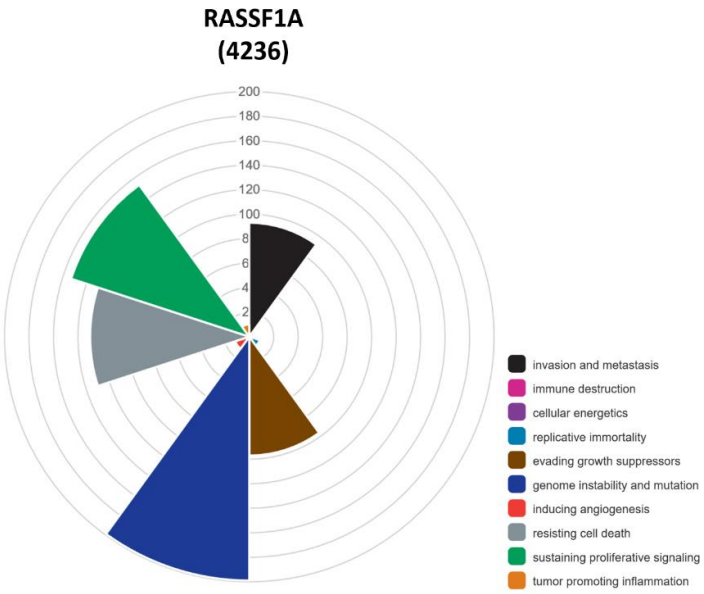
(Slika 8). Krv se može koristiti za otkrivanje širokog raspona bioloških i biokemijskih promjena prisutnih u primarnom tumoru te za otkrivanje molekularnog profila mogućih metastaza prema čemu se onda može propisati odgovarajuća terapija (133). Poznato je da apoptotičke i nekrotičke tumorske stanice otpuštaju cfDNA u krv zbog čega su koncentracije cfDNA povišene kod onkoloških pacijenata, a pogotovo kod onih u odmaklom stadiju bolesti (Slika 8). Kako su epigenetičke oznake na cfDNA odraz epigenetičkih oznaka u tumorskim stanicama, metilacija DNA detektirana na cfDNA predstavlja potencijalni tumorski biomarker (134). Za razliku od krvi, ejakulat je prisutniji u istraživanjima nepolodnosti (135). Međutim, baš zbog toga što se u ejakulat otpuštaju samo cfDNA iz testisa i prostate te nema „šuma“ cfDNA iz ostalih tkiva, ejakulat bi mogao predstavljati jako dobar izvor biomarkera za tumore prostate i testisa.



Slika 8. Krv kao tekućinska biopsija. Cirkulirajuće tumorske stanice (CTS), cirkulirajući DNA bez stanica (ccfDNA) (uključujući i cirkulirajući tumorski DNA (ctDNA)), cirkulirajući RNA bez stanica (ccfRNA) i egzosomi oslobađaju se iz tumorskih stanica u krvotok. Stoga se krv može prikupiti i analizirati u kontekstu tekućinske biopsije. (Preuzeto i prilagođeno prema *Green E.A. i sur., EAU, 2021*. (136))

1.10. *RASSF1A*

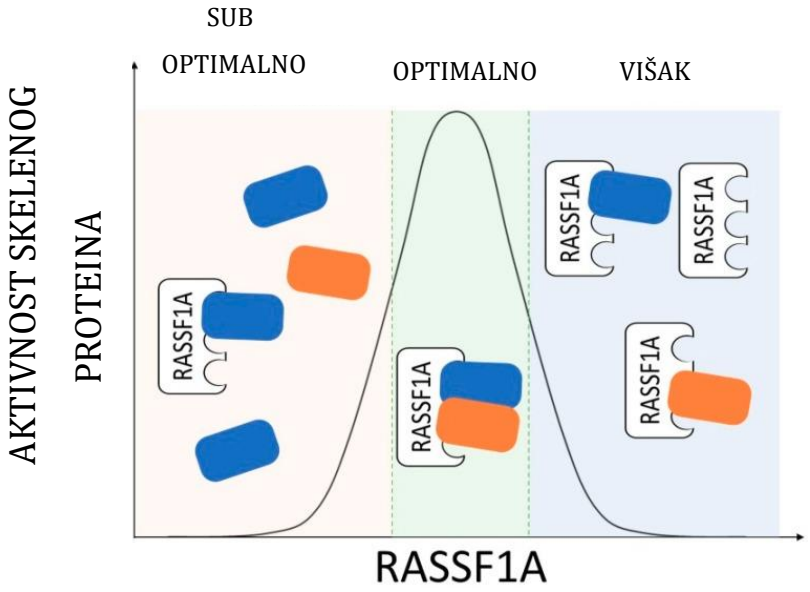
RASSF1A gen (engl. *Ras Association Domain-Containing Protein* 1) je gen supresor tumora koji pripada *RASSF* obitelji s C-terminalnim krajem (137). Postoji 8 izoformi tog proteina koje nastaju kao posljedica alternativnog izrezivanja (engl. *alternative splicing*). Od tih 8 izoformi, RASSF1A i RASSF1C su najviše eksprimirane izoforme. Ove dvije izoforme su sveprisutne u stanicama gdje lokaliziraju mikrotubule i reguliraju rast stanica (138). Mitogeni podražaj aktivira *RASSF1A* tako da djeluje na *KRAS* koji se nalazi nizvodno u signalnom putu i posreduje u antiproliferacijskom signalu ovog proto-onkogena. RASSF1A odgovara na mitogeni podražaj regulacijom progresije staničnog ciklusa, apoptoze i stabilnosti mikrotubula (139). RASSF1C je uključen u odgovor na oštećenje DNA. Inače, RASSF1C je usidren na DAXX (engl. *death domain-associated protein*) i nalazi se u jezgri. Oštećenje DNA dovodi do degradacije DAXX i RASSF1C se otpušta u citpoplazmu gdje aktivira JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinesis*) signalni put (140). Međutim u procesu tumorogeneze, *RASSF1C* se ponaša poput onkogena dok *RASSF1A* ima ulogu gena supresora tumora (Slika 9).



Slika 9. Distribucija karakteristika tumora u kojima sudjeluje *RASSF1A*. U 4236 znanstvena članka uočeno je da ekspresija *RASSF1A* u tumoru pridonosi nestabilnosti genoma i mutacijama, održava proliferaciju i omogućava stanicama da odolijevaju staničnoj smrti. (Preuzeto i prilagođeno prema *Raos i sur., BJBMS, 2020.* (141)).

Regulacija RASSF1A proteina prilično je složena jer je to skeleni protein (engl. *scaffold protein*). Skeleni proteini nemaju enzimatsku funkciju nego svoj biološki učinak ostvaruju tako da dovode svoje efektorske proteine u asocijaciju, tj. stvaraju s njima proteinske komplekse (142,143). Stvaranje proteinskih kompleksa može ubrzati biokemijske reakcije ili dovesti do kompartmentalizacije signala. U fiziološkim uvjetima skeleni proteini imaju optimalnu koncentraciju ekspresije pri kojoj se stehiometrija samog skelenog proteina i njegovih efektorskih proteina podudara i dolazi do nastanka proteinskog kompleksa pri čemu se optimizira brzina biokemijske reakcije (Slika 10). Ekspresija skelenog proteina ispod ili iznad optimalne koncentracije dovodi do inhibicije ili suboptimalne regulacije molekularnih reakcija posredovanih

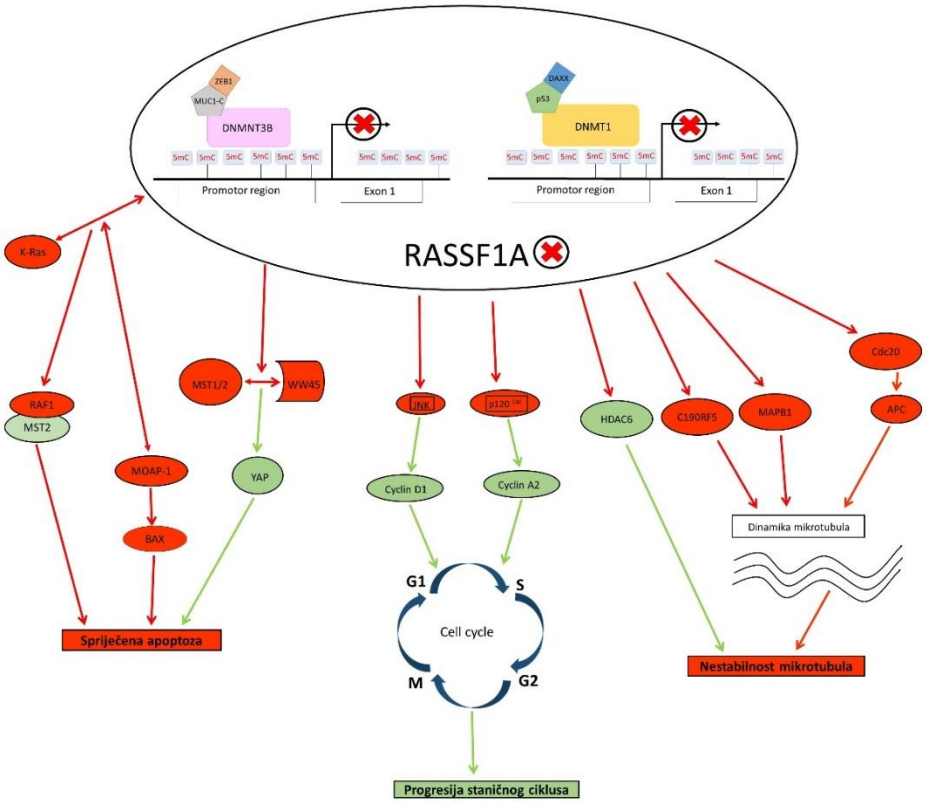
vezanim efektorima (144). Poremećena regulacija RASSF1A proteina dovodi do razvoja različitih patoloških stanja uključujući tumor i kardiovaskularne bolesti (145).



Slika 10. Signalizacija RASSF1A ovisi o razini njegove ekspresije i stehiometriji njegovih efektorskih proteina. Pri optimalnoj koncentraciji RASSF1A dolazi do nastanka proteinskih kompleksa i signal je visok dok pri sniženoj RASSF1A ekspresiji nema formiranja proteinskih kompleksa i signal je nizak. (Preuzeto i prilagođeno prema *García-Gutiérrez i sur., Cancers (Basel) 2020.* (146))

RASSF1A gen se nalazi na 3p21.3 kromosomu, unutar regije koja je podložna genetičkim i epigenetičkim promjenama koje su detektirane u različitim tumorima. Gubitak heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity, LOH*) karakterističan je za tu regiju (146). Međutim, u tumorima *RASSF1A* je češće inaktiviran poremećenom metilacijom DNA promotorske regije. Hipermetilirani *RASSF1A* detektiran je u mnogim tumorima kao što su tumor dojke, pluća, prostate, gastrointestinalnom tumoru i u tumorima testisa (141). *RASSF1A* lokus sadržava dva CpG otoka, A i C. CpG otok A nalazi se u regulatornoj regiji *RASSF1A* i metiliran je u zdravom tkivu te ne utječe na ekspresiju *RASSF1A* gena (138). Međutim, njegova hipermetilacija povezana je s

gubitkom ekspresije *RASSF1A*. DNMTs posreduju metilaciju CpG otoka i u tumorskim stanicama, kada je nihova regulacija poremećena, dolazi do epigenetičkog stišavanja *RASSF1A*. MUC1-C ili protein p53 vežu se na promotor *RASSF1A* i aktiviranju svoje korepresore ZEB1 i DAXX. MUC1-C-ZEB kompleks regrutira DNMT3b, dok p53-DAXX kompleks regrutira DNMT1 što uzrokuje metilaciju CpG otoka *RASSF1A* i gubitak njegove ekspresije. U stanicama tumora, gubitak ekspresije *RASSF1A* zbog ove kaskade, dovodi do vezanja RASSF1C za efektore RASSF1A, što zauzvrat pogoduje tumorigenezi (147,148). Epigenetička inaktivacija *RASSF1A* uzrokuje poremećaj u različitim signalnim putovima koji su prikazani na slici 11.



Slika 11. Utjecaj epigenetičkog stišavanja *RASSF1A* na stanične signalne putove. Crvene strelice predstavljaju poremećene ili deaktivirane, a zelene predstavljaju aktivirane stanične signalne putove. Kada je *RASSF1A* normalno eksprimiran, uzrokuje represiju ciklina A2 i D1 što rezultira zaustavljanjem staničnog ciklusa. *RASSF1A* također sudjeluje u regulaciji apoptoze. Interakcija RASSF1A s K-Ras-om aktivira apoptotski put MST2-LATS1, tj. modulira RAF-1 aktivnost koji je u kompeticiji s MST2 za RAF-1 vezajuće mjesto. Također, interakcija RASSF1A s K-Ras-om pojačava interakciju RASSF1A i MOAP-1, promovirajući sposobnost RASSF1A da inducira translokaciju BAX u mitohondrije što dovodi do stanične smrti. Preko adapterskog proteina WW45, RASSF1A se veže za MST1/2 uzrokujući fosforilaciju što dovodi do fosforilacije Yap-a i njegove inhibicije. Osim toga, RASSF1A igra važnu ulogu u stabilnosti mikrotubula tako što inhibira HDAC6 (histonsku deacetilazu 6) što rezultira povećanom acetilacijom mikrotubula i povećanjem njihove stabilnosti. Također, RASSF1A se veže i proteine povezane za mikrotubul (engl. *microtubule-associated proteins*, MAPs) i na taj način regulira stabilnost mikrotubula. Epigenetički inaktiviran RASSF1A uzrokuje nestabilnost mikrotubula, zaustavljanje apoptoze i progresiju staničnog ciklusa što ide u prilog tumorogenezi. (Preuzeto i prilagođeno prema *Raos i sur., BJBMS, 2020.* (141)).

2. HIPOTEZA

CfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz krvi i ejakulata, hipermetiliran je kod bolesnika sa seminomom testisa u odnosu na zdrave kontrole.

3. SVRHA I CILJEVI RADA

Poremećena metilacija *RASSF1A* detektirana je u mnogim tumorskim tkivima, a između ostalog i u tkivu SE. Zbog neinvazivnosti i manjeg rizika za pacijente koji predstavljaju tekućinske biopsije, svrha rada je istražiti metilaciju *RASSF1A* u cfDNA iz krvi i ejakulata. Time bismo utvrdili je li metilacija DNA *RASSF1A* detektirana u tkivu SE odražena u cfDNA iz krvi i ejakulata te ima li potencijal kao biomarker iz tekućinskih biopsija za SE.

OPĆI CILJ:

Utvrditi obrazac i stupanj metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u krvi i ejakulatu bolesnika sa seminomom testisa te njezin potencijal kao biomarkera seminoma testisa.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Kvantificirati i usporediti ekspresiju gena *RASSF1A* na proteinskoj razini u tumorskom tkivu bolesnika i okolnom zdravom tkivu.
2. Odrediti stupanj i obrazac metilacije DNA promotorske regije gena *RASSF1A* u gDNA tumora i zdravog okolnog tkiva te cfDNA u preoperativnim i postoperativnim uzorcima pacijenata sa seminomom kao i zdravih dobrovoljaca.
3. Odrediti korelaciju između metilacije gDNA promotorske regije *RASSF1A* i genske ekspresije u tkivu tumora te okolnom netumorskom tkivu.
4. Korelirati stupanj i obrazac metilacije cfDNA iz krvne plazme i sjemene plazme te tumorskog tkiva pacijenata sa seminomom testisa.
5. Zaključiti o potencijalu upotrebe stupnja i obrasca metiliranosti cfDNA gena *RASSF1A* iz krvne odnosno sjemene plazme kao biomarkera u bolesnika sa seminomom testisa.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U istraživanje je u periodu od 2018. do 2021. godine, uključeno 29 ispitanika koji su zbog sumnje na TT bili podvrgnuti orhidektomiji u Klinikama za urologiju KBC-a Zagreb i KBC-a Sestre milosrdnice, a kojima je nakon histopatološke analize bio utvrđen SE testisa. Također, u istraživanje su uključena i 24 zdrava dobrovoljca koji su regrutirani iz opće zdrave populacije, većinom studenske. Svim ispitanicima je prije prikupljanja uzoraka objašnjena svrha istraživačkog rada te su prije uključivanja u studiju, svi potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Svi su obaviješteni o tajnosti njihovih podataka, namjenskom korištenju njihova genetičkog i biološkog materijala te o mogućnosti svojevoljnog izlaska iz istraživanja u bilo kojem trenutku. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „ Epigenetički biomarkeri u krvi i ejakulatu pacijenata sa seminomom testisa“ (epiSem, IP-06-2016). Etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Klasa: 380-59-10106-17-100/187, Klasa: 641-01/17-02/01), KBC-a Zagreb (Klasa: 8.1-17/107-2, Broj: 02/21 AG) i KBC-a Sestre milosrdnice (Broj:EP-7259/17-9) izdala su dopusnicu za provođenje projekta.

Svim pacijentima je prije orhidektomije uzet komplet uzoraka krvi i ejakulata koji su označeni kao predoperativni uzorci krvi i ejakulata. Uključni kriterij bila je sumnja na TT prema kliničkom protokolu za procjenu bolesnika na potencijalne TT koji uključuje nalaz čvrste opipljive mase unutar skrotuma, nalaz ultrazvuka o intratestikularnoj masi s ili bez povišenih serumskih biljega (AFP, HCG, LDH). Isključni kriterij je bila svaka histopatološka dijagnoza koja nije uključivala čistu formu SE testisa. Pacijentima sa SE testisa prije uzimanja bilo kakve terapije, uzeti su postoperativni uzorci krvi i ejakulata, osam dana do tri mjeseca nakon operacije prilikom kontrolnog pregleda u Klinici za urologiju KBC-a Zagreb i KBC-a Sestre milosrdnice.

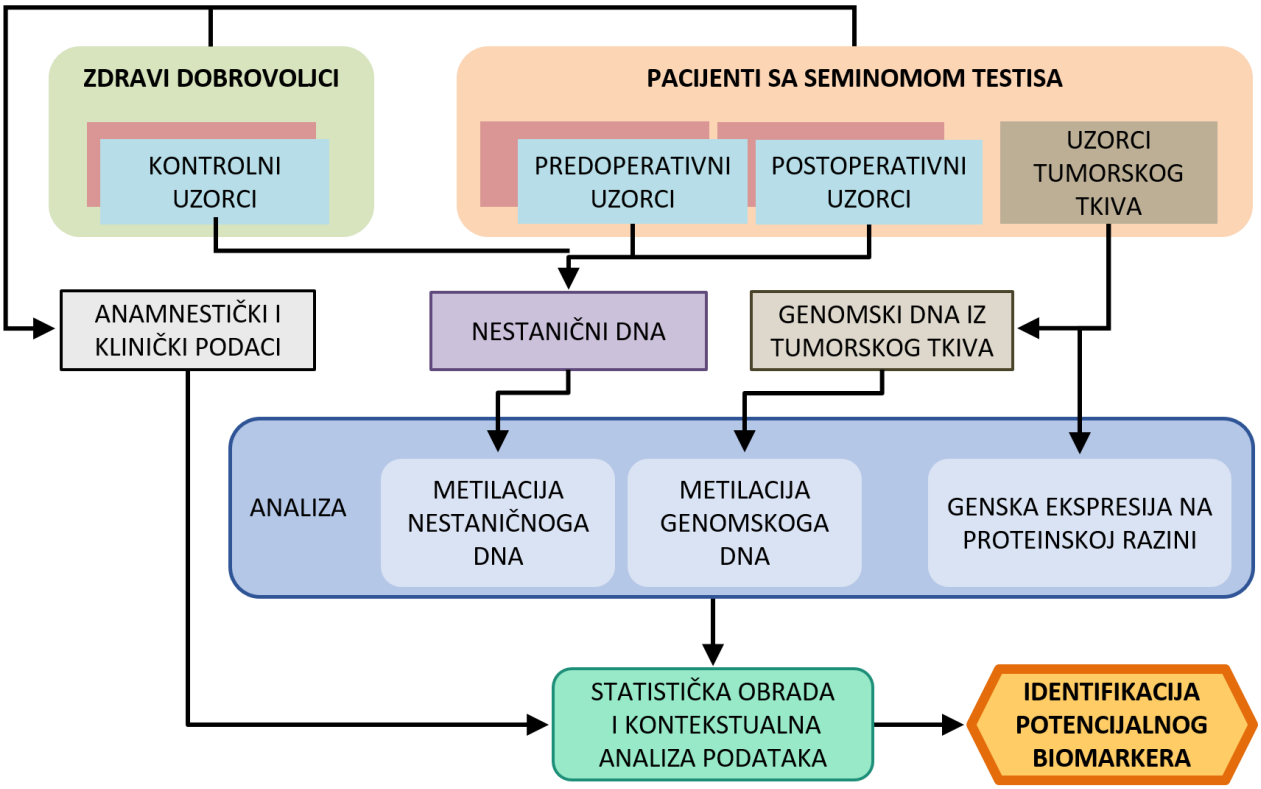
Za potrebe istraživanja, 24 zdravih dobrovoljaca sudjelovalo je u okviru kontrolne skupine za analizu metilacije cfDNA. Svi su uzorci upareni, odnosno uzeti su uzorci krvi i uzorci ejakulata istog dobrovoljca.

Kako bi se osiguralo da u svakoj skupini bude najmanje 24 uzorka usprkos očekivanom ispadanju iz studije, u istraživanje je uključeno 29 pacijenata. Ukupno je prikupljeno 96 bioloških uzoraka. Od toga 48 predoperativne i postoperativne krvi 29 pacijenata, 48 predoperativnog i postoperativnog ejakulata 24 pacijenata. Ukupno je u istraživanju prikupljeno 20 kompletiranih uzoraka krvi i 24 kompletirana uzorka ejakulata (kompletirani uzorak predstavlja biološke uzorke pacijenta od kojeg su sustavno prikupljeni i predoperativni i postoperativni uzorci određenog tekućeg tkiva). Od navedenih prikupljenih kompletiranih uzoraka, 16 ih je upareno (upareni uzorak predstavlja biološke uzorke istog pacijenta od kojeg su sustavno prikupljeni i predoperativni i postoperativni uzorci i krvi i ejakulata) (Tablica 2).

Tablica 2. Prikaz uključenih pacijenata po kategoriji prikupljenih uzoraka.

Kategorija uzoraka	**Broj pacijenata**
Upareni kompletirani uzorak (od istog pacijenta prikupljeni su preoperativni i postoperativni uzorci i krvi i ejakulata)	16
Kompletiran (neuparen) uzorak krvi	9
Kompletiran (neuparen) uzorak ejakulata	0
Ukupno kompletirani uzorci krvi (od istog pacijenta prikupljeni su preoperativni i postoperativni uzorci i krvi)	20
Ukupno kompletirani uzorci ejakulata (od istog pacijenta prikupljeni su preoperativni i postoperativni uzorci i ejakulata)	24

Klinički podaci koji su prikupljeni su podaci o dobi pacijenata te veličini SE i TNM klasifikaciji SE. Prikaz plana istraživanja nalazi se na slici 12.



Slika 12. Plan istraživanja. Iz svih uzoraka tekućinskih biopsija izoliran je cfDNA, a iz uzoraka SE tkiva izoliran je genomski DNA. Metilacija DNA gena *RASSF1A* analizirana je na cfDNA i gDNA, dok je samo na gDNA analizirana ekspresija *RASSF1A* gena na proteinskoj razini. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni i zaključilo se o potencijalu *RASSF1A* gena u kontekstu biomarkera za seminom.

4.2.Metode

4.2.1. Prikupljanje i obrada uzoraka

Periferna venska krv prikupljena je u dvije 3 mL vakuum epruvete koje su sadržavale antikoagulans K_2EDTA (*Vacuette*, Greiner Bio-One GmbH/ Becton Dickinson, NJ, USA). Uzimanje krvi provelo je stručno osoblje poštujući nacionalne preporuke za uzorkovanje venske krvi. Odmah nakon vađenja, krv je obrađena dvostrukim centrifugiranjem do krvne plazme (na 1400 x *g* pa 4500 x *g*, oba koraka 10 minuta na sobnoj temperaturi).

Uzorci ejakulata prikupljeni su 3-5 dana nakon seksualne apstinencije, masturbacijom u sterilnu čašicu. Uzorci ejakulata obrađeni su dvostrukim centrifugiranjem do sjemene plazme (na 400 x *g* pa 12000 x *g*, oba koraka 10 minuta na sobnoj temperaturi). Do daljnjih analiza, svi uzorci pohranjeni su na -80 °C.

4.2.2. Prikupljanje i obrada seminomskog tkiva

Tkivo SE testisa, uzeto tijekom orhidektomije obrađeno je prema standardnoj histološkoj metodi. Ta metoda uključuje 24-satnu fiksaciju u 10 % puferiranom formalinu nakon čega slijedi dehidracija tkiva u etilnom alkoholu rastućih koncentracija (70 %, 80 %, 96 % i 100 %) po 1 sat u svakoj koncentraciji. Zatim je tkivo ostavljeno u ksilolu na 30 minuta po dva puta, te potom uklopljeno u tekući parafin na +60 °C. Nakon hlađenja na +4 °C dobiveni su parafinski blokovi SE testisa pacijenata priređeni za potrebe daljnjih analiza. Ti blokovi narezani su na kliznom mikrotomu te su dobiveni parafinski rezovi tkiva debljine 3 μm. Rezovi su deparafinizirani u ksilolu i dehidrirani u nizu etilnog alkohola padajućih koncentracija (100 %, 96 %, 80 % i 70 %) te su obojani hemalaun-eozin (HE) imunohistokemijskom metodom. Patolog je analizirao HE preparate pod svjetlosnim mikroskopom na povećanju x400, odredio je morfološku građu tkiva i na histološkim preparatimaa je označio SE tkivo ogradivši ga od okolnog tkiva. Također, patolog je na isti način označio okolno zdravo tkivo koje je sadržavalo sjemene kanaliće s održanom spermatogenezom.

Prema označenim HE preparatima pripadajući parafinski blokovi pacijenata sa SE testisa rezani su na debljinu 3 μm te su podvrgnuti imunohistokemijskoj analizi. Učinjeno je i 6 rezova debljine 10 μm iz kojih je izoliran genomski (gDNA) iz tkiva SE i gDNA iz okolnog zdravog tkiva.

4.2.3. Imunohistokemijsko bojenje

Predmetna stakla s parafinskim rezovima SE i okolnim tkivom (OT), debljine 3 μm inkubirana su u termostatu na 55 °C, 60 minuta. Uslijedila je deparafinizacija prema sljedećim uvjetima: 10 minuta u ksilolu I, 10 minuta u ksilolu II, 5 minuta u 100 % etilnom alkoholu I, 5 minuta u 100 % etilnom alkoholu II, 5 minuta u 90 % etilnom alkoholu I, 5 minuta u 90 % etilnom alkoholu II, 5

minuta u 70 % etilnom alkoholu I, 5 minuta u destiliranoj vodi. Otvaranje antigena (engl. *antigen retrieval*) postignuto je 30-minutnom inkubacijom na 99 °C u Tris-EDTA puferu (pH 9, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.05 % Tween 20). Nakon inkubacije uslijedilo je hlađenje u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi te ispiranje u Tris puferiranoj fiziološkoj otopini (TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) u trajanju od 5 minuta. Stakla su izvađena iz pufera. Tkiva su zaokružena parafinskim markerom kako bi se otopine koje će se stavljati na stakla zadržale na njima. Na stakla je prvo nanesen 5 % goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA, Sigma-Aldrich, SAD) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Nakon inkubacije od 20 minuta na sobnoj temperaturi, BSA je uklonjen i naneseno je primarno protutijelo (anti-RASSF1A, HPA040735, Atlas Antibody) koje je razrijeđeno u otopini TBS-a (0.1 % Tween 20, 1 % BSA) u odnosu 1:225. Stakla s nanesenim primarnim protutijelom stavljena su na +4 °C preko noći. Sljedeći dan, uzorci su isprani u TBS-u (5x po 5 minuta na miješalici). Nakon toga, na rezove je nanesena vodena otopina s 3 % H_2O_2 te su rezovi ostavljeni u mraku na 20 minuta na sobnoj temperaturi radi inaktivacije endogenih peroksidaza. Zatim su stakla 3 puta ispirana u TBS-u nakon čega je na njih nanesena otopina sekundarnog protutijela (*Dako REAL EnVision Detection System*, K5007, Agilent Technologies, Njemačka) i TBS-a u omjeru 1:1. Stakla su bila inkubirana sa sekundarnim protutijelom 60 minuta na 37 °C, nakon čega je opet usljedilo ispranje u TBS-u, 3 puta po 5 minuta. Na stakla je nanesen 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid (*DAB, Dako REAL EnVision Detection System*, K5007, Agilent Technologies, Njemačka) u trajanju od 6 minuta, radi vizualizacije reakcije antigen-protutijelo. Suvišak DAB-a uklonjen je 5-minutnim ispiranjem destiliranom vodom. Sa svrhom dobivanja kontrastnog bojanja, stakla su obojana hemalaunom (BioGnost, Hrvatska) u trajanju od 10 sekundi pa isprana destiliranom vodom i vodom iz slavine pod mlazom u trajanju od 8 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je uslijedilo završno ispiranje u destiliranoj vodi od 5 minuta, nakon čega je slijedilo dehidriranje u sljedećem nizu otopina: 70 % etilni alkohol, 96 % etilni alkohol II, 96 % etilni alkohol I, 100 % etilni alkohol II, 100 % etilni alkohol I, ksilol II, ksilol III. Naposljetku, tkiva su zaštićena smolom (*BioMount DPX Low*, BioGnost, Hrvatska) i pokrovnim staklom. Prilikom svake serije imunohistokemijskog bojenja korištene su odgovarajuće pozitivne (debelo crijevo) i negativne kontrole (karcinom bubrega).

4.2.4. Morfološka analiza imunohistokemijskog bojenja

Morfološka analiza imunohistokemijskih preparata provedena je uz pomoć svjetlosnog mikroskopa marke Olympus, model Bx51 spojenog s digitalnom kamerom, od strane dva iskusna, nezavisna patologa. Citoplazmatsko, smeđe obojenje smatralo se pozitivnom reakcijom. Reakcija je analizirana pod vidnim povećanjem mikroskopa x400. Postotak imunoreaktivnih stanica određen je: 0 (nema signala), 1 (1-10 % pozitivnih stanica), 2 (>10-25 % pozitivnih stanica), 3 (>25-50 % pozitivnih stanica), 4 (>50-75 % pozitivnih) i 5 (> 75 % pozitivnih stanica). Intenzitet reakcije je opisan kao 0 (nema reakcije), 1 (blaga reakcija), 2 (umjerena reakcija) ili 3 (snažna reakcija). Ekspresija *RASSF1A* na razini proteina izražena je semikvantitativno kao imunoreaktivni indeks (*engl*. *immunoreactivity score*, IRS) koji je jednak umnošku vrijednosti imunoreaktivnih stanica i intenziteta reakcije, čime je dobivena skala od 0 do 15. Opisanom metodom, analizirana je ekspresija *RASSF1A* na razini proteina u okolnom tkivu testisa s očuvanom spermatogenezom (ZDR), GCNIS i SE.

4.2.5. Izolacija i kvantifikacija cfDNA iz krvne i sjemene plazme

Iz krvne i sjemene plazme dobivene dvostrukim centrifugiranjem izoliran je cfDNA uz pomoć *NucleoSnap cfDNA* kit (Macherey-Nagel, Njemačka) i *QIAvac 24 Plus* vakuum stanice (Qiagen, Njemačka).

Početni volumen krvne plazme bio je 6 mL. Svaki uzorak krvne plazme prebačen je u plastične tube od 50mL (Eppendorf, Njemačka) s pripadajućom oznakom. Izolacija cfDNA iz krvne plazme provedena je prema uputama proizvođača s iznimkom da je u uzorak dodana veća količina proteinaze K za digestiju (stavljeno je 20 µL umjesto 15 µL proteinaze K/mL plazme). Nakon proteinaze K, dodan je VL pufer u volumenu od 6mL. Nakon temeljitog protresanja uzorka i digestije od 15 min proteinazom K, u uzorak je dodano 6mL 100 % etilnog alkohola. Nakon toga usisna stanica za izolaciju spojena je na vakuum pumpu. U utore usisne stanice postavljene su *VacValves* (Qiagen, Njemačka) koje služe za regulaciju protoka uzorka kroz kolone. Na *VacValves* postavljene su kolone za izolaciju cfDNA. Prije dodavanja uzoraka na odgovarajuće kolone, kroz kolone je pušten *column conditioner*, kako bi se omogućilo što bolje vezanje cfDNA za kolone.

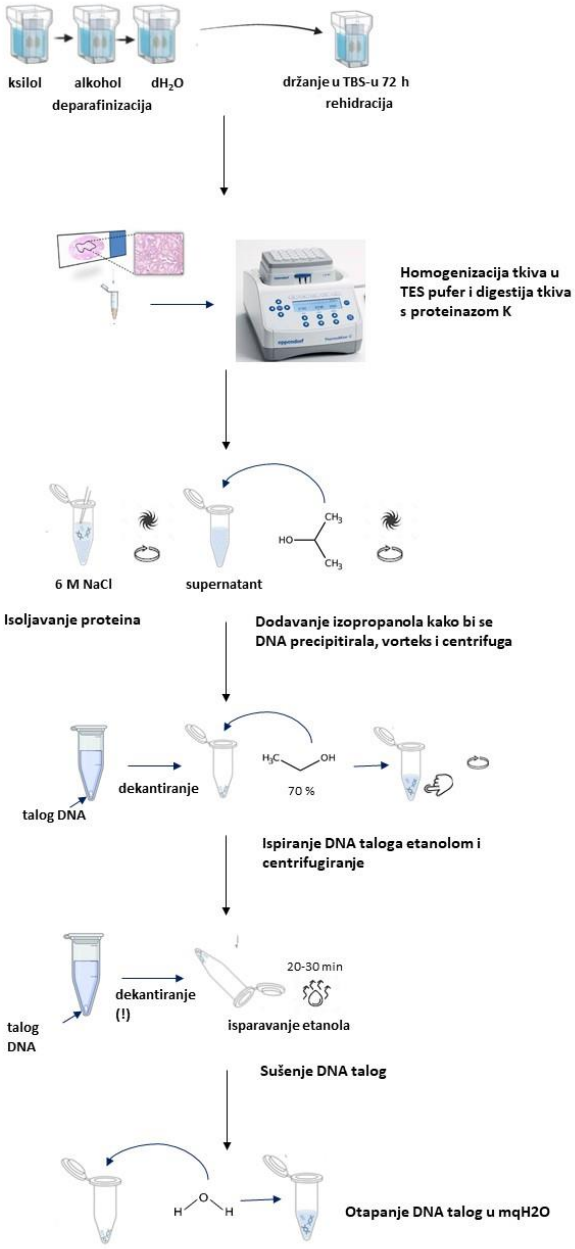
Svaki uzorak dodan je na odgovarajuće označenu kolonu te je propušten pod vlakom pri čemu je na kolonama ostao vezan cfDNA. Na kolone su se zatim dodali VW1 i WB puferi kako bi se kolona isprala te kako bi na njoj ostao vezan samo cfDNA. Kolone su skinute s *VacValves* i prebačene u odgovarajuće označene kolekcijske tubice. Tubice su centrifugirane na 20 000 x *g* na 3 minute kako bi se kolone osušile. Kolone su potom postavljene u označene plastične tubice od 1,5 mL (Ependorf, Njemačka). Korak elucije proveden je s 50 µL elucijskog pufera i centrifugiranjem na 20 000 x *g* na 1 minutu. Korak elucije ponovio se dva puta tako da je krajnji volumen eluata bio 100 µL. Izolirani cfDNA pohranjen je na -80 °C do daljnjih analiza.

Početni volumen sjemene plazme bio je između 0,5 mL i 3 mL, prosjek je bio 1,5 mL. Prije izolacije, sjemena plazma bila je dodatno centrifugirana, 10 minuta 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. Izolacija cfDNA provedena je po istim koracima kao prethodno opisana izolacija cfDNA iz krvne plazme.

Kvantifikacija cfDNA iz krvi i ejakulata napravljena je uz pomoć *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA detection* kit (Molecular Probes, Eugene OR). Reakcijska smjesa sadržavala je 1x TE pufer (199 µL) i *PicoGreen* boje (1 µL) koja se interkalira u dvostruku zavojnicu DNA. Za potrebe kvantifikacije, metodom razrjeđenja napravljeno je 5 DNA standarda poznatih koncentracija (1 pg, 10 pg, 100 pg, 1000 pg i 10000 pg). U svaku jažicu ploče s 96 jažica, ispipetirano je 200 µL reakcijske smjese nakon čega je u svaku jažicu dodano 3 µL pripadajućeg uzorka. Svaki uzorak bio je izmjeren u triplikatu. Intenzitet florescencije izmjeren je na spektrofotometru (Tecan, Austrija). Prema pravcu koji je dobiven u kordinatnom sustavu gdje je Y = absorbancije standarda i X= koncentracije standarda, određena je jednadžba pravca iz koje su onda izračunate koncentracije cfDNA uzoraka. Kako su sva mjerenja izvedena u triplikatu, konačna koncentracija jednog uzorka bila je izračunata kao srednja vrijednost triju mjerenja.

4.2.6. Izolacija gDNA iz parafinskih blokova tkiva

gDNA potreban za daljnje analize izolirana je iz parafinskih rezova SE tkiva koji su priređeni na način koji je opisan u poglavlju 4.2.2. Za izolaciju gDNA uzeto je 5 rezova debljine 10 μm. Iz 29 prikupljena bloka pacijenata izoliran je gDNA iz odvojeno SE testisa i okolnog tkiva. Za izolaciju je korišten kućni protokol, razvijen u Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) i kasnije objavljen (149). Ovaj protokol pokazao je iznimne značajke s obzirom na kvalitetu i prinos DNA u usporedbi s komercijalno dostupnim kitovima za izolaciju gDNA. Ukratko, parafinski rezovi provedeni su kroz deparafinizacijski niz koji se sastoji od ksilola i padajućeg koncentracijskog niza etilnog alkohola (100 %, 96 % i 70 %). Rezovi su 10 minuta bili u ksilolu i 5 minuta u svim otopinama etilnog alkohola. Nakon hidracije od 5 minuta u destiliranoj vodi, parafinski rezovi su stavljeni u Tris puferiranu fiziološku otopinu (engl. *tris-buffered saline*, TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) u kojoj su stajali 72 sata kako bi došlo do rehidracije tkiva. Uz pomoć HE rezova na kojima su patolozi označili SE i okolno zdravo tkivo, sterilnim nožićem je sastrugano SE tkivo i zasebno okolno zdravo tkivo te su odvojeno stavljeni u 1,5 mL plastičnu tubicu u kojoj je prije bilo dodano 500 μL TES pufera (50 mM Tris-HCl pH8; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl). Zatim je dodano 100 μL proteinaze K te su uzorci ostavljeni preko noći na termobloku na +56 °C. Sljedeći dan dodano je 200 μL natrijevog klorida (6 M NaCl). Uzorci su protreseni 5 minuta i centrifugirani na 13 000 *rpm* (engl. *revolutions per minute*) tijekom 10 minuta. Nastali supernanant (700 μL), prebačen je u čistu, označenu 1,5 mL tubicu u koju je dodano 500 μL izopropanola. Uzorci su ponovo protreseni (2 minute) i centrifugirani (15 minuta, 13 000 *rpm*) te je dobiven talog gDNA. Supernatant je pažljivo odbačen, a talog gDNA je ispran s 500 μL 70 % etilnog alkohola. Uzorci su ponovo centrifugirani na 13 000 *rpm* tijekom 15 minuta, nakon čega je 70 % etilni alkohol pažljivo odbačen kako se ne bi izgubio talog. 1,5 mL tubica s talogom gDNA stavljena je otvorena na +56 °C u termoblok na 20-30 minuta, kako bi etilni alkohol ispario u potpunosti i kako bi dobiveni gDNA bio što čišći. Nakon toga, svakom uzorku dodano je 100 μL miliQ vode te je uzorak ponovo stavljen u termoblok na +40 °C na 60 min, kako bi se izolirani gDNA otopio (Slika 13).



Slika 13. Prikaz izolacije gDNA iz tkiva seminoma i okolnog tkiva. Nakon deparafinizacije, uslijedila je homogenizacija i digestija tkiva. Zatim, isoljavanjem proteina dobio se supernatant u kojem se nalazio gDNA. Dodavanjem izopropanola dolazi do precipitacije DNA. Nastali talog DNA ispire se etanolom nakon čega slijedi dekantiranje, isparavanje ostataka etanola i u konačnici otapanje DNA taloga u autoklaviranoj vodi.

Koncentracija i čistoća gDNA izmjerena je na spektrofotometru Nanodropu 2000c (Thermo Scientific, SAD) tako da je izmjerena absorbancija 1 μL izolata gDNA pri 260 nm u triplikatu. Konačne koncentracije izoliranog gDNA, izračunate su kao srednja vrijednost triju mjerenja.

4.2.7. Početnice za PCR i pirosekvenciranje

Detaljnim pregledom literature pronađene su početnice za umnažanje željenih fragmenata *RASSF1A* PCR reakcijom i analizu metilacije DNA pirosekvenciranjem (150). Sekvenca početnica i analizirana sekvenca prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Početnice korištene za umnažanje i analizu metilacije gena *RASSF1A* analizirana sekvenca i broj analiziranih CpG mjesta unutar iste. Tablica prikazuje početnice za umnažanje i njihove sekvence: F- *forward* početnica, R- *reverse* početnica, S- početnica za sekvenciranje

Naziv gena	Početnica	Sekvenca početnice	Analizirana sekvenca	CpG mjesta
RASSF1A	F	5'-AGTTTGGATTTTGGGGGAGG-3'	5'-YGTTYGGTTYGYGTTTGTTAGYGTTTAAAGTTAGYGAAGTAYGGGTTTAATYGGGTTATGTYG-3'	9
	R	biotin-5'-CAACTCAATAAACTCAAACTCCCC-3'		
	S	5'-GGGTTAGTTTTGTGGTTT3'		

PCR početnice uzete iz literature bile su optimizirane na cfDNA izoliranoj iz krvne i sjemene plazme te na gDNA iz tkiva SE. Prvi korak u optimizaciji PCR reakcije bilo je odrediti temperaturu vezanja početnica. 10 ng cfDNA i gDNA stavljeno je u PCR reakcije kojima su se temperature prianjanja početnica razlikovale. Uspješnost umnažanja *RASSF1A* fragmenta pri različitim temperaturama, provjerena je gel elektorforezom. Na 2 % agarozni gel u 1 x TAE puferu (Tris-acetat-EDTA) naneseno je 5 μL pojedinog PCR produkta. Elektoforeza je provedena tako da je 10 minuta struja bila postavljena na 80V, a zatim je 30 minuta bila postavljena na 120V. Prilikom

pripreme gela dodana je otopina boje (*GelStarTM Nucleic Acid Gel Stain*, Lonza, Švicarska) koja se veže za DNA i služi za vizualizaciju umnoženih DNA fragmenata na UV-transiluminatoru. Usporedbom umnoženih PCR produkata sa standardom DNA (*SimplyLoadTM 100 bp DNA Ladder*, Lonza, Švicarska) koji sadži fragmente poznatih veličina, provjerena je očekivana veličina umnoženih PCR produkata. Uvjeti pri kojima je željeni *RASSF1A* fragment bio umnožen i vizualiziran na odgovarajućem mjestu na gelu, uzeti su za daljnje PCR reakcije. Sljedeći korak bila je optimizacija količine cfDNA i gDNA koja ide u PCR reakciji. Prema uputama proizvođača, za optimizaciju PCR-a i pirosevenciranja isprobane su početne količine cfDNA i gDNA od 10 ng, 5 ng i 2,5 ng. Za *RASSF1A* utvrđeno je da je za uspješnu PCR reakciju potrebno 5 ng gDNA i cfDNA. Radi sigurnosti u PCR reakciju i izostanka kontaminacije, miliQ voda je korištena kao negativna kontrola.

4.2.8. Bisulfitna konverzija izoliranoga gDNA i cfDNA

Kako bi pirosekvenciranjem bila analizirana samo metilirana mjesta, nemetilirani citozini morali su se metodom bisulfitne konverzije pretvoriti u uracile. Ta konverzija napravljena je komercijalnim kitom *EpiTect® Bisulfite Kit* (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača. Ukratko, nakon pripreme kemikalija prema uputama proizvođača, u PCR tubice je dodan DNA uzorka koji se konvertira, voda slobodna od Rnaza (engl. *RNase free water*), bisulfitna mješavina (sadrži natrijev bisulfit), i DNA zaštitni pufer (engl. *DNA protect buffer*). Masa konvertiranog DNA u slučaju gDNA iznosila je 500 ng, dok je kod cfDNA masa bila nešto manja zbog manjih koncentracija izolata, ali nikad ispod preporučenog minimuma od 1 ng. Nakon što su u reakcijsku smjesu dodane sve komponente, PCR tubice su protresene, kratko centrifugirane i stavljene u uređaj CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Njemačka). PCR reakcija pokrenuta je prema sljedećim uputama; trostruka izmjena denaturacije tijekom 5 minuta pri 98 °C i inkubacije pri 60 °C (prvi put 25 minuta, drugi 85 minuta i treći 175 minuta) te čuvanje uzoraka na 20 °C. Nakon završetka PCR reakcije, sadržaj svake tubice je kratko centrifugiran i prebačen u novu 1,5 mL tubicu te je dodan BL pufer koji je prethodno pomiješan s otopinom nosača RNA. BL pufer potreban je za vezanje DNA na kolone za izolaciju, dok otopina nosača RNA pospješuje vezanje na kolonu DNA malih količina i DNA koji je fragmentiran. U tubice je dodan

100 % etilni alkohol te su nakon trešnje od 10 sekundi, uzorci prebačeni na *MinElute* DNA spin kolone umetnute u kolekcijske tubice. Uslijedilo je centrifugiranje kolone na 20 000 x *g* u trajanju od 1 minute (isti uvjeti primijenjeni su sve do eluacije DNA s kolone). Filtrat je izbačen te je kolona isprana s BW puferom koji uklanja ostatke natrijevog bisulfita, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje. Filtrat je ponovo izbačen, a na kolonu je nanesen desulfonacijski BD pufer te su kolone s uzorcima inkubirane na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon centrifugiranja na kolone je dva puta nanesen BW pufer praćen korakom centrifugiranja. Nakon toga nanesen je 100 % etilni alkohol, kolone su centrifugirane te su prebačene u čiste kolekcijske tubice. Na kolone je dodan elucijski pufer nakon čeka je slijedila inkubacija na sobnoj temperatuti od 1 minute i centrifugiranje na 15 000 x *g* u trajanju od 1 minute. Ovisno o početnoj količini DNA u izolatu, volumen pufera kojim se eluirao bisulfitno konvertirani DNA s kolone je varirao. U svakom slučaju elucija se provodila dva puta, tako da se krajnji volumen eluata podijelio na dva jednaka dijela. Minimalan volumen elucijskog pufera nanesen na kolone bio je 10 µL (Slika 14). Nakon završetka bisulfitne konverzije svi uzorci su spremljeni na –80 °C do daljnje analize.

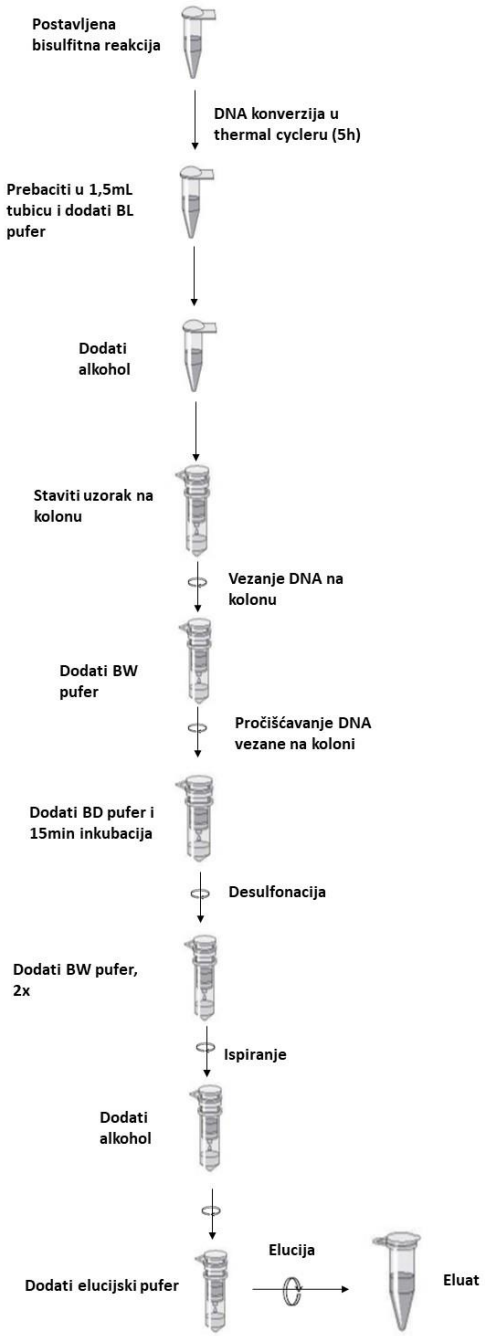
4.2.9. PCR (lančana reakcija polimerazom)

Bisulfitno konvertirani DNA podvrgnut je postupku lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) u svrhu umnažanja željenog *RASSF1A* fragmenta. Za postavljanje reakcije je korišten komercijalni kit kemikalija *PyroMark® PCR* kit (Qiagen, Njemačka), prema uputama proizvođača.

U svaku reakcijsku smjesu dodano je 12,5 µL Master Mix-a, 1 µL $mgCl_2$, 2,5 µL koncentrata CoralLoad-a, 0,5 µL 10 µM F početnica, 0,5 µL 10 µM R početnica te vode i uzorka bisulfitno konvertiranog DNA čija je ukupna masa u reakciji iznosila 5 ng. Ukupni volumen uzorka se razlikovao kod gDNA i cfDNA zbog različitih koncentracija. U slučaju gDNA ukupni volumen dodane bisulfitno konvertiranog DNA bio je 2 µL, a kod cfDNA čije su koncentracije bile manje, volumen dodanog uzorka bio je između 1 µL i 8 µL. PCR reakcijom umnažale su se i dvije komercijalne kontrole (*EpiTect PCR Control DNA Set*, Qiagen, Njemačka), jedna je sadržavala potpuno metilirani, bisulfitno konvertirani DNA, dok je druga sadržavala potpuno nemetilirani,

bisulfitno konvertirani DNA. Sve kontrole dodane su u volumenu od 1 μL. Komercijalne kontrole služile su kao kontrole u reakciji pirosekvenciranja koja je slijedila nakon PCR reakcija.

PCR reakcija odvijala se u uređaju CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Njemačka) i C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Njemačka). DNA se amplificirao pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija po 15 minuta na 95 °C, zatim je bilo 45 ciklusa u kojima se odvijala denaturacija na 94 °C (30 sekundi), vezanje početnica na 65 °C (30 sekundi) i sinteza lanaca na 72 °C (30 sekundi). Nakon 45 ciklusa nastupila je završna elongacija na 72 °C u trajanju od 10 minuta. Svi uzorci nakon PCR reakcije pohranjeni su na +4 °C do daljnje analize koja je uslijedila sljedeći dan.

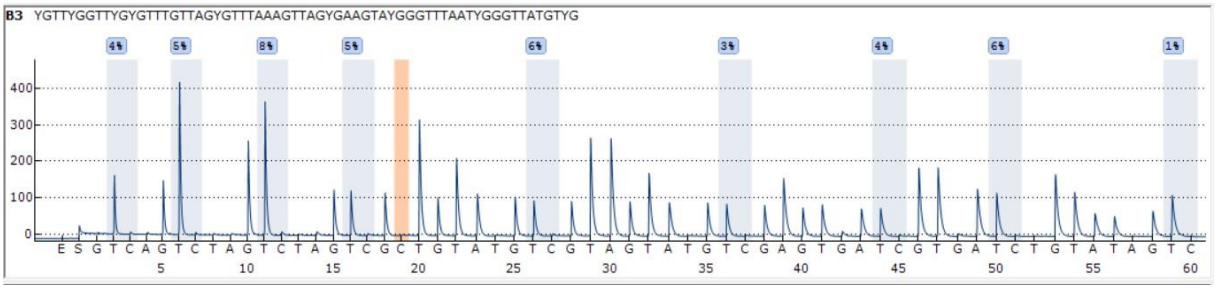


Slika 14. Prikaz protokola bisulfitne konverzije uzoraka. Postavljena reakcija bisulfitne konverzije stavljena je u PCR uređaj gdje pod određenim uvijetima dolazi do konverzije nemetiliranih citozina u uracile. Nakon toga slijedi vezanje konvertiranog DNA na kolonu i pročišćavanje DNA. Kada se DNA pročisti, eluira s kolone i otapa u elucijskom puferu.

4.2.10. Pirosekvenciranje

Za pirosekvenciranje PCR produkta bisulfitno konvertiranog DNA, koristio se pirosekvencer *Pyromark Q24 Advanced* (Qiagen, Njemačka) i kemikalije *PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents* (Qiagen, Njemačka).

U računalnom programu *PyroMark Q24 Advanced Software* (Qiagen, Njemačka) napravljen je esej za pirosekvenciranje *RASSF1A* gena čime je utvrđen redoslijed dodavanja nukleotida u reakcijsku smjesu s obzirom na sekvencu koja se analizira. Na slici 15 prikazana je analizirana sekvenca s označenim CpG mjestima, redoslijedom dodavanja nukleotida i kontrolnim C mjestom koji je služio za kontrolu bisulfitne konverzije. Prema uputama proizvođača sve su kemikalije inkubirane 30 minuta prije početka analize na sobnoj temperaturi. Uređaji potrebni za pirosekvenciranje (pirosekvencer, grijača ploča, miješalica) uključeni su barem 30 minuta prije početka rada, također u skladu s uputama proizvođača. Uz to provjerena je ispravnost vakuumske pumpe i pripremljena je radna postaja *PyroMark® Q24 Vacuum Workstation* što uključuje punjenje odgovarajućih posudica 70 % etilnim alkoholom, destiliranom vodom te proizvođačevom denaturacijskom otopinom (engl. *denaturation buffer*) i puferom za ispiranje (engl. *wash buffer*). Zatim su pripremljene reakcijska smjesa za vezivanje koja uključuje streptavidinom obložene sefarozne kuglice (*Streptavidin Sepharose® High Performance*, GE Healthcare, Švedska) te reakcijska smjesa za prianjanje sa sekvencijskim početnicama prema uputama proizvođača (Tablica 4).



Slika 15. Primjer dobivenih pirograma i prikaz kvalitete analize koji je izbacio *software*. Iznad pirograma napisana je analizirana sekvenca, a ispod pirograma nalazi se redoslijed nukleotida po kojem su oni dodavani u reakciju. Crveno označeni C, označava kontrolu bisulfitne konverzije. Na svakom analiziranom CpG- u označena je frekvencija metilacije koja je detektirana u uzorku. Plavo obojenje znači da je pirosekvenciranje uspješno napravljeno.

Tablica 4. Komponente i volumeni reakcijske smjese za vezanje biotiniliranih PCR produkata na sefarozne kuglice i za vezanje početnica.

Smjesa	**Komponente**	**Volumen po uzorku (µL)**	**Vrsta korištene ploče**
reakcijska smjesa za vezivanje	Sefarozne kuglice	2	PCR pločica
	Pufer za vezanje (*PyroMark binding buffer*)	40	
	miliQ voda	18	
	PCR produkt	20	
reakcijska smjesa za prianjanje	Pufer za prijanjanje (*PyroMark annealing buffer*)	19,25	PyroMark Q24 pločica
	RASSF1A početnica za sekvenciranje	0,75	

Volumen od 60 µL reakcijske smjese za vezivanje dodano je u svaku jažicu PCR ploče s 24 jažice. Zatim je u svaku jažicu dodano po 20 µL PCR produkta. Pločica je zatvorena samoljepljivom folijom i stavljena je na mješalicu na 1400 *rpm* na 10 minuta na sobnoj temperaturi što omogućuje vezanje PCR produkata na sefarozne kuglice. Zatim je pripremljen spremnik za pirosekvenciranje (*PyroMark® Q24 Cartridge*, Qiagen, Njemačka) dodavanjem odgovarajućeg volumena smjese enzima (DNA polimeraze, ATP sulfurilaze, luciferaze i apiraze), supstrata

(adenozin 5' fosfosulfat i luciferin) i nukleotida, prema eseju koji je kreiran u gore spomenutom računalnom programu. Spremnik je lagano prolupkan kako bi se sve kemikalije spustile na dno i stavljen je na odgovarajuće mjesto u pirosekvencer. Zatim je pripremljena *PyroMark Q24* pločica za pirosekvenciranje tako da je u svaku od 24 jažice ispipetirano 20 μL reakcijske smjese za prianjanje koja sadrži *RASSF1A* sekvencijske početnice. Nakon što su se PCR produkti tresli 10 minuta na miješalici te su spremnik za pirosekvenciranje i *PyroMark Q24* pločica pripremljeni, PCR ploča s produktima prebačena je na radnu postaju. Uključena je vakuum pumpa te su u jažice PCR ploče uronjeni filter nastavci na 20 sekundi kako bi se sefarozne kuglice koje na sebi sadrže PCR produkte vezale na filter nastavke. Zatim su filter nastavci provedeni kroz zadani niz na sljedeći način, 70 % etilni alkohol 5 sekundi (ispiranje nevezanih DNA koji nisu biotinilirani), denaturacijski pufer 5 sekundi (razdvajanje lanaca DNA pri čemu samo biotinilirani lanac ostaje vezan za sefaroznu kuglicu) pufer za ispiranje 10 sekundi, i sušenje filter nastavaka na zraku u okomitom položaju 5 sekundi. Nakon toga, filter nastavci postavljeni su točno iznad jažica *PyroMark Q24* pločice te su lagano spušteni u jažice prilikom čega se isključio vakuum neposredno iznad tekućine u jažicama. Laganom trešnjom filter nastavaka 30-ak sekundi, sefarozne su kuglice s PCR produktima pale u pojedinu jažicu pločice. Pločica je stavljena na grijaču ploču ugrijanu na +80 °C te inkubirana 5 minuta. Odmah nakon inkubacije na grijačoj ploči, *PyroMark Q24* pločica postavljena je na odgovarajuće mjesto u pirosekvencer i pokrenut je esej koji sadrži korake pirosekvenciranja za *RASSF1A*.

4.2.11. Analiza podataka dobivenih pirosekvenciranjem

Nakon završetka pirosekvenciranja, dobiveni su pirogrami koji grafički prikazuju metilaciju DNA *RASSF1A* gena svih analiziranih CpG-ova u svakom pojedinačnom uzorku. Za svaki analizirani CpG dobiven je postotak metilacije. Sama kvaliteta rezultata procijenjena je na temelju kontrole bisulfitne konverzije, negativnih kontrola i amplitude dobivenih pikova. Računalni program za analizu rezultata provodi kontrolu kvalitete analize tako što koristi pikove koji ne pripadaju CpG-u kao referentne pikove te mjeri koliko se oni dobro uklapaju u teoretski pikogram koji je 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*) smatrani se

zadovoljavajućim, iako su gotovo svi bili značajno iznad te vrijednosti. Primjer dobivenih pirograma prikazan je na slici 15. Analizirana je metilacija *RASSF1A* u uzorcima gDNA iz SE tkiva i OT te uzorci cfDNA iz krvi i ejakulata zdravih dobrovoljaca (ZD), preoperativnih (preop) i postoperativnih (postop) uzoraka pacijenata.

4.2.12. Statistička obrada podataka

Rezultati dobiveni imunohistokemijom, analizirani su pomoću Mann-Whitneyjevog testa (engl. *Mann Whitney U test*) i *Kruskal-Wallis*-a s Dunn-ovim testom višestrukih usporedbi (engl. *Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test*). Rezultati su smatrani statistički značajnim kada je $p<0,05$.

Razlike u razini metilacije *RASSF1A* između kontrolnih i svih uzoraka pacijenata sa SE testirane su neparametarskim testovima. *Mann-Whitney* s *Bonferroni*-jevom korekcijom (engl. *Mann Whitney U test with Bonferroni correction*) upotrijebljen je za usporedbu između dvije skupine s neuparenim uzorcima, dok su usporedbe između dvije skupine s uparenim uzorcima detektirane *Wilcoxon*-ovim testom uparenih rangova (engl. *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*). Razlike između više skupina procijenjene su ili s *Kruskal-Wallis* testom s *Dunn*-ovim testom višestrukih usporedbi (engl. *Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test*) ako skupine nisu bile uparene ili s Friedman-ovim testom s Dunn-ovim testom višestrukih usporedbi (engl. *Friedman test with Dunn's multiple comparisons test)* kod uparenih skupina. Rezultat se smatrao statistički značajnim kada je $p <0,05$.

Za izračunavanje korelacije koristio se *Spearman*-ov neparametrijski koeficijent korelacije (engl. *Spearman's rank correlation coefficient*). Rezultat se smatrao statistički značajnim ako je $p< 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Pacijenti i dobrovoljci

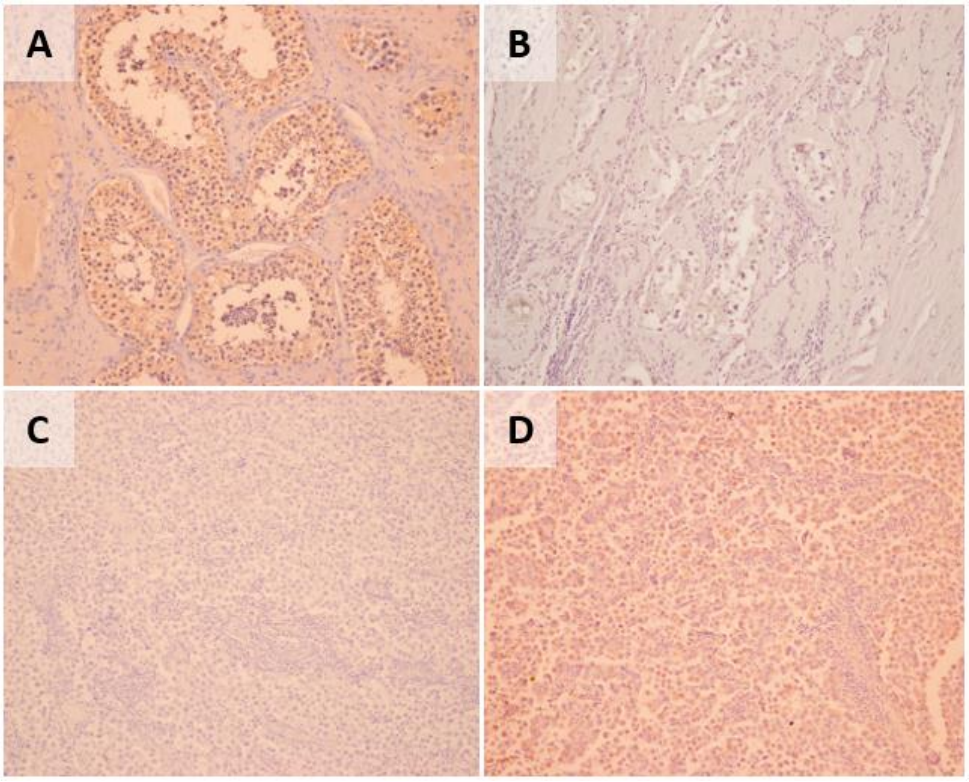
Prema TNM klasifikaciji SE, od ukupno 29 uključenih pacijenata, 19 pacijenata (65,5 %) imalo je stadij proširenosti T1NxMx, 8 (27,6 %) T2NxMx i 1 (3,4 %) T3NxMx (Tablica 5), bez podataka o statusu limfnih čvorova i metastatske bolesti u solidne organe. Srednja dob dobrovoljaca bila je 27,3 (raspon 16-42) godina, a srednja dob pacijenata bila je 37,5 godina (raspon godina 20-53).

Tablica 5. Kliničkopatološki podaci pacijenata uključenih u studiju

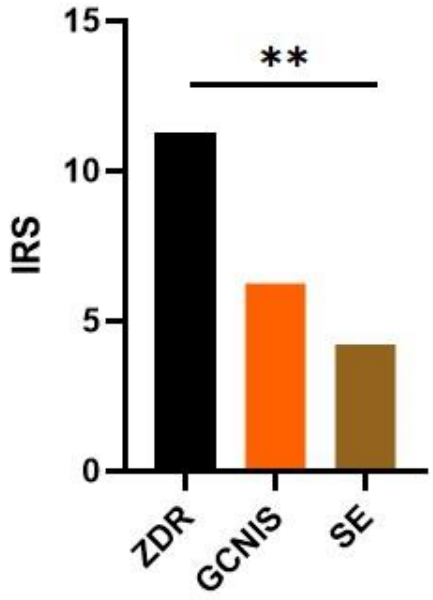
Kliničkopatološki parametri	SE pacijenti (n=29)	Zdravi dobrovoljci (n=24)
Medijan starosti, godine (raspon)	37,52 (20-53)	27,46 (16-42)
TNM klasifikacija		
T1NxMx	19	
T2NxMx	8	
T3NxMx	1	
Medijan veličine tumora (raspon) cm	3,75 (0,3-8)	

5.2. Analiza ekspresije gena *RASSF1A* na proteinskoj razini u tkivu

Rezultati imunohistokemijske analize genske ekspresije *RASSF1A* u okolnom tkivu s očuvanom spermatogenezom, GCNIS-u i tkivu SE prikazani su koristeći IRS sustav. Jasno je uočljiv padajući trend ekspresije gena *RASSF1A* na proteinskoj razini od tkiva s očuvanom spermatogenezom prema GCNIS-u i SE. U tkivu s očuvanom spermatogenezom je *RASSF1A* bio statistički značajno više eksprimiran nego u SE (Slika 16, Slika 17). Statistički značajna razlika detektirana je *Kruskal-Wallis* testom s *Dunn*-ovim testom više usporedbi (**$p < 0.01$).



Slika 16. Imunohistokemijska izraženost *RASSF1A* (povećanje 200x). A. Pozitivna citoplazmatska reakcija u kanalićima s održanom spermatogenezom, B. Negativna reakcija u kanalićima s GCNIS, C. Negativna reakcija u seminomu, D. Blago pozitivna citoplazmatska reakcija u pojedinih pacijenata sa seminomom.

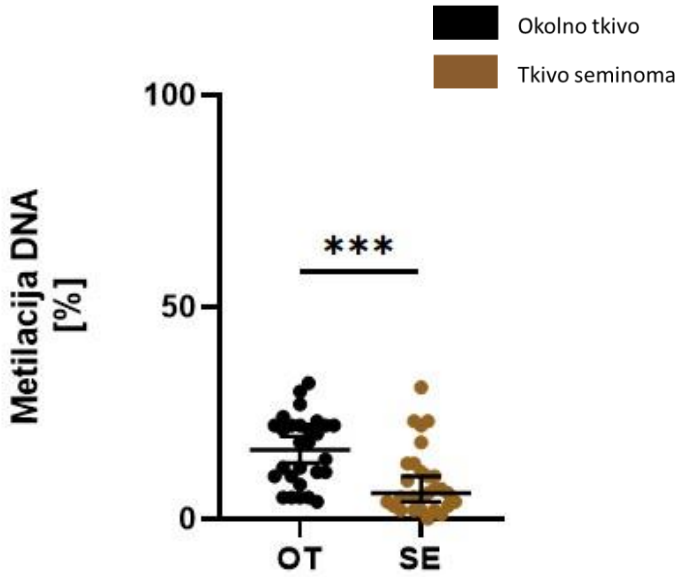


Slika 17. Ekspresija gena *RASSF1A* na razini proteina. **p< 0.01, ZDR – tkivo testisa s očuvanom spermatogenezom, GCNIS – neoplazija zametnih stanica *in situ*, SE – tkivo seminoma.

5.3. Metilacija gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u tkivu

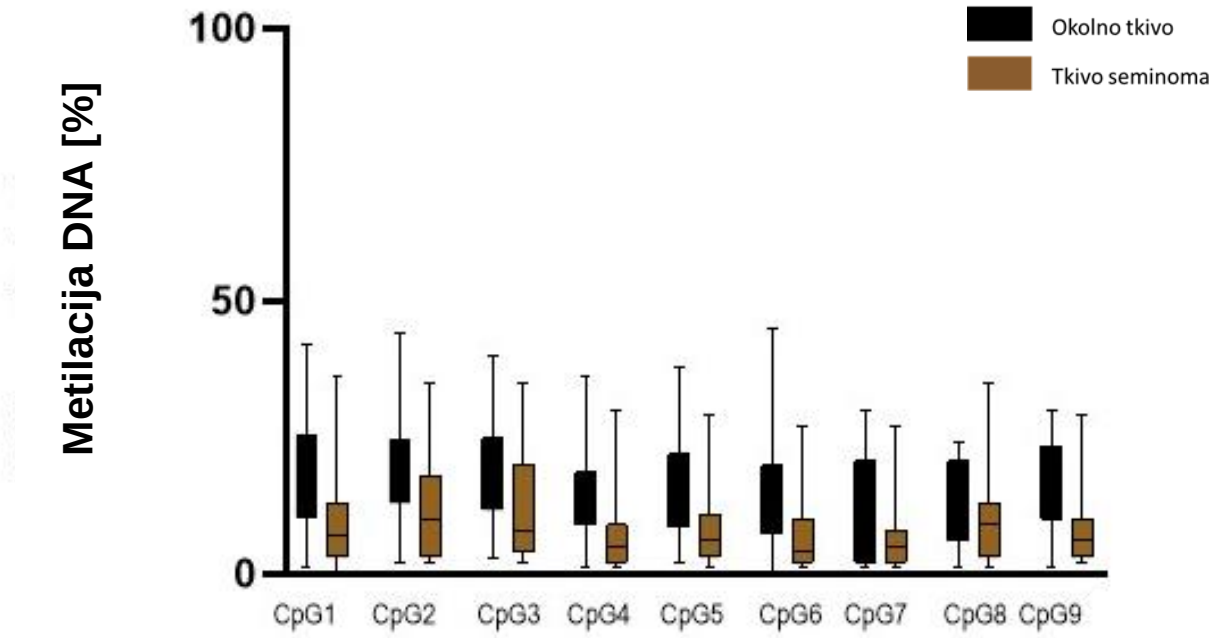
Rezultati analize metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* dobiveni pirosekvenciranjem prikazani su *dot-plot* prikazom. Statistička značajnost testirana je *Wilcoxon matched-pairs signed rank* testom pri čemu je otkrivena je hipermetilacija *RASSF1A* gDNA u okolnom tkivu. Detektirana statistički značajna razlika označena je ***p< 0.001.

Dobivena je srednja vrijednost metiliranosti svih analiziranih CpG dinukleotida, svih uzoraka u skupini i iznosila je 18 uz SEM ±1.5. Tkivo SE pokazuje pak hipometilaciju gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* sa srednjom vrijednosti metilacije od 6 uz SEM ±1.5. (Slika 18).



Slika 18. Status metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u okolnom tkivu i tkivu seminoma. ***p< 0.001.

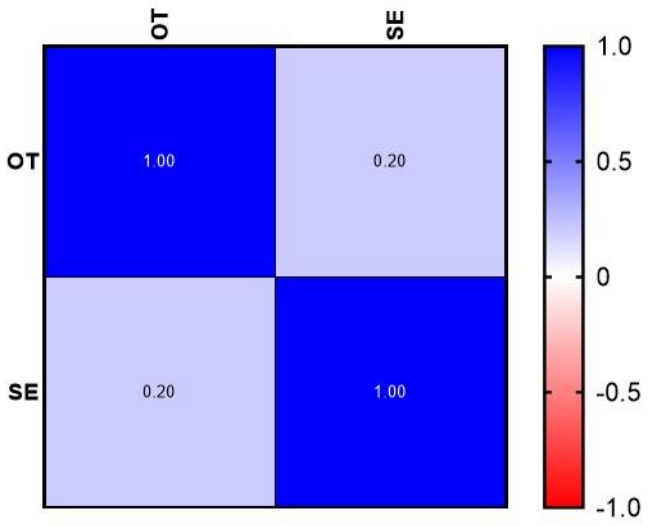
Analizom razlika u metilaciji na pojedinim CpG dinukleotidima jasno je uočljiva hipermetiliranost gDNA okolnog tkiva naspram hipometilaciji gDNA tkiva SE u svakom pojedinom CpG dinukleotidu promotorske regije. Ipak, *Kruskal-Wallis* testom s *Dunn*-ovim testom više usporedbi nije pronađena statistički značajna razlika. Dobiveni rezultati prikazani su kutijastim dijagramom (engl. *box and whiskers plot*). Naznačen je medijan uz minimum i maksimum za svaki CpG dinukleotid (Slika 19).



Slika 19. Obrazac metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u okolnom tkivu i tkivu seminoma.

Spearman-ovim testom dobiven je koeficijent korelacije metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u okolnom tkivu i tkivu SE. Detektirana je pozitivna korelacija metilacije, ali nije bila statistički značajna ($p>0.05$) (Slika 20).

Rezultati su prikazani matricom korelacija uz koju skala prikazuje *Spearman*-ov koeficijent korelacije te je kodirana bojom (plava boja predstavlja pozitivnu korelaciju, crvena negativnu korelaciju, a bijela odsustvo korelacije).

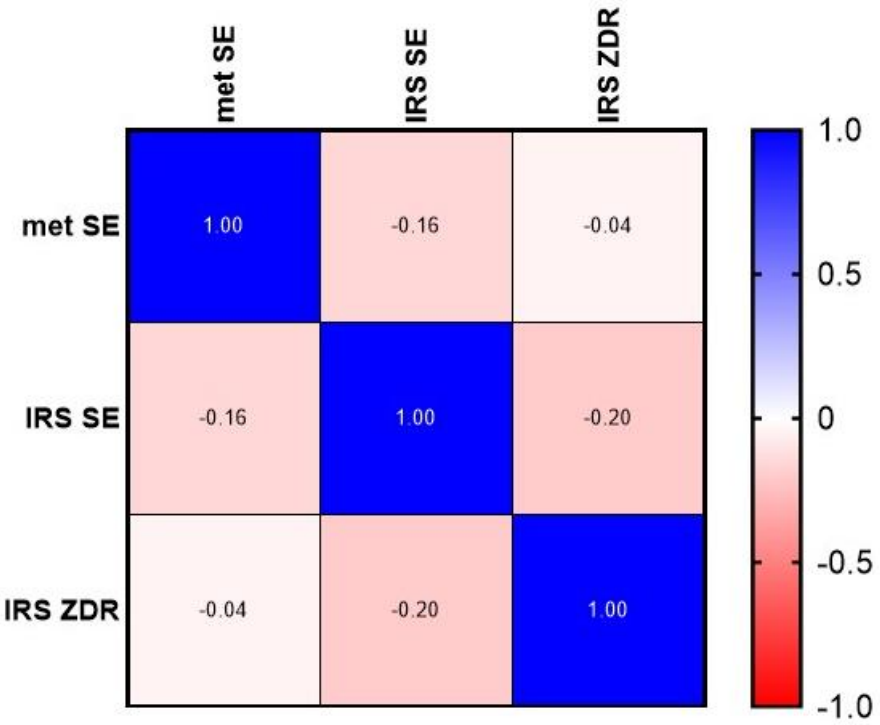


Slika 20. Korelacija statusa metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u okolnom tkivu i tkivu seminoma. OT - okolno tkivo, SE - tkivo seminoma.

5.4. Odnos metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* s ekspresijom na proteinskoj razini u tkivu

Spearman-ovim koeficijentom korelacije određen je odnos gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* i njegove proteinske ekspresije u tkivu SE te tkivu testisa s očuvanom spermatogenezom. Dokazan je negativan korelacijski odnos statusa metiliranosti gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u tkivu SE i ekspresije *RASSF1A* gena na proteinskoj razini u tkivu SE i u okolnom tkivu testisa s očuvanom spermatogenezom, iako statistički nije bio značajan ($p>0.05$) (Slika 21).

Rezultati su prikazani matricom korelacija uz koju skala prikazuje *Spearman*-ov koeficijent korelacije te je kodirana bojom (plava boja predstavlja pozitivnu korelaciju, crvena negativnu korelaciju, a bijela odsustvo korelacije).



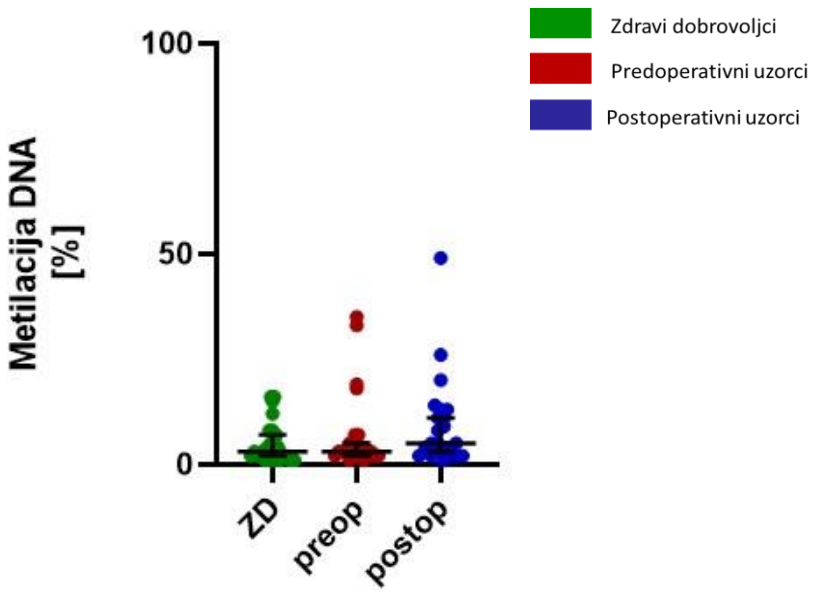
Slika 21. Korelacija statusa metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* i ekspresije *RASSF1A* na proteinskoj razini u tkivu seminoma i okolnom tkivu s očuvanom spermatogenezom. SE- tkivo seminoma, ZDR – okolno tkivo testisa s očuvanom spermatogenezom.

5.5. Analiza metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u tekućinskim biopsijama

Analizom metilacije promotorske regije gena *RASSF1A* napravljenom pirosekvenciranjem na cfDNA iz krvi i ejakulata dobiveni su niže prikazani rezultati.

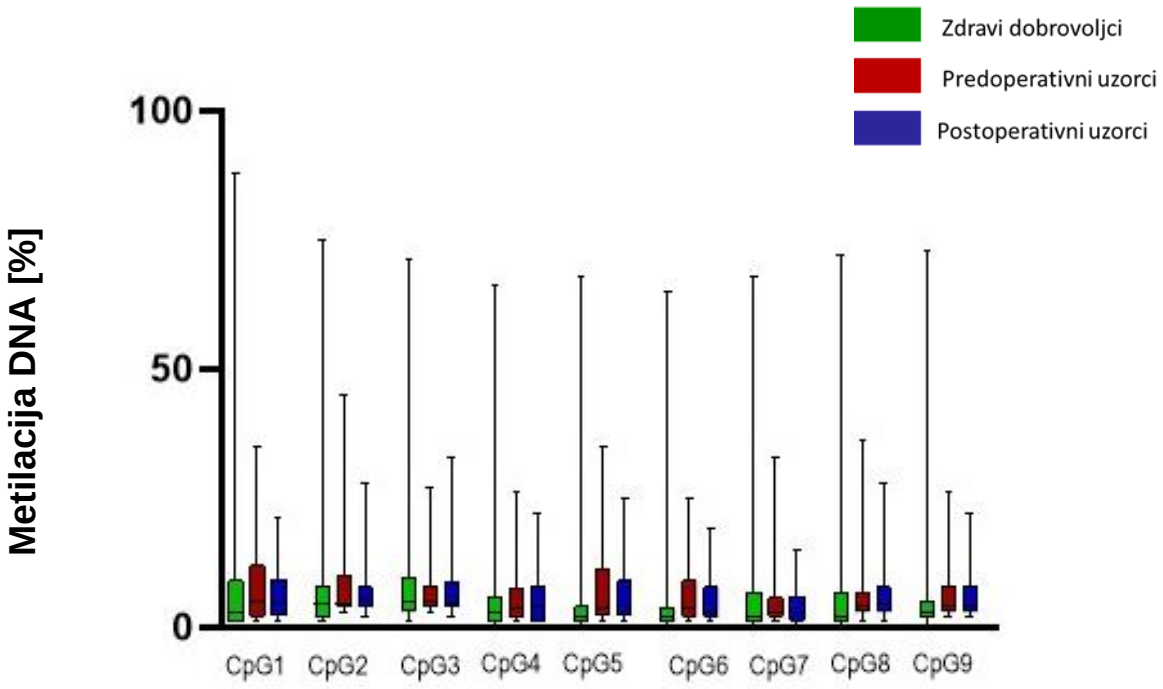
5.5.1. Krv

RASSF1A je hipometiliran u predoperativnim uzorcima krvi pacijenata u odnosu na uzorke krvi zdravih dobrovoljaca i postoperativne uzorke pacijenata sa SE testisa. Dobivena je srednja vrijednost metiliranosti svih analiziranih CpG dinukleotida u skupini predoperativnih uzoraka koja iznosi 3 uz SEM ±2.65. U krvi zdravih dobrovoljaca *RASSF1A* je bio hipermetiliran sa srednjom vrijednost koja je iznosila 4.5 uz SEM ±1.02, dok je u postoperativnim uzorcima srednja vrijednost iznosila 8.5 uz SEM ±3.09. Statistička značajnost testirana je *Kruskal-Wallis* testom s *Dunn*-ovim testom više usporedbi, pri čemu statistički značajna razlika nije uočena ($p>0.05$). Rezultati su prikazani su *dot-plot* prikazom (Slika 22).



Slika 22. Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz uzoraka krvi zdravih dobrovoljaca te predoperativnih i postoperativnih uzoraka pacijenata.

Analizom razlika u metilaciji *RASSF1A* gena iz uzoraka krvi na pojedinim CpG dinukleotidima, jasno je uočena hipermetiliranost cfDNA na CpG dinukleotidima 1, 4, 5, 6 i 9 u predoperativnim uzorcima krvi pacijenata sa SE naspram hipometilaciji cfDNA u uzorcima krvi zdravih dobrovoljaca i postoperativnim uzorcima pacijenata sa SE. Statistička značajnost testirana je *Kruskal-Wallis* testom s *Dunn*-ovim testom više usporedbi i nisu dobivene statistički značajne razlike ni u jednom pojedinačnom CpG dinukleotidu. Dobiveni rezultati prikazani su kutijastim dijagramom (engl. *box and whiskers plot*). Na grafu je naznačen je medijan s minimumom i maksimumom za svaki CpG dinukleotid (Slika 23).

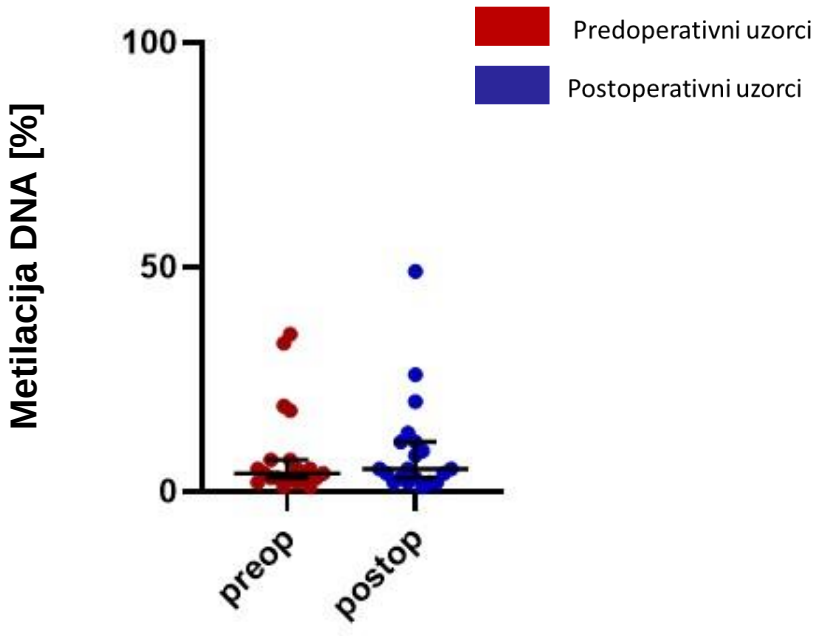


Slika 23. Obrazac metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u uzorcima zdravih dobrovoljaca, preoperativnim i postoperativnim uzorcima krvi pacijenata sa seminomom testisa.

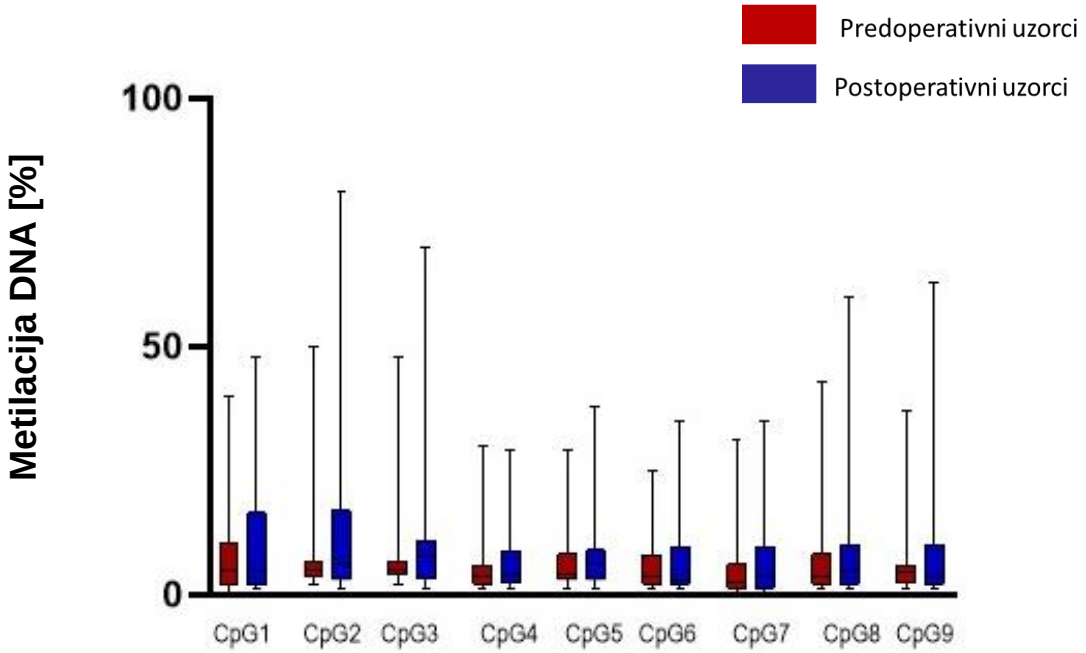
Uočena je hipometilacija *RASSF1A* u predoperativnim uzorcima u odnosu na postoperativne uzorke krvi koji su bili upareni. Srednja vrijednost metiliranosti svih analiziranih CpG dinukleotida u skupini predoperativnih uzoraka iznosi 8.15 uz SEM ±2.25, dok u skupini postoperativnih uzoraka iznosi 9.25 uz SEM ± 2.55. Statistička značajnost testirana je *Wilcoxon matched-pairs signed rank* testom, pri čemu statistički značajna razlika nije uočena. Dobiveni rezultati prikazani su *dot-plot* prikazom (Slika 24).

Analizom metilacija *RASSF1A* gena na svakom analiziranom CpG dinukleotidu uočen je hipometilacijski trend u predoperativnim uzorcima u odnosu na postoperativne uzorke krvi pacijenata sa SE na svih 9 CpG dinukleotida. Statistička značajnost ispitana je *Friedman*-ovim testom s *Dunn*-ovim testom više usporedbi pri čemu statistički značajne razlike nisu uočene ni na jednom analiziranom CpG dinukleotidu. Dobiveni rezultati prikazani su kutijastim dijagramom

(engl. *box and whiskers plot*). Na grafu je naznačen medijan s minimumom i maksimumom za svaki CpG dinukleotid (Slika 25).



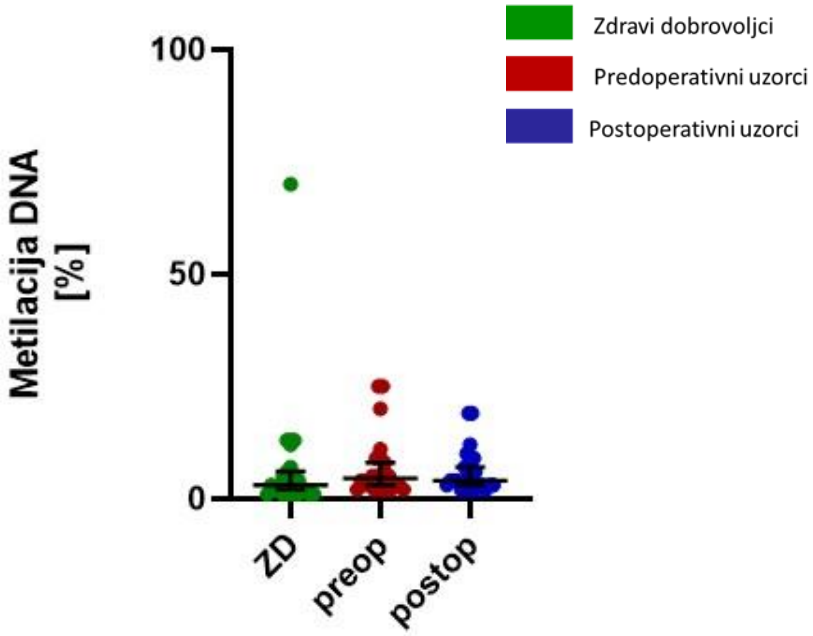
Slika 24. Status metilacije cfDNA promotorske regije *RASSF1A* u sparenim predoperativnim i postoperativnim uzorcima krvi pacijenata.



Slika 25. Obrazac metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u sparenim predoperativnim i postoperativnim uzorcima krvi pacijenata sa seminomom testisa.

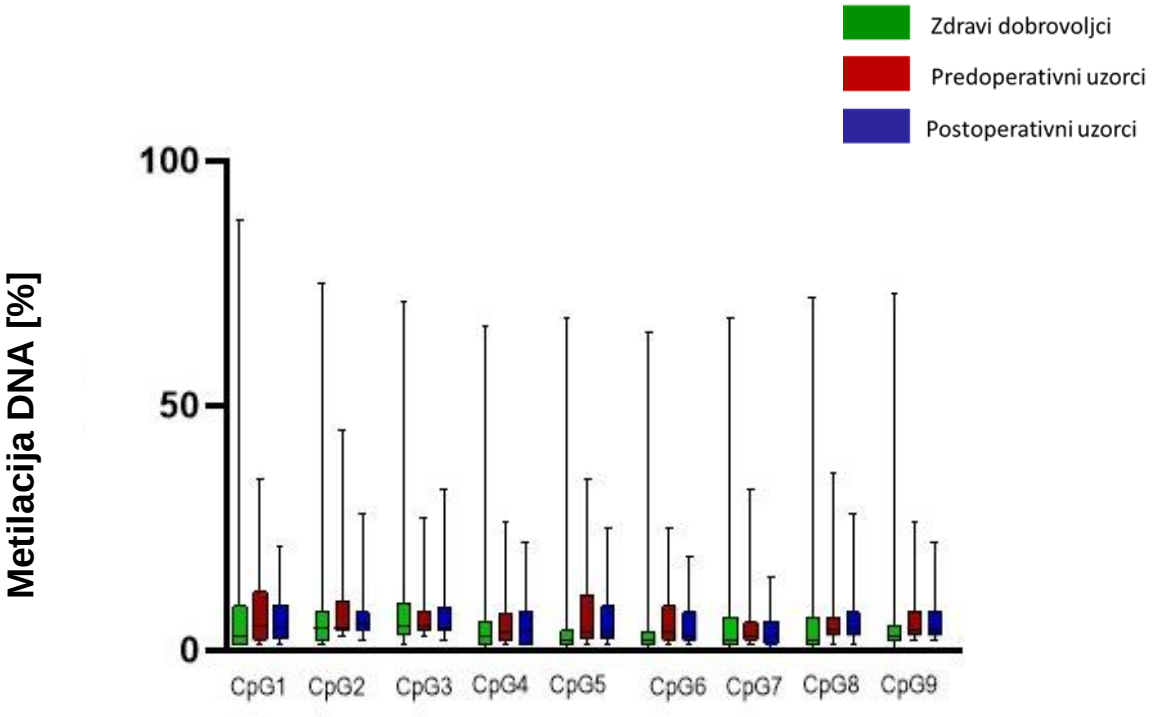
5.5.2. Ejakulat

U uzorcima ejakulata uočeno je da je *RASSF1A* hipermetiliran u predoperativnim uzorcima pacijenata sa SE u odnosu na uzorke zdravih dobrovoljaca i postoperativne uzorke pacijenata sa SE testisa. Dobivena je srednja vrijednost metiliranosti svih analiziranih CpG dinukleotida u skupini predoperativnih uzoraka koja iznosi 4.5 uz SEM ± 1.5. U ejakulatu zdravih dobrovoljaca *RASSF1A* je bio hipometiliran, a srednja vrijednost je bila 3 uz SEM±1.5, dok je u postoperativnim uzorcima srednja vrijednost iznosila 4 uz SEM ±1. Statistička značajnost testirana je *Kruskal-Wallis* testom s *Dunn*-ovim testom više usporedbi, pri čemu statistički značajna razlika nije uočena. Rezultati su prikazani *dot-plot* prikazom (Slika 26).



Slika 26. Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz uzoraka krvi zdravih dobrovoljaca te predoperativnih i postoperativnih uzoraka ejakulata pacijenata.

U uzorcima ejakulata također su analizirane razlike u metilaciji *RASSF1A* na pojedinim CpG dinukleotidima. Uočeno je da je *RASSF1A* hipermetiliran na svim analiziranim CpG dinukleotidima u predoperativnim uzorcima ejakulata pacijenata sa SE testisa u odnosu na uzorke ejakulata zdravih dobrovoljaca i postoperativne uzorke pacijenata. Statistička značajnost testirana je *Kruskal-Wallis* testom s *Dunn*-ovim testom više usporedbi i ove razlike nisu bile statistički značajne ni u jednom pojedinačnom CpG dinukleotidu. Rezultati su prikazani kutijastim dijagramom (engl. *box and whiskers plot*) (Slika 27).



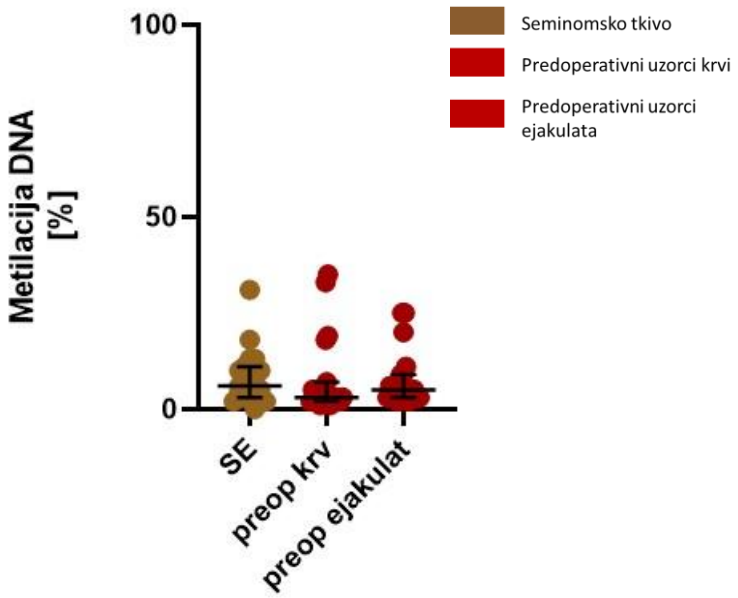
Slika 27. Obrazac metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u uzorcima zdravih dobrovoljaca, preoperativnim i postoperativnim uzorcima ejakulata pacijenata sa seminomom testisa.

5.6. Usporedba metilacije gDNA u tkivu seminoma i metilacije cfDNA iz tekućinskih biopsija

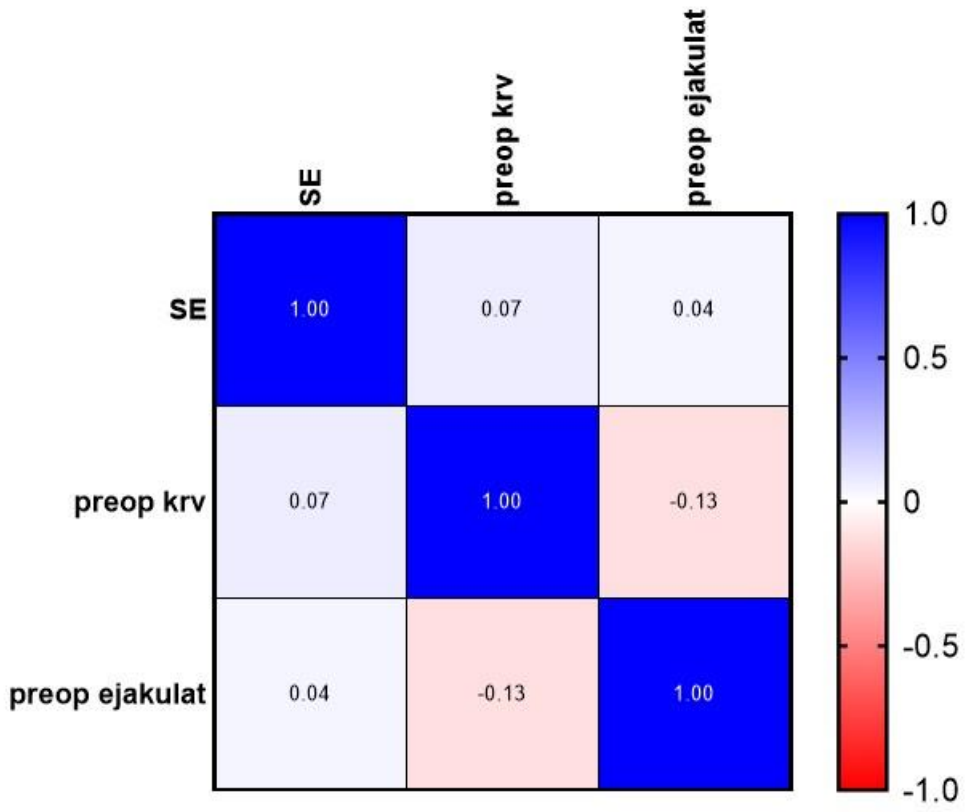
Kako bismo odredili odražava li se metilacija gDNA uočena u tkivu SE na cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz krvi i ejakulata pacijenata, usporedili smo rezultate metilacije gDNA iz tkiva SE sa cfDNA iz preoperativnih sparenih uzoraka pojedinog pacijenta. *RASSF1A* pokazuje hipermetilaciju u gDNA iz tkiva SE u odnosu na predoperativne uzorke krvi i ejakulata. Dobivena srednja vrijednost metiliranosti svih analiziranih CpG dinukleotida u toj skupini iznosila je 6 uz SEM ±1,65. U predoperativnim uzorcima krvi pacijenata *RASSF1A* je bio hipometiliran sa srednjom vrijednosti 3 uz SEM ± 2.4, dok je u predoperativnim uzorcima ejakulata srednja

vrijednost metiliranosti svih analiziranih CpG dinukleotida iznosila 5 uz SEM ± 1.69. Statistička značajnost testirana je *Friedman*-ovim testom s *Dunn*-ovim testom više usporedbi pri čemu statistički značajna razlika nije uočena. Rezultati su prikazani *dot-plot* prikazom (Slika 28).

Odnos između metilacije promotorske regije *RASSF1A* u gDNA iz tkiva SE i cfDNA iz predoperativnih uzoraka krvi i ejakulata testiran je *Spearman*-ov testom. Dobivena je pozitivna korelaciju između metilacije *RASSF1A* u gDNA iz SE i preoperativnih uzoraka krvi kao i u odnosu metilacije *RASSF1A* u gDNA iz SE i predoperativnih uzoraka ejakulata pacijenata. Međutim, ni jedna ispitana korelacija nije detektirana kao statistički značajna. Dobiveni rezultati prikazani su matricom korelacija uz koju se nalazi skala kodirana bojom (plava boja predstavlja pozitivnu korelaciju, crvena negativnu korelaciju, a bijela odsustvo korelacije) (Slika 29).

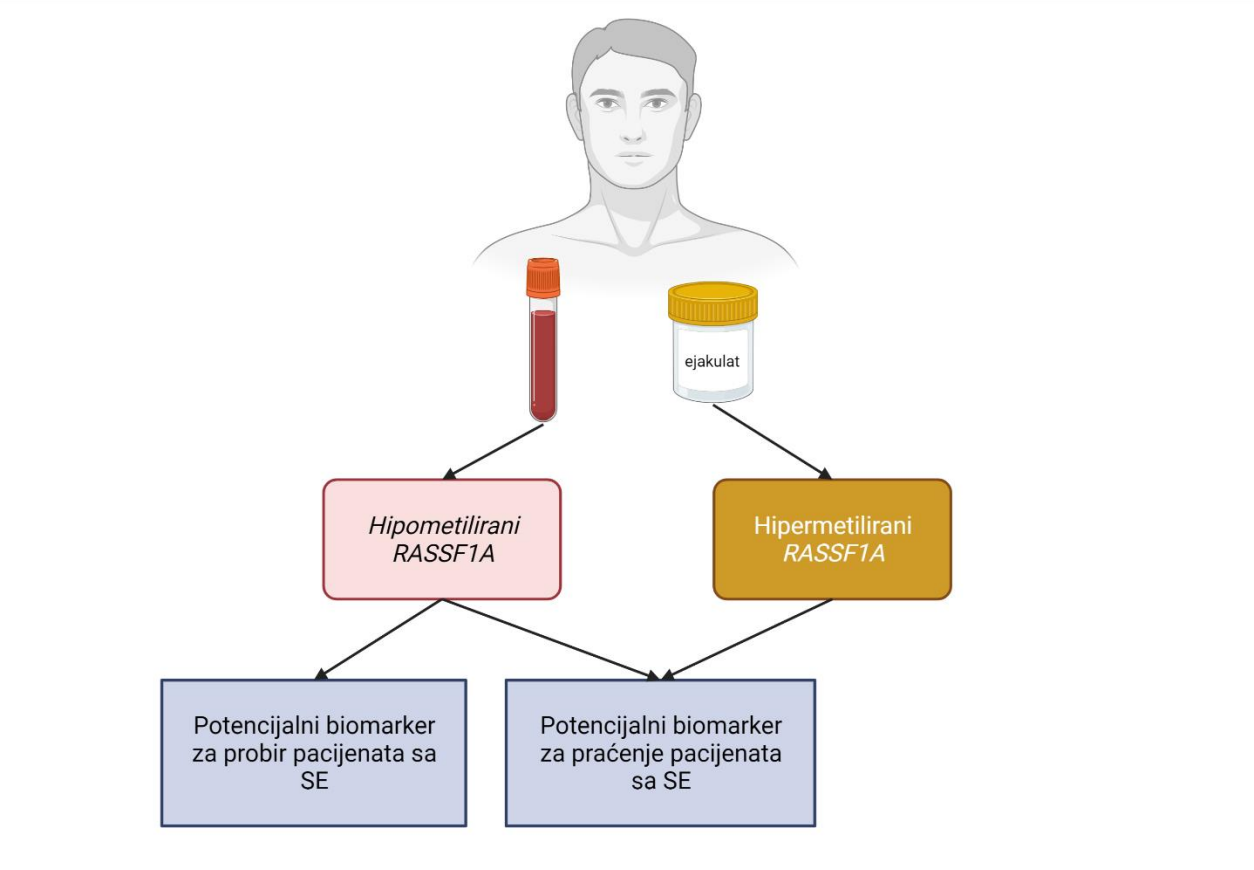


Slika 28. Status metilacije cfDNA promotorske regije *RASSF1A* u sparenim uzorcima tkiva seminoma i predoperativnim uzorcima krvi i ejakulata pacijenata.



Slika 29. Korelacija statusa metilacije *RASSF1A* u gDNA iz tkiva seminoma i u cfDNA iz predoperativnih uzoraka krvi i ejakulata pacijenata sa seminomom testisa. SE- tkivo seminoma, preop krv – predoperativni uzorci krvi, preop ejakulat – predoperativni uzorci ejakulata.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem o metilaciji *RASSF1A* u cfDNA iz krvi i ejakulata i njegovom potencijalu kao biomarker za SE testisa prikazani su na slici 30.



Slika 30. Potencijalni markeri s obzirom na metilaciju *RASSF1A* gena u tekućinskim biopsijama. Hipometilirani *RASSF1A* detektiran u cfDNA iz krvi ima potencijala kao biomarker za probir i praćenje pacijenata sa SE, dok hipermetilirani *RASSF1A* detektiran u cfDNA iz ejakulata može biti potencijalni biomarker samo za praćenje pacijenata sa SE. (Izrađeno s *BioRender.com*)

6. RASPRAVA

SE pripadaju u skupinu TGCT, skupinu najčešćih neoplastičnih bolesti koje pogađaju mladu mušku populaciju u reproduktivnoj dobi, između 15 i 45 godina života (151). Iako čine svega 1 % svih novootkrivenih neoplazmi, prema GLOBOCAN-u 2018., incidencija TT do 2040. godine povećat će se na 85 635 novih slučajeva godišnje u svijetu (11). Iznimno snažan porast incidencije već se bilježi i u Republici Hrvatskoj (152). Smrtnost je niska i stabilna u većini visoko razvijenih zemalja. Stopa izlječivosti TT je iznad 95 % zbog napretka u strategijama liječenja i kirurškim tehnikama. Ipak, neke populacije poput Hrvatske, doživljavaju porast mortaliteta (153). Nadalje, TT, uključujući i SE, imaju izniman učinak na demografski i društveno-ekonomski razvoj pogođenog stanovništva (154). SE čine oko 55 % svih TGCT-a i javljaju se kod pacijenata prosječne dobi od 35 godina (155). SE imaju visoku stopu izlječenja već nakon same orhidektomije, međutim kod 15-20 % pacijenata može doći do razvoja metastatske bolesti. Identifikacija pacijenata s visokim rizikom od metastatske bolesti nakon orhidektomije još uvijek nije moguća. Radioterapija i kemoterapija smanjuju rizik od recidiva s 15 % na 4 %. Međutim one se danas više ne provode rutinski jer je cilj očuvati visoke stope liječenja sa što manje nuspojava (156).

Kod pacijenata kod kojih je uočena patologija testisa, u rutinskom dijagnostičkom protokolu za TT ne postoji pouzdana metoda za razlikovanje SE od drugih neoplastičnih ili ne-neoplastičnih bolesti (118,120). Ova činjenica upozorava na neophodnost razvoja novih dijagnostičkih metoda i protokola. Naime, usprkos napretku biomedicinskog znanja i vezane tehnologije, precizna dijagnoza SE moguća je isključivo morfološkom i imunohistokemijskom analizom tkiva. Zbog toga, nakon otkrivanja patologije testisa, pacijenta se upućuje na liječenje koje počinje hitnom orhidektomijom. Navedeno predstavlja zlatni standard iako u tom trenutku definitivna dijagnoza SE nije potvrđena (119). Valja napomenuti da je orhidektomija invazivan i bolan kirurški zahvat koji sa sobom donosi određene rizike za samog pacijenta, pored snažnog učinka zahvata na psihičko stanje pacijenta.

U dijagnostici TGCT-a koriste se rutinski serumski biomarkeri, na temelju kojih se donosi definitivna dijagnoza TGCT-a i određuje stadij tumora, ali njihov ograničavajući čimbenik su

osjetljivost i specifičnost, pogotovo u slučaju SE (157). Na temelju dosadašnjih istraživanja opravdano je pretpostaviti da bi epigenetički biomarkeri mogli pokazati značajno višu osjetljivost i specifičnost, a tekućinske biopsije predstavljati neinvazivan i lako izvediv postupak (70). Time bi se učinio značajan napredak primarno u dijagnostici SE, a posljedično i u liječenju pacijenata. Krv (serum i plazma) je najistraživanija tjelesna tekućina odnosno tekućinska biopsija u kontekstu izvora tumorskih biomarkera poput cfDNA (158). Ipak, samo je nekoliko studija usredotočeno na SE (159,160). U slučaju sjemene plazme, prema našim saznanjima, ne postoji niti jedno izvješće o metilaciji cfDNA kao potencijalnom biomarkeru SE.

Kod mnogih različitih malignih oboljenja, otkriveno je da je gen supresor tumora *RASSF1A* jedan je od najčešće epigenetički inaktiviranih gena. U tumorima dojke, pluća i gastrointestinalnog trakta, upravo je metilacija DNA gena *RASSF1A* detaljno istražena u kontekstu kliničkog biomarkera (161). Kod tumora prostate, metilacija DNA gena *RASSF1A* već služi kao dijagnostički biomarker kao dio panela *GSTP1/APC/RASSF1A* (162). Kod SE također je opisana poremećena metilacija DNA gena *RASSF1A* u tkivu tumora (163). Sukladno, postoje literaturni navodi istraživanja metilacije gDNA gena *RASSF1A* u SE (164,165). Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi odražava li se obrazac metilacije gDNA *RASSF1A* gena iz tkiva SE u cfDNA iz krvi i ejakulata, te ima li status metilacije cfDNA gena *RASSF1A* potencijal kao SE biomarker.

6.1. Odnos ekspresije gena *RASSF1A* na proteinskoj razini i metilacije gDNA u SE

U svrhu istraživanja međusobnog odnosa, u ovoj disertaciji istražena je ekspresija na proteinskoj razini gena *RASSF1A* u tkivu SE, koja je zatim uspoređena s rezultatima statusa metilacije gDNA njegove promotorske regije u istom tkivu.

Analizom metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u SE i OT, uočeno je da je *RASSF1A* u SE statistički značajno hipometiliran u odnosu na OT (164,166). Naoko kontradiktorno, u studijama koje su istraživale TGCT kao cjelinu uočeno je pak da je *RASSF1A* hipermetiliran (165,167). Sličan nalaz hipermetilacije gDNA objavljen je i kod ostalih tumora te je opisano epigenetičko utišavanje gena *RASSF1A* (161). Međutim, kada su TGCT bili raščlanjeni na

komponente te je metilacija gDNA gena *RASSF1A* istražena u svakoj komponenti zasebno, detektirano je da je *RASSF1A* u SE upravo hipometiliran (164,168). Navedeni nalaz je potpuno u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Iz navedenog proizlazi koliko je važno u istraživanjima potencijalnih biomarkera SE odvojiti i zasebno istražiti svaku komponentu TGCT-a kako bi se jasno i nedvosmisleno identificirao specifičan status metilacije gDNA pojedinog gena, a ovdje gena *RASSF1A*. Jedino takvi eksperimentalni dizajni mogu osigurati da metilacijski obrazac gDNA jednog tipa TGCT-a ne bi prekrio metiliacijski obrazac drugog tipa TGCT-a, u ovom slučaju SE. Eksperimentalni dizajn ovog istraživanja upravo poštuje navedenu neophodnost. Nadalje, detekcija hipometiliranog *RASSF1A* u SE sukladna je literaturnim navodima koji ističu da je za SE i GCNIS karakteristična globalna hipometilacija gDNA. Navedeno je i u skladu s hipotezom da SE proizlazi iz stanica GCNIS-a te zadržava proces brisanja metilacije gDNA i metilacijskih obrazaca karakterističnih za zametne stanice u normalnom razvoju (169,170).

Sukladno dobivenom rezultatu hipometilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A*, a na temelju hipoteze o epigenetičkom utišavanju, očekivala se povećana ekspresija gena *RASSF1A* na proteinskoj razini u SE u odnosu na OT. Epigenetičko utišavanje ukratko objašnjava pojavu smanjene ekspresije gena na proteinskoj razini zbog metilacije gDNA promotorske regije gena (171). Suprotno, u tkivu SE detektirano je statistički značajno smanjenje ekspresije gena *RASSF1A* na proteinskoj razini u odnosu na OT. Iako međusobno kontradiktorno, navedeno je u skladu s literaturnim navodima (172).

Daljnjom analizom korelacija između metilacije gDNA gena *RASSF1A* i njegove proteinske ekspresije u SE, dobivena je negativna korelacija. Iako ta negativna korelacija nije statistički značajna, pokazuje trend u skladu s hipotezom epigenetičkog stišavanja gena (173).

Zbirno, dobiveni rezultati stavljeni u kontekst dosadašnjih spoznaja upućuju na mogućnost da na inicijaciju i progresiju SE utječe interakcija epigenetičkih i genetičkih mehanizama na području promotorske regije gena *RASSF1A*. Doista, osim što dokazano dolazi do aberantne *RASSF1A* metilacije u SE, *RASSF1A* se nalazi u regiji za koju je karakterističan gubitak heterozigotnosti u tumorima. Znanstveno je opravdano pretpostaviti da je smanjena ekspresija gena *RASSF1A* na proteinskoj razini u SE posljedica interakcije njegove aberantne metilacije gDNA i gubitka

heterozigotnosti odnosno genetičkog incidenta (174). Također, otvorena je mogućnost da je navedeni fenomen posljedica drugih epigenetičkih mehanizama regulacije ekspresije gena poput posttranslacijskih histonskih modifikacija ili RNA interferencije (175).

6.2. Odraz metilacije gDNA iz tkiva SE na cfDNA

Kako bi se kasnije testirao potencijal korištenja analize metilacije cfDNA iz tekućinskih biopsija pacijenata sa SE, bilo je neophodno ispitati odražava li se uočena promjena metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u tkivu SE na status metilacije cfDNA promotorske regije istog gena u uzorcima krvi i ejakulata.

Statistička analiza rezultata ovog istraživanja pokazala je da postoji snažna pozitivna korelacija između statusa metilacije gDNA u tkivu SE i cfDNA predoperativnih uzoraka krvi pacijenata sa SE. Navedeno dokazuje da se SE specifična hipometilacija gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* uspijeva održati detektabilnom u analizi cfDNA krvi pacijenata, usprkos „kontaminaciji" sa cfDNA zdravog tkiva.

Razlog pada intenziteta odraza promjene gDNA u cfDNA, može se tumačiti činjenicom da se analizom gDNA iz tkiva tumora dobivaju podaci o metilaciji gDNA gena *RASSF1A* isključivo iz stanica SE, dok se analizom cfDNA dobivaju vrijednosti metilacije cfDNA gena *RASSF1A* iz svih tkiva pacijenta koja su u kontaktu s krvi. Dakle, i iz SE ali i iz zdravih stanica iz cijelog tijela (176). Količina tumorske cfDNA u krvnoj plazmi ovisi o uznapredovalosti bolesti gdje veća koncentracija cfDNA u krvnoj plazmi odražava veći volumen tumora (177). SE je volumski relativno mali tumor u odnosu s primjerice tumorima jetre i pluća. Stoga je znanstveno opravdano objašnjavati ovaj pad intenziteta odraza metilacije gDNA u cfDNA upravo nedovoljnom količinom cfDNA tumorskog podrijetla u odnosu na cfDNA iz zdravih tkiva (177).

U slučaju karcinoma debelog crijeva, dojke, gušterače i jetre otkriveno je da se u krv otpuštaju veće količine cfDNA, dok su gliom te tumori štitnjače, bubrega i prostate povezani s najmanjom količinom cfDNA u krvnoj plazmi. Ove se razlike povezuju s prisutnosti krvno-moždane barijere kod glioma odnosno organskih kapsula kod karcinoma štitnjače, prostate i bubrega. Ove

vezivnotkivne barijere ograničavaju oslobađanje cfDNA tumora u krvotok (178). U slučaju SE, postoji krv-testis barijera koja bi mogla biti odgovorna za ograničavanje difuzije cfDNA stanica SE u krv (179). Opisano također može biti uzrok smanjenog odraza intenziteta promjene metilacije cfDNA u krvi u odnosu na promjene na gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u tkivu SE.

Analiza na podacima dobivenima na ejakulatu također pokazuje pozitivnu korelaciju između statusa metilacije gDNA u tkivu SE i cfDNA predoperativnih uzoraka ejakulata pacijenata sa SE. Međutim, intenzitet korelacije je slab te je odraz SE specifične hipometilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u cfDNA ejakulata pacijenata teško detektabilan.

Daljnja statistička analiza pokazala je iznenađujuću pozitivnu korelaciju između metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz krvi u odnosu na ejakulat istih pacijenata sa SE. Dakle, u istih pacijenata je uočeno da što je hipometilacija u cfDNA iz krvi bila snažnija i bolje odražavala status metilacije gDNA u tkivu SE, to je u ejakulatu bila zabilježena snažnija hipermetilacija cfDNA gena *RASSF1A.* Koliko je nama poznato, ovaj fenomen nije zabilježen u literaturi te svakako zavrjeđuje daljnje istraživanje.

Iz svega navedenog, može se opravdano zaključiti da metilacija cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz krvi odražava SE specifičnu hipometilaciju gDNA istog gena u tkivu tumora (180). Stoga krv možemo opravdano smatrati potencijalnim izvorom epigenetičkih biomarkera SE barem u kontekstu gena *RASSF1A. CfDNA* iz ejakulata odražava također SE specifičnu tkivnu hipometilaciju gDNA, ali znatno slabije i u neskladu s podacima dobivenima na krvi.

6.3. Metilacija cfDNA kao biomarker za probir pacijenata

U svrhu određivanja potencijala metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz tekućinskih biopsija kao biomarkera za probir pacijenata sa SE, analizirana je metilacija cfDNA iz preoperativnih uzoraka pacijenata sa SE te ZD, i to iz krvi i ejakulata.

Rezultati jasno ukazuju na hipometilaciju cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u predoperativnim uzorcima krvi pacijenata u odnosu na ZD iako razlika nije statistički značajna.

Navedeno potvrđuje da se promjene metilacije gDNA specifične za SE uistinu odražavaju u cfDNA iz krvi pacijenata, ali se intenzitet detektabilne promjene smanjuje. Pretragom dostupne literature, pronašli smo samo jedno objavljeno istraživanje koje analizira cfDNA u krvi pacijenata sa SE. Ellinger i sur. također opisuju hipometilaciju *RASSF1A* u većini uzoraka cfDNA iz krvi pacijenata sa SE u odnosu na zdrave dobrovoljce (181).

Što se tiče analize uzoraka ejakulata, koliko je nama poznato ovo je prvo istraživanje koje koristi ejakulat kao biološki izvor cfDNA u kontekstu istraživanja metilacije cfDNA kao biomarkera SE. Analiza dobivenih rezultata ukazuje na nisku razinu detektirane metilacije cfDNA iz ejakulata i kod pacijenata sa SE i kod ZD. Ipak, uočen je statistički neznačajan trend hipermetiliranosti cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u ejakulatu pacijenata sa SE u odnosu na ZD. Ovaj nalaz nema statističku vrijednost i može se zaključiti da nema razlike u detektiranom statusu metilacije cfDNA gena *RASSF1A* između pacijenata sa SE i ZD. Ipak, ovaj rezultat jasno ukazuje da hipometilacija gDNA tkiva SE ne uspijeva ostati detektabilna u cfDNA iz ejakulata već biva u potpunosti zasjenjena frakcijama cfDNA zdravog tkiva. Zbog nedostatka sličnih istraživanja u dostupnoj literaturi, uočeni fenomen se ne može dalje nedvosmisleno tumačiti. Ostaje samo zaključiti da sukladno našem istraživanju, ejakulat ne predstavlja dobar izvor biomarkera za probir SE pacijenata pomoću biomarkera metilacije cfDNA gena *RASSF1A*.

6.4. Metilacija cfDNA kao biomarker za praćenje pacijenata

S ciljem utvrđivanja potencijala metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz tekućinskih biopsija kao biomarkera za praćenje pacijenata sa SE nakon operacije, analizirani su predoperativni i postoperativni uzorci krvi i ejakulata pacijenata sa SE.

Uočeno je da je gen *RASSF1A* hipometiliran u predoperativnim uzorcima krvi u usporedbi s postoperativnim uzorcima nakon orhidektomije. U predoperativnim uzorcima ejakulata *RASSF1A* je bio hipermetiliran u usporedbi s postoperativnima. Iako zabilježena hipometilacija cfDNA gena *RASSF1A* u predoperativnim uzorcima krvi i hipermetilacija u predoperativnim uzorcima ejakulata

nije statistički značajna, jasno je vidljiv trend povratka metilacije cfDNA gena *RASSF1A* nakon orhidektomije na razine ZD.

Uistinu, podaci ukazuju da se vrijednosti metilacije cfDNA gena *RASSF1A* iz postoperacijskih uzoraka krvi i ejakulata pacijenata sa SE slične ili gotovo identične vrijednostima metilacije cfDNA u uzorcima ZD. Ovi rezultati jasno upućuju da je detektirana razina metilacije cfDNA gena *RASSF1A* u krvi i ejakulatu direktno ovisna o SE prisutnom u tkivu testisa, te da se nakon orhidektomije vrijednosti metilacije cfDNA iz krvi i ejakulata pacijenata vraćaju na razine opće populacije. Zaključno, iz dobivenih rezultata slijedi da metilacija cfDNA gena *RASSF1A* iz krvi i ejakulata ima potencijal kao biomarker za praćenje uspješnosti operativnog zahvata kod pacijenata sa SE odnosno postoperativno praćenje pacijenata.

6.5. Analiza metilacije DNA na razini svakog pojedinog CpG-a

Metilacija cfDNA gena *RASSF1A* svakog pojedinog CpG-a ciljane promotorske regije analizirana je kako bi se otkrilo postoji li određeni CpG dinukleotid ili kombinacija više njih koji pokazuju veću statističku značajnost od cjelokupne analizirane promotorske regije. U analiziranoj sekvenci nalazi se 9 CpG dinukleotida.

U tkivu SE su svi CpG dinukleotidi analizirane promotorske sekvence gena *RASSF1A* pokazali hipometilaciju gDNA u odnosu na okolno tkivo što je u skladu s dobivenim rezultatima prosječne metilacije gDNA promotora *RASSF1A* gena, ali i s prijašnjim istraživanjima (164).

U predoperativnim uzorcima krvi na CpG dinukleotidima 1, 4, 5, 6 i 9 uočena je hipermetilacija u odnosu na uzorke ZD. Dobiveni rezultati u skladu su s Markulin i sur. (165) gdje je također detektirana hipermetilacija na tim istim pozicijama, iako je istraživanje bilo provedeno na leukocitima iz periferne krvi, a ne na cfDNA. Hipermetilacija cfDNA pojedinih, a ne svih CpG dinukleotida u skladu je s hipotezom da dolazi do lokalne hipermetilacije gena supresora tumora u SE kako bi se inhibirala njihova ekspresija (182). *RASSF1A* je gen supresor tumora i podložan opisanom fenomenu. Ipak, lokalna hipermetilacija pojedinih CpG dinukleotida promotorske regije ne mora biti regulacijski važna i ne mora dovesti do promjene ekspresije gena na proteinskoj razini.

To potvrđuje i nalaz da su u tkivu SE svi analizirani CpG dinukleotidi pokazali hipometilaciju gDNA. Sabrano, opravdano je pretpostaviti da je zabilježena lokalna hipermetilacija cfDNA pojedinih analiziranih CpG dinukleotida u krvi posljedica „kontaminacije“ sa cfDNA podrijetlom iz ne-SE tkiva pacijenta.

U uzorcima ejakulata, u predoperativnim uzorcima pacijenata detektiran je hipermetilacijski trend na svim CpG-ovima što je u skladu i s prosječnom metilacijom *RASSF1A*. Stoga je analiza pojedinih CpG dinukleotida u skladu s nalazom prosječne metiliranosti cfDNA gena *RASSF1A* te nisu uočene razlike ili odstupanja od vrijednosti prosječne metilacije cfDNA analizirane promotorske regije.

Ovim istraživanjem dobiveni su vrijedni rezultati u kontekstu potencijalnih epigenetičkih biomarkera za SE. Ipak, dobivene rezultate potrebno je ciljano testirati i verificirati na većem broju uključenih pacijenata. Također, neophodno je istražiti potencijal metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u krvi i ejakulatu pacijenata s neseminomom testisa te dobivene rezultate komparirati s rezultatima dobivenima u ovom istraživanju. Naime TGCT su histološki vrlo heterogena skupina te usporedba podataka pacijenata sa SE i NS otkrila bi razlikuje li metilacija cfDNA gena *RASSF1A* iz krvi ili ejakulata međusobno različite tipove TGCT.

Većina istraživanja u kojima je metilacija DNA istražena u kontekstu biomarkera pokazale su da panel gena ima bolju dijagnostičku učinkovitost u odnosu na samo jedan gen. Doista, kada je metilacija DNA gena *RASSF1A* uključena u panel s ostalim genima, dijagnostička učinkovitost kod tumora pluća bila je puno veća nego kada se diskriminiralo samo na temelju metilacije *RASSF1A* (162). Kod TSZT-a također je uočeno da se analizom metilacije gDNA panela *HOXA9/RASSF1A* u tkivu SE osjetljivost testa diskriminacije SE od neseminoma podigla na 90.1% a specifičnost na 81.6% (164). Ovi navodi jasno ukazuju na povećanje statističke snage kombiniranjem podataka metilacije DNA gena *RASSF1A* s podacima metilacije DNA drugih gena. Sukladno tomu, u budućim istraživanjima epigenetičkih biomarkera SE u tekućinskim biopsijama snažno se preporuča uključivanje ovdje analiziranog gena *RASSF1A* u širi panel gena.

7. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata možemo izvući sljedeće zaključke:

1. Ekspresija gena *RASSF1A* na proteinskoj razini niža je u tkivu seminoma nego što je u okolnom tkivu.
2. U tkivu seminoma, gen *RASSF1A* je hipometiliran baš kao i u predoperativnim uzorcima krvi pacijenata u odnosu na okolno tkivo odnosno zdrave dobrovoljce. Korelacija metiliranosti *RASSF1A* u tkivu seminoma i cfDNA u predoperativnim uzorcima krvi bila je pozitivna. Prema tome metilacija gDNA gena *RASSF1A* u tkivu seminoma odražena je u cfDNA iz predoperativnih uzoraka krvi pacijenata. Iz toga slijedi da metilacija cfDNA *RASSF1A* u predoperativnoj krvi ima potencijal kao biomarker za probir pacijenata sa seminomom.
3. *RASSF1A* je u uzorcima predoperativnog ejakulata bio hipermetiliran, upravo suprotno od njegovog metilacijskog statusa u tkivu seminoma. Nadalje pozitivna, ali statistički ne značajna korelacija između metilacije gDNA *RASSF1A* u tkivu seminoma i cfDNA iz ejakulata upućuje na zaključak da ejakulat nije pogodna tekućinska biopsija za probir pacijenata sa seminomom.
4. Status metilacije cfDNA *RASSF1A* iz postoperativnih uzoraka krvi i ejakulata bio je jednak metilacijskom statusu zdravih dobrovoljaca. Iz toga slijedi da je metilacija cfDNA *RASSF1A* gena ovisna o prisutstvu seminoma u tkivu testisa te da metilacija cfDNA gena *RASSF1A* iz krvi i ejakulata ima potencijal kao biomarker za postoperativno praćenje pacijenata.
5. Status prosječne metilacije DNA gena *RASSF1A* ima veću statističku vrijednost za seminome od obrasca metiliranosti analizirane regije promotora po pojedinom CpG dinukleotidu.

8. SAŽETAK

Seminomi (SE) su tumori testisa koji pogađaju mladu mušku populaciju. Dijagnoza i liječenje SE predstavljaju invazivne postupake. Serumski biomarkeri koriste se u dijagnostici SE, međutim imaju ograničenu specifičnost i osjetljivost. Slobodni nestanični DNA (cfDNA) iz tjelesnih tekućina predstavlja neinvazivni postupak za probir i praćenje SE pacijenata. Cilj rada je utvrditi metilaciju cfDNA gena *RASSF1A* u krvi i ejakulatu bolesnika sa SE te njezin potencijal kao biomarkera. Pirosekvenciranjem, istražili smo metilacijski obrazac gena supresor tumora *RASSF1A* u cfDNA iz krvi i ejakulata pacijenata sa SE jer je njegova aberantna metilacija već uočena kod genomskoga DNA (gDNA) iz SE tkiva. *RASSF1A* u gDNA iz SE bio je statistički značajno hipometiliran u odnosu na okolno tkivo. Hipometilirani *RASSF1A* detektiran je i u predoperativnim uzorcima krvi što znači da je metilacija *RASSF1A* iz gDNA tumora odražena u cfDNA iz krvi. Međutim, u predoperativnim uzorcima ejakulata *RASSF1A* je bio hipermetiliran. Iz toga slijedi da krv predstavlja bolji izvor SE biomarkera od ejakulata. Analizom metilacije svakog pojedinom CpG dinukleotida zaključeno je da status prosječne metilacije *RASSF1A* ima veću statističku značajnost od metilacije *RASSF1A* na pojedinim CpG dinukleotidima. Ovim istraživanjem dobiveni su vrijedni rezultati u kontekstu tekućinskih biopsija kao izvora za probir i praćenje SE pacijenata.

9. SUMMARY

METHYLATION OF CELL-FREE DNA OF THE *RASSF1A* GENE IN BLOOD AND SEMEN AS AN EPIGENETIC BIOMARKER IN PATIENTS WITH TESTICULAR SEMINOMA, DORA RAOS, 2021.

Seminoma (SE) is the most frequent type of testicular tumour, affecting predominantly young men. Diagnosis and treatment of SE represent invasive procedures. In SE diagnostics, serum biomarkers represent a valuable tool. However, they have limited specificity and sensitivity. Cell-free DNA (cfDNA) from liquid biopsies represents a non-invasive procedure for SE screening and monitoring. The aim of this study was to determine the methylation of gene *RASSF1A* in cfDNA from blood and ejaculate of SE patients, as well as its potential as an SE biomarker. By pyrosequencing, we investigated the methylation of the *RASSF1A* tumor suppressor gene in cfDNA from the blood and ejaculate of SE patients, as well as in gDNA from SE tissue. *RASSF1A* in gDNA from SE was significantly hypomethylated regarding surrounding tissue. Hypomethylated *RASSF1A* was also detected in preoperative blood samples, while in preoperative ejaculate samples *RASSF1A* was hypermethylated. Analysis of the methylation of each CpG dinucleotide concluded that the status of the average methylation of *RASSF1A* has a higher statistical significance than the methylation of *RASSF1A* of individual CpG dinucleotides. This research yielded valuable results in the context of liquid biopsies as a source for screening and monitoring SE patients.

10. POPIS LITERATURE

1. Prader A. Testicular size: assessment and clinical importance. Triangle. 1966;7(6):240–3.
2. Tischler PV. Diameter of testicles. N Engl J Med. 1971;285(26):1489.
3. Utiger R. Testis [Internet]. Encyclopedia Britanica. 2018. Available from: https://www.britannica.com/science/testis
4. Maddocks S, Setchell PB. The physiology of the endocrine testis. Oxf Rev Reprod Biol. 1988;(10):53-123.
5. Vasković J. Testes [Internet]. Kenhub. 2021. Available from: https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-testes
6. Nishimura H, L'Hernault SW. Spermatogenesis. Curr Biol. 2017;27(18):R988–94.
7. Gilbert SF. Developmental Biology [Internet]. 6th editio. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9983/
8. Sharma R. Agarwal A. Spermatogenesis: An Overview, Springer New York, NY; 2011. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-6857-9_2
9. Stephenson A, Eggener SE, Bass EB, Chelnick DM, Daneshmand S, Feldman D i sur. Diagnosis and treatment of early stage testicular cancer: AUA guideline. J Urol. 2019;202(2):272–81.
10. Laguna MP, Albers P, Algaba F, Bokemeyer C, Boormans JL, Fischer S i sur. EAU Guidelines on Testicular Cancer 2020. Eur Assoc Urol Guidel 2020 Ed [Internet]. 2020;presented. Available from: http://uroweb.org/guideline/testicular-cancer/ LK - Testicular Cancer Uroweb%7Chttp://uroweb.org/guideline/testicular-cancer/%7C FG - 0
11. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394–424.
12. Moul JW, Schanne FJ, Thompson IM, Frazier HA, Peretsman SA, Wettlaufer JN i sur. Testicular cancer in blacks. A multicenter experience. Cancer. 1994;73(2):388–93.
13. Tinke JEE, Dohle GR, Looijenga LHJ. Etiology and early pathogenesis of malignant testicular germ cell tumors : towards possibilities for preinvasive diagnosis. 2015;(December 2014):381–93.
14. Lortet-tieulent AZJ, Bray F. International testicular cancer incidence trends : generational transitions in 38 countries 1900 – 1990. 2015;151–8.
15. Sincic N, Kulis T, Znaor A, Bray F. Time trends in testicular cancer in Croatia 1983-2007: Rapid increases in incidence, no declines in mortality. Cancer Epidemiol [Internet]. 2012;36(1):11–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2011.09.010
16. Le Cornet C, Lortet-Tieulent J, Forman D, Béranger R, Flechon A, Fervers B i sur. Testicular cancer incidence to rise by 25% by 2025 in Europe? Model-based predictions in 40 countries using population-based registry data. Eur J Cancer. 2014;50(4):831–9.
17. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Jemal A, Bray F. International variations and trends in testicular cancer incidence and mortality. Eur Urol [Internet]. 2014;65(6):1095–106. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2013.11.004
18. Bray F, Richiardi L, Ekbom A, Pukkala E, Cuninkova M, Møller H. Trends in testicular

cancer incidence and mortality in 22 European countries: Continuing increases in incidence and declines in mortality. Int J Cancer. 2006;118(12):3099–111.
19. Dearnaley DP, Huddart RA, Horwich A. Regular review: Managing testicular cancer. Br Med J. 2001;322(7302):1583–8.
20. Ondrusova M, Balogova S, Lehotska V, Kajo K, Mrinakova B, Ondrus D. Controversies in the management of clinical stage i testicular seminoma. Cent Eur J Urol. 2016;69(1):35–9.
21. Moul JW. Timely Diagnosis of Testicular Cancer. Urol Clin North Am. 2007;34(2):109–17.
22. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A i sur. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209–49.
23. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. Eur Urol [Internet]. 2016;70(1):93–105. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029
24. Cheng L, Albers P, Berney DM, Feldman DR, Daugaard G, & TG i sur. Testicular cancer. Nat Rev Dis Prim. 2018;
25. McGlynn KA, Rajpert-De Meyts E, Stang A. Testicular cancer. Schottenfeld Fraumeni Cancer Epidemiol Prev Fourth Ed [Internet]. 2017;1019–28. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41572-018-0029-0
26. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. Nat Rev Cancer. 2005;5(3):210–22.
27. Joensen UN, Jorgensen N, Skakkebæk N. Testicular dysgenesis syndrome and carcinoma in situ of the testes. Nat Clin Pract Urol. 2007;4(8):402–3.
28. Virtanen HE, Rajpert-De Meyts E, Main KM, Skakkebaek NE, Toppari J. Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders. Toxicol Appl Pharmacol. 2005;207(2 SUPPL.):501–5.
29. Lee PA, Houk CP. Cryptorchidism. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2013;20(3):210–6.
30. Reynard J, Brewster S, Biers S. Oxford Handbook of Urology (3 edn) [Internet]. 4th ed. Oxford Medicine Online; 2013. 526–527 p. Available from: https://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199696130.001.0001/med-9780199696130
31. van der Horst HJR, de Wall LL. Hypospadias, all there is to know. Eur J Pediatr. 2017;176(4):435–41.
32. Dong C, Hemminki K. Modification of cancer risks in offspring by sibling and parental cancers from 2,112,616 nuclear families. Int J Cancer. 2001;92(1):144–50.
33. Hemminki K, Li X. Familial risk in testicular cancer as a clue to a heritable and environmental aetiology. Br J Cancer. 2004;90(9):1765–70.
34. Khan O, Protheroe A. Testis cancer. Postgrad Med J. 2007;83(984):624–32.
35. Richiardi L, Pettersson A, Akre O. Genetic and environmental risk factors for testicular cancer. Int J Androl. 2007;30(4):230–41.
36. Reuter VE. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. Mod Pathol. 2005;18:51–60.
37. Hill PWS, Leitch HG, Requena CE, Zhiyi S, Amouroux R, Roman-Trufero M i sur.

Epigenetic reprogramming enables the primordial germ cell-to-gonocyte transition Europe PMC Funders Group. Nature [Internet]. 2018;555(7696):392–6. Available from: http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms
38. Koopman P. Sry and Sox9: Mammalian testis-determining genes. Cell Mol Life Sci. 1999;55(6–7):839–56.
39. Rajpert-De Meyts E, Hanstein R, Jørgensen N, Græm N, Vogt PH, Skakkebæk NE. Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. Hum Reprod. 2004;19(6):1338–44.
40. Honecker F, Stoop H, de Krijger RR, Lau YFC, Bokemeyer C, Looijenga LHJ. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. J Pathol. 2004;203(3):849–57.
41. de Jong J, Stoop H, Gillis AJM, van Gurp RJHLM, van de Geijn G-JM, de Boer M i sur. Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. J Pathol. 2008;
42. Tang WWC, Kobayashi T, Irie N, Dietmann S, Surani MA. Specification and epigenetic programming of the human germ line. Nat Rev Genet [Internet]. 2016;17(10):585–600. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.88
43. Jørgensen A, Lindhardt Johansen M, Juul A, Skakkebaek NE, Main KM, Rajpert-De Meyts E. Pathogenesis of germ cell neoplasia in testicular dysgenesis and disorders of sex development. Semin Cell Dev Biol [Internet]. 2015;45:124–37. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.013
44. Looijenga LHJ, Zafarana G, Grygalewicz B, Summersgill B, Debiec-Rychter M, Veltman J i sur. Role of gain of 12p in germ cell tumour development. Apmis. 2003;111(1):161–70.
45. Rodriguez S, Jafer O, Goker H, Summersgill BM, Zafarana G, Gillis AJM i sur. Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2–p12.1. 2003;(December 2002):1880–91.
46. Rapley EA, Turnbull C, Al Olama AA, Dermitzakis ET, Linger R, Huddart RA i sur. A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. Nat Genet [Internet]. 2009;41(7):807–10. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ng.394
47. Kanetsky PA, Mitra N, Vardhanabhuti S, Li M, David J, Letrero R i sur. Common variation in KITLG and at 5q31.3 proximate to SPRY4 predispose to testicular germ cell cancer Peter. Nat Genet. 2010;41(7):811–5.
48. Gilbert D, Rapley E, Shipley J. Testicular germ cell tumours: Predisposition genes and the male germ cell niche. Nat Rev Cancer [Internet]. 2011;11(4):278–88. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrc3021
49. Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. Int J Androl. 1994;17(2):85–92.
50. Batool A, Karimi N, Wu XN, Chen SR, Liu YX. Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2019;76(9):1713–27. Available from: https://doi.org/10.1007/s00018-019-03022-7
51. Chang Y, Wang X, Xu Y, Yang L, Qian Q, Ju S i sur. Comprehensive characterization of cancer-testis genes in testicular germ cell tumor. Cancer Med. 2019;8(7):3511–9.
52. Roskoski R. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase - The stem cell factor receptor. Biochem Biophys Res Commun. 2005;337(1):1–13.

53. Gupta M, Cheaib JG, Patel HD, Sharma R, Zhang A, Bass EB i sur. Diagnosis and Management of Intratubular Germ Cell Neoplasia In Situ: A Systematic Review. J Urol. 2020;204(1):33–41.
54. Germà-Lluch JR, Garcia del Muro X, Maroto P, Paz-Ares L, Arranz JA, Gumà J i sur. Clinical pattern and therapeutic results achieved in 1490 patients with germ-cell tumours of the testis: The experience of the Spanish Germ-Cell Cancer Group (GG). Eur Urol. 2002;42(6):553–63.
55. Mieritz MG, Christiansen P, Jensen MB, Joensen UN, Nordkap L, Olesen IA i sur. Gynaecomastia in 786 adult men: Clinical and biochemical findings. Eur J Endocrinol. 2017;176(5):555–66.
56. Laguna MP, Albers P, Algaba F, Bokemeyer C, Boormans JL, Fischer S i sur. EAU Guidelines on testicular cancer. European Association of Urology, 2020. 2020; Available from: https://uroweb.org/guideline/testicular-cancer/
57. Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Toppari J. Testicular Cancer Pathogenesis, Diagnosis and Endocrine Aspects [Internet]. 2018. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278992/
58. Laguna MP, Albers P, Algaba F, Bokemeyer C, Boormans JL, Fischer S FK, Gremmels H, Leão R, Nicol D, Nicolai N, Oldenburg J TT. EAU Guidelines on testicular cancer. European Association of Urology, 2020. 2020;
59. Gamulin M, Bulimbasic S, Jazvic M, Knezevic N, Gnjidic M, Boraska Jelavic T i sur. Smjernice za dijagnosticiranje, liječenje i praćenje bolesnika s rakom testisa. Liječnički Vjesn [Internet]. 2019;141(11–12):343–51. Available from: https://lijecnicki-vjesnik.hlz.hr/pdf/11-12-2019/04_gamulin.pdf
60. Marshall C, Enzerra M, Rahnemai-Azar AA, Ramaiya NH. Serum tumor markers and testicular germ cell tumors: a primer for radiologists. Abdom Radiol [Internet]. 2019;44(3):1083–90. Available from: https://doi.org/10.1007/s00261-018-1846-z
61. Bergstrand CG, Czar B. Demonstration of a new Protein Fraction. 1956;1956.
62. Gitlin D, Boesman M. Serum a-Fetoprotein , Albumin , and y G-Globulin in the human conceptus. J Clin Invest. 1966;45(11):1826–38.
63. Gilligan TD, Seidenfeld J, Basch EM, Einhorn LH, Fancher T, Smith DC i sur. American society of clinical oncology clinical practice guideline on uses of serum tumor markers in adult males with germ cell tumors. J Clin Oncol. 2010;28(20):3388–404.
64. Talerman A, Haije WG, Baggerman L. Serum alphafetoprotein (AFP) in patients with germ cell tumors of the gonads and extragonadal sites: Correlation between endodermal sinus (yolk sac) tumor and raised serum AFP. Cancer. 1980;46(2):380–5.
65. Jacobsen GK, Jacobsen M. Alpha-fetoprotein (AFP) and human chorionic gonadotropin (HCG) in testicular germ cell tumours. A prospective immunohistochemical study. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand - Sect A Pathol. 1983;91(3):165–76.
66. Waldmann TA, McIntire KR. The use of a radioimmunoassay for α-fetoprotein in the diagnosis of malignancy. Cancer. 1974;1510–5.
67. Masopust J, Kithier K, Rádl J, Koutecký J, Kotál L. Occurrence of fetoprotein in patients with neoplasms and non-neoplastic diseases. Int J Cancer. 1968;3(3):364–73.
68. Zondek B. Versuch einer biologischen (Hormonalen) diagnostik beim malignen hodentumor [German]. Chirug. 1930;1072–80.

69. Barlow LMJ, Badalato GM, McKiernan JM. Serum tumor markers in the evaluation of male germ cell tumors. Nat Rev Urol [Internet]. 2010;7(11):610–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2010.166
70. Ehrlich Y, Beck SDW, Foster RS, Bihrle R, Einhorn LH. Serum tumor markers in testicular cancer. Urol Oncol Semin Orig Investig. 2013;31(1):17–23.
71. Stenman UH, Alfthan H, Ranta T, Vartiainen E, Jalkanen J, Seppala M. Serum levels of human chorionic gonadotropin in nonpregnant women and men are modulated by gonadotropin-releasing hormone and sex steroids. J Clin Endocrinol Metab. 1987;64(4):730–6.
72. Catalona WJ, Vaitukaitis JL, Fair WR. Falsely positive specific human chorionic gonadotropin assays in patients with testicular tumors: Conversion to negative with testosterone administration. J Urol [Internet]. 1979;122(1):126–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(17)56283-7
73. Braunstein GD, Thompson R, Gross S, Soares JR. Marijuana use does not spuriously elevate serum human chorionic gonadotropin levels. Urology. 1985;25(6):605–6.
74. Canal P, Villeneuve G, Bugat R, Armand JP, Soula G. Plasma lactate dehydrogenase and its isoenzymes in nonseminomatous germ cell tumors of the testis. Pathol Biol [Internet]. 1984;32(4):245–50. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6201806/
75. Markert CL. Lactate Dehydrogenase Isozymes: Dissociation and Recombination of Subunits. Science (80-) [Internet]. 1963;140(3573):1329–30. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17802174/
76. Javadpour N. Multiple biochemical tumor markers in seminoma. A double-blind study. Cancer. 1983;52(5):887–9.
77. Nielsen OS, Munro AJ, Duncan W, Sturgeon J, Gospodarowicz MK, Jewett MAS i sur. Is placental alkaline phosphatase (PLAP) a useful marker for seminoma? Eur J Cancer Clin Oncol. 1990;26(10):1049–54.
78. Dieckmann KP, Simonsen-Richter H, Kulejewski M, Anheuser P, Zecha H, Isbarn H i sur. Serum Tumour Markers in Testicular Germ Cell Tumours: Frequencies of Elevated Levels and Extents of Marker Elevation Are Significantly Associated with Clinical Parameters and with Response to Treatment. Biomed Res Int. 2019;2019.
79. Mir MC, Pavan N, Gonzalgo ML. Current Clinical Applications of Testicular Cancer Biomarkers. Urol Clin North Am [Internet]. 2016;43(1):119–25. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ucl.2015.08.011
80. Patel HD, Gupta M, Cheaib JG, Sharma R, Zhang A, Bass EB i sur. Testis-sparing surgery and scrotal violation for testicular masses suspicious for malignancy: A systematic review and meta-analysis. Urol Oncol Semin Orig Investig. 2020;38(5):344–53.
81. Fossa SD, Horwich A, Russell JM, Roberts JT, Cullen MH, Hodson NJ, Jones WG i sur. Optimal planning target volume for stage I testicular seminoma: A medical research council randomized trial. J Clin Oncol. 1999;17(4):1146–54.
82. https://www.cancer.net/cancer-types/testicular-cancer/stages.
83. Aarthy R, Mani S, Velusami S, Sundarsingh S, Rajkumar T. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. Mol Diagnosis Ther. 2015;19(6):339–50.
84. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. Cancer Biol Ther. 2019;20(8):1057–67.

85. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nat Rev Clin Oncol [Internet]. 2017;14(9):531–48. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14
86. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer [Internet]. 2011;11(6):426–37. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrc3066
87. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. Cancer Metastasis Rev [Internet]. 2016;35(3):347–76. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s10555-016-9629-x
88. Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, Michal M i sur. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. PLoS One. 2014;9(3).
89. O'Connell GC, Petrone AB, Tennant CS, Lucke-Wold N, Kabbani Y, Tarabishy AR i sur. Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation. Brain Inj [Internet]. 2017;31(10):1369–75. Available from: https://doi.org/10.1080/02699052.2017.1312018
90. Celec P, Vlková B, Lauková L, Bábíčková J, Boor P. Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases. Expert Rev Mol Med. 2018;20:1–14.
91. Stephan F, Marsman G, Bakker LM, Bulder I, Stavenuiter F, Aarden LA i sur. Cooperation of factor vii-activating protease and serum dnase i in the release of nucleosomes from necrotic cells. Arthritis Rheumatol. 2014;66(3):686–93.
92. Yu SCY, Lee SWY, Jiang P, Leung TY, Chan KCA, Chiu RWK i sur. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. Clin Chem. 2013;59(8):1228–37.
93. Butler TM, Spellman PT, Gray J. Circulating-tumor DNA as an early detection and diagnostic tool. Curr Opin Genet Dev [Internet]. 2017;42:14–21. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2016.12.003
94. Du Clos TW, Volzer MA, Hahn FF, Xiao R, Mold C, Searles RP. Chromatin clearance in C57B1/10 mice: Interaction with heparan sulphate proteoglycans and receptors on Kupffer cells. Clin Exp Immunol. 1999;117(2):403–11.
95. Papadopoulou E, Davilas E, Sotiriou V, Georgakopoulos E, Georgakopoulou S, Koliopanos A i sur. Cell-free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate and breast cancer. Ann N Y Acad Sci. 2006;1075:235–43.
96. Chen Y, Guo W, Fan J, Chen Y, Zhang X, Chen X i sur. The applications of liquid biopsy in resistance surveillance of anaplastic lymphoma kinase inhibitor. Cancer Manag Res. 2017;9:801–11.
97. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology [Internet]. 2013;38(1):23–38. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.112
98. Sinčić N, Herceg Z. DNA methylation and cancer: Ghosts and angels above the genes. Curr Opin Oncol. 2011;23(1):69–76.
99. Choi JK. Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome. Genome Biol [Internet]. 2010;11:R70. Available from: http://genomebiology.com/content/pdf/gb-2010-11-7-r70.pdf

100. Argadal OG, Mutlu M, Aksoy SA, Kocaeli H, Tunca B, Civan MN i sur. Long noncoding rna malat1 may be a prognostic biomarker in idh1/2 wild-type primary glioblastomas. Bosn J Basic Med Sci. 2020;20(1):63–9.
101. Goto K, Numata M, Komura JI, Ono T, Bestor TH, Kondo H. Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. Differentiation. 1994;56(1–2):39–44.
102. Feng J, Chang H, Li E, Fan G. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. J Neurosci Res. 2005;79(6):734–46.
103. Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y i sur. DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity-Dependent Bdnf Gene Regulation. Science (80-). 2003;302(5646):890–3.
104. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. Nucleic Acids Res. 1980;8(7):1499–504.
105. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr ARW, James KD, Turner DJ i sur. Orphan CpG Islands Identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. PLoS Genet. 2010;6(9).
106. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Sivachenko A, Zhang X i sur. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells Alexander. Nature [Internet]. 2010;454(7205):766–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600261%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2896277
107. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. Nat Genet. 2000;24(1):88–91.
108. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. Nucleic Acids Res. 2003;31(9):2305–12.
109. Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Zhao Y, Zhao Y, Robertson KD. DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. Biochem Biophys Res Commun. 2004;318(2):544–55.
110. Choi JD, Underkoffler LA, Wood AJ, Collins JN, Williams PT, Golden JA i sur. A Novel Variant of Inpp5f Is Imprinted in Brain, and Its Expression Is Correlated with Differential Methylation of an Internal CpG Island . Mol Cell Biol. 2005;25(13):5514–22.
111. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M i sur. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. Nat Genet. 2007;39(4):457–66.
112. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8(9):1–35.
113. Naylor S. Biomarkers: Current perspectives and future prospects. Expert Rev Mol Diagn. 2003;3(5):525–9.
114. Ogino S, Lochhead P, Chan AT, Nishihara R, Cho E, Wolpin BM, i sur. Molecular Pathological Epidemiology of Epigenetics: Emerging Integrative Science to Analyze Environment, Host, and Disease pivotal roles of pathologists in the new integrated MPE science towards our ultimate goal of personalized medicine and prevention. Vol. 26214, Mod Pathol. 2013. 465–484 p.
115. Mayeux R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. NeuroRx. 2004;1(2):182–8.

116. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Curr Opin HIV AIDS. 2010;5(6):463–6.
117. Ehrlich M. DNA methylation and cancer-associated genetic instability. Adv Exp Med Biol. 2005;570:363–92.
118. Rocher L, Criton A, Gennisson JL, Creze M, Albiges L, Ferlicot S i sur. Characterization of Testicular Masses in Adults: Performance of Combined Quantitative Shear Wave Elastography and Conventional Ultrasound. Ultrasound Med Biol. 2019;45(3):720–31.
119. Isidori AM, Pozza C, Gianfrilli D, Giannetta E, Lemma A, Pofi R i sur. Differential diagnosis of nonpalpable testicular lesions: Qualitative and quantitative contrast-enhanced US of benign and malignant testicular tumors. Radiology. 2014;273(2):606–18.
120. Pedersen MR, Sloth Osther PJ, Nissen HD, Vedsted P, Møller H, Rafaelsen SR. Elastography and diffusion-weighted MRI in patients with testicular microlithiasis, normal testicular tissue, and testicular cancer: an observational study. Acta radiol. 2019;60(4):535–41.
121. Mader S, Pantel K. Liquid biopsy: Current status and future perspectives. Oncol Res Treat. 2017;40(7–8):404–8.
122. Dahl AA, Mykletun A, Fosså SD. Quality of life in survivors of testicular cancer. Urol Oncol Semin Orig Investig. 2005;23(3):193–200.
123. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CKY, Nuciforo P i sur. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: A proof-of-principle. Ann Oncol. 2014;25(9):1729–35.
124. Schwarz AK, Stanulla M, Cario G, Flohr T, Sutton R, Möricke A i sur. Quantification of free total plasma DNA and minimal residual disease detection in the plasma of children with acute lymphoblastic leukemia. Ann Hematol. 2009;88(9):897–905.
125. Mikeska T, Craig JM. DNA methylation biomarkers: Cancer and beyond. Genes (Basel). 2014;5(3):821–64.
126. Li YW, Kong FM, Zhou JP, Dong M. Aberrant promoter methylation of the vimentin gene may contribute to colorectal carcinogenesis: A meta-analysis. Tumor Biol. 2014;35(7):6783–90.
127. Payne SR. From discovery to the clinic: The novel DNA methylation biomarker mSEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. Epigenomics. 2010;2(4):575–85.
128. Dietrich D, Hasinger O, Liebenberg V, Field JK, Kristiansen G, Soltermann A. DNA Methylation of the Homeobox Genes PITX2 Cancer Patients. 2012;21(2):93–104.
129. Wu T, Giovannucci E, Welge J, Mallick P, Tang WY, Ho SM. Measurement of GSTP1 promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: A meta-analysis. Br J Cancer. 2011;105(1):65–73.
130. Chen Y, Li J, Yu X, Li S, Zhang X, Mo Z i sur. APC gene hypermethylation and prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. Eur J Hum Genet [Internet]. 2013;21(9):929–35. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2012.281
131. Wick W, Weller M, Van Den Bent M, Sanson M, Weiler M, Von Deimling A i sur. MGMT testing - The challenges for biomarker-based glioma treatment. Nat Rev Neurol [Internet]. 2014;10(7):372–85. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.100
132. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2017;14(9):531–48.
133. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. J Clin Oncol.

2014;32(6):579–86.
134. Szilágyi M, Pös O, Márton É, Buglyó G, Soltész B, Keserű J i sur. Circulating cell-free nucleic acids: Main characteristics and clinical application. Int J Mol Sci. 2020;21(18):1–20.
135. Barceló M, Mata A, Bassas L, Larriba S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. Hum Reprod. 2018;33(6):1087–98.
136. Green EA, Li R, Albiges L, Choueiri TK, Freedman M, Pal S i sur. Clinical Utility of Cell-free and Circulating Tumor DNA in Kidney and Bladder Cancer: A Critical Review of Current Literature. Eur Urol Oncol [Internet]. 2021;1–11. Available from: https://doi.org/10.1016/j.euo.2021.04.005
137. Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. J Cell Sci. 2007;120(18):3163–72.
138. Dubois F, Bergot E, Levallet G. Cancer and RASSF1A/RASSF1C, the Two Faces of Janus. Trends in Cancer. 2019;5(11):662–5.
139. Matallanas D, Romano D, Al-Mulla F, O'Neill E, Al-Ali W, Crespo P i sur. Mutant K-Ras Activation of the Proapoptotic MST2 Pathway Is Antagonized by Wild-Type K-Ras. Mol Cell [Internet]. 2011;44(6):893–906. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.016
140. Dubois F, Bergot E, Zalcman G, Levallet G. RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis—an updated review. Cell Death Dis [Internet]. 2019;10(12). Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-2169-x
141. Raos D, Ulamec M, Katusic Bojanac A, Bulic-Jakus F, Jezek D, Sincic N. Epigenetically inactivated RASSF1A as a tumor biomarker. Bosn J Basic Med Sci. 2020;(x):1–12.
142. Zeke A, Lukács M, Lim WA, Reményi A. Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. Trends Cell Biol. 2009;19(8):364–74.
143. Good MC, Zalatan JG, Lim WA. Scaffold proteins: Hubs for controlling the flow of cellular information. Science (80-). 2011;332(6030):680–6.
144. Ferrell JE. What do scaffold proteins really do? Sci STKE. 2000;2000(52):1–4.
145. Honorio S, Agathanggelou A, Wernert N, Rothe M, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. Oncogene. 2003;22(3):461–6.
146. García-Gutiérrez L, McKenna S, Kolch W, Matallanas D. RASSF1A tumour suppressor: Target the network for effective cancer therapy. Cancers (Basel). 2020;12(1):1–22.
147. Rajabi H, Hata T, Li W, Long MD, Hu Q, Liu S i sur. MUC1-C represses the RASSF1A tumor suppressor in human carcinoma cells. Oncogene [Internet]. 2019;38(47):7266–77. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41388-019-0940-1
148. Malpeli G, Innamorati G, Decimo I, Bencivenga M, Kamdje AHN, Perris R i sur. Methylation dynamics of RASSF1A and its impact on cancer. Cancers (Basel). 2019;11(7):1–18.
149. Talukdar FR, Abramović I, Cuenin C, Carreira C. A protocol for good quality genomic DNA isolation from formalin-fixed paraffin-embedded tissues without using commercial kits. 2021;

150. Vaissière T, Cuenin C, Paliwal A, Vineis P, Hainaut P, Herceg Z i sur. Quantitative analysis of DNA methylation after whole bisulfitome amplification of a minute amount of DNA from body fluids. Epigenetics. 2009;4(4):221–30.
151. Lobo J, Gillis AJM, Jerónimo C, Henrique R, Looijenga LHJ. Human germ cell tumors are developmental cancers: Impact of epigenetics on pathobiology and clinic. Int J Mol Sci. 2019;20(2):1–28.
152. Sincic N, Kulis T, Znaor A, Bray F. Time trends in testicular cancer in Croatia 1983 – 2007 : Rapid increases in incidence, no declines in mortality. Cancer Epidemiol [Internet]. 2012;36(1):11–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2011.09.010
153. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International testicular cancer incidence trends: generational transitions in 38 countries 1900–1990. Cancer Causes Control. 2015;26(1):151–8.
154. Richardson LC, Neri AJ, Tai E, Glenn JD. Testicular cancer: A narrative review of the role of socioeconomic position from risk to survivorship. Urol Oncol Semin Orig Investig [Internet]. 2012;30(1):95–101. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.09.010
155. Woldu SL, Amatruda JF, Bagrodia A, Testicular Germ Cell Tumor Genomics. Curr Opin Urol. 2017;27(1):41–7.
156. Leão R, Ahmad AE, Hamilton RJ. Testicular Cancer Biomarkers: A Role for Precision Medicine in Testicular Cancer. Clin Genitourin Cancer [Internet]. 2019;17(1):e176–83. Available from: https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.10.007
157. Ehrlich Y, Beck SDW, Foster RS, Bihrle R, Einhorn LH. Serum tumor markers in testicular cancer. Urol Oncol Semin Orig Investig [Internet]. 2013;31(1):17–23. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2010.04.007
158. Marrugo-Ramírez J, Mir M, Samitier J. Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy. Int J Mol Sci. 2018;19(10):1–21.
159. Ellinger J, Albers P, Perabo FG, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG Island Hypermethylation of Cell-Free Circulating Serum DNA in Patients With Testicular Cancer. J Urol [Internet]. 2009;182(1):324–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2009.02.106
160. Kawakami T, Okamoto K, Ogawa O, Okada Y. XIST unmethylated DNA fragments in male-derived plasma as a tumour marker for testicular cancer. Lancet. 2004;363(9402):40–2.
161. Grawenda AM, O'Neill E. Clinical utility of RASSF1A methylation in human malignancies. Br J Cancer. 2015;113(3):372–81.
162. 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;11(1):1–18.
163. Lind GE, Skotheim RI, Lothe RA. The epigenome of testicular germ cell tumors. Apmis. 2007;115(10):1147–60.
164. Costa AL, Moreira-Barbosa C, Lobo J, Vilela-Salgueiro B, Cantante M, Guimarães R i sur. DNA methylation profiling as a tool for testicular germ cell tumors subtyping. Epigenomics. 2018;10(12):1511–23.
165. Markulin D, Vojta A, Samaržija I, Gamulin M, Bečeheli I, Jukić I i sur. Association between

RASSF1A promoter methylation and testicular germ cell tumor: A meta-analysis and a cohort study. Cancer Genomics and Proteomics. 2017;14(5):363–72.
166. Costa AL, Lobo J, Jerónimo C, Henrique R. The epigenetics of testicular germ cell tumors: Looking for novel disease biomarkers. Epigenomics. 2017;9(2):155–69.
167. Ahmad F, Surve P, Natarajan S, Patil A, Pol S, Patole K i sur. Aberrant epigenetic inactivation of RASSF1A and MGMT gene and genetic mutations of KRAS, cKIT and BRAF in Indian testicular germ cell tumours. Cancer Genet. 2020;241(xxxx):42–50.
168. Honorio S, Agathanggelou A, Wernert N, Rothe M, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. 2003;461–6.
169. Netto GJ, Nakai Y, Nakayama M, Jadallah S, Toubaji A, Nonomura N i sur. Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors. Mod Pathol. 2008;21(11):1337–44.
170. Smiraglia DJ, Szymanska J, Kraggerud SM, Lothe RA, Plass C. Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors. Oncogene. 2002;
171. Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. J Clin Invest. 2000;105(4):401–7.
172. Raos D, Krasic J, Masic S, Abramovic I, Coric M, Kruslin B i sur. In Search of TGCT Biomarkers: A Comprehensive in Silico and Histopathological Analysis. Dis Markers. 2020;2020.
173. Nephew KP, Huang THM. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. Cancer Lett. 2003;190(2):125–33.
174. Chen YJ, Tang Q Bin, Zou SQ. Inactivation of RASSF1A, the tumor suppresor gene at 3p21.3 in extrahepatic cholangiocarcinoma. World J Gastroenterol. 2005;11(9):1333–8.
175. Lu Y, Chan YT, Tan HY, Li S, Wang N, Feng Y. Epigenetic regulation in human cancer: The potential role of epi-drug in cancer therapy. Mol Cancer. 2020;19(1):1–16.
176. Gai W, Sun K. Epigenetic biomarkers in cell-free DNA and applications in liquid biopsy. Genes (Basel). 2019;10(1).
177. Ponti G, Maccaferri M, Micali S, Manfredini M, Milandri R, Bianchi G i sur. Seminal cell free DNA concentration levels discriminate between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Anticancer Res. 2018;38(9):5121–5.
178. Corbetta M, Chiereghin C, De Simone I, Soldà G, Zuradelli M, Giunta M i sur. Post-Biopsy Cell-Free DNA From Blood: An Open Window on Primary Prostate Cancer Genetics and Biology. Front Oncol. 2021;11(May):1–10.
179. Bart J, Groen HJM, Van Der Graaf WTA, Hollema H, Hendrikse NH, Vaalburg W i sur. An oncological view on the blood-testis barrier. Lancet Oncol. 2002;3(6):357–63.
180. Warton K, Samimi G. Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer. Front Mol Biosci. 2015;2(APR):1–10.
181. Ellinger J, Albers P, Perabo FG, Müller SC, Ruecker ABPJ, CpG Island Hypermethylation of Cell-Free Circulating Serum DNA in Patients With Testicular Cancer. J Urol. 2009;182(1):324–9.
182. la Rosa AH De, Manoharan M, Goolam AS. Current Concepts of Epigenetics in Testicular Cancer. Indian J Surg Oncol. 2017;8(2):169–74.

11. ŽIVOTOPIS

Dora Raos rođena je 07. rujna 1993. u Zagrebu. Pohađala je II gimnaziju u Zagrebu nakon koje je upisala preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno matematičkom fakultetu u Zagrebu. Nakon uspješno završenog preddiplomskog studija, upisala je diplomski studij Eksperimentalne Biologije, usmjerenje Fiziologija i imunobiologija koji sam uspješno završila 2018. godine. Iste godine zaposlila se na Medicinskom fakultetu u Zagrebu u suradničkom zvanju, na radnom mjestu asistenta za rad na HRZZ projektu „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Davora Ježeka. Pod mentorstvom prof. dr. sc. Ježeka i izv. prof. dr. sc. Sinčića aktivno sudjeluje u znanstvenom radu kao doktorand na znanstveno-istraživačkom projektu HRZZ-a „Epigenetički biomarkeri u krvi i ejakulatu bolesnika sa seminomom testisa“ i znanstvenom radu Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U okviru navedenog HRZZ projekta i Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu autor je niza znanstvenih publikacija u indeksiranim časopisima te sažetaka predstavljenih na nacionalnim i međunarodnim kongresima i sudjelovala je na mnogobrojnim nacionalnim i međunarodnim edukacijama.