

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

АНИТА ОГНЯНОВА ЦВЕТКОВА

МОЛЕКУЛНО-ГЕНЕТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ И
КЛИНИКО-ХИСТОЛОГИЧНИ ДАННИ ПРИ БЪЛГАРСКИ
ПАЦИЕНТИ С ПРОСТАТЕН КАРЦИНОМ И ДРУГИ
ПАТОЛОГИИ НА ПРОСТАТАТА

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР”

Професионално направление

4.3.

Биологически науки

Научна специалност: „Молекулярна биология”

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

Чл. Кор. Проф. Д-р Ваньо Митев, дм, дбн

Доц. Албена Тодорова, дб

София, 2015

Дисертационният труд съдържа 108 страници, 35 фигури и 22 таблици.

Цитирани са 105 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита

от Катедра по Медицинска Химия и Биохимия,

Медицински Университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

Катедра по Медицинска Химия и Биохимия,

Медицински Университет – София;

Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника”, София

Работата по дисертационния труд е финансирана частично

от Съвета за медицинска наука

на Медицински Университет – София

(Договор № 26-Д ; №17-Д).

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

GS- Gleason score

DEPC- Diethylpyrocarbonate

MS-PCR- Methylation specific Polymerase chain reaction

NCBI- National Center for Biotechnology Information

PCR- Polymerase Chain Reaction

RT-PCR – Reverse Polymerase chain reaction

siRNAs – Small interfering Ribonucleic acids

SNPs- Single Nucleotide Polymorphisms

TNM- Tumor Node Metastases

АПТ- Андроген потискаща терапия

ДНК- Дезоксирибонуклеинова киселина

ДПХ- Доброкачествена простатна хиперплазия

ДРИ- Дигитално ректално изследване

ЕДТА- Етилен диамин тетраацетат

КРПК- Кастрация резистентен простатен карцином

ПИА -Простатни интраепителни атрофични лезии

ПИН-Простатни интраепителни неопластични лезии

ПК – Простатен карцином

ПСА - Простатно-специфичен антиген

РНК- Рибонуклеинова киселина

СЗО- Световна здравна организация

ТКБ- тру-кът биопсия

ЦНС- Централна нервна система

СЪДЪРЖАНИЕ

Стр.

РЕЗЮМЕ.....	1
SUMMARY.....	2
ВЪВЕДЕНИЕ.....	3
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	5
1.1. Честота и разпространение на ПК	5
1.1.2 Произход	5
1.2. Диагностициране на ПК.....	6
1.2.1. ПСА.....	6
1.2.2. Морфохистологична диагностика.....	8
1.3. Молекулни характеристики на ПК.....	13
1.3.1. Differential display code 3 (<i>DD3/PCA3</i>).....	16
1.3.2. <i>TMPRSS2-ERG</i> фузионни транскрипти.....	19
1.3.3. <i>GSTP1</i>	21
1.3.4. <i>IVS1 -27:G/A</i> полиморфен вариант в <i>KLF6</i> гена.....	26
1.3.5. <i>AR</i>	30
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	35
2.1. ЦЕЛ	35
2.2. ЗАДАЧИ	35
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	36
3.1. МАТЕРИАЛИ	36
3.1.1. Клиничен материал	36
3.1.2. Биологичен материал	37
3.2. МЕТОДИ	38
3.2.1. Преданалитична обработка на материала.....	38
3.2.1.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв и уринни седименти....	38
3.2.1.2. Изолиране на високомолекулна ДНК от тъканни проби по фенол- хлороформен метод.....	38
3.2.1.3. Колектиране и предварителна обработка на уринни проби с цел последващо изолиране на РНК от уринен седимент.....	39

3.2.1.4. Изолиране на високомолекулна РНК от уринни седминети и венозна кръв чрез използването на тризол (TriPure Isolation reagent, Life Techonogies).....	40
3.2.1. 5. Изолиране на високомолекулна РНК от тъканни проби.....	41
3.2.1. 6. Бисулфитно конвертиране на ДНК.....	42
3.2.2. Аналитична обработка на материала.....	43
3.2.2.1. Протокол за провеждане на обратна транскрипция.....	43
3.2.2.2. Полимеразна Верижна Реакция (ПВР; Polymerase Chain Reaction; PCR) . Протокол за намножаване на специфични, използвани в дисертационният труд генни региони. Дизайн на праймери.....	44
3.2.2.3. Електрофореза в агарозен гел.....	53
3.2.2.4. Фрагментен анализ в полиакриламиден гел.....	53
3.2.2.5. Електрофореза за фрагментен анализ на денатуриращ полиакриламиден гел на ALFexpress автоматичен секвенатор.....	54
3.2.2.6. Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди. Принцип на метода на Sanger.....	56
3.2.2.7. Секвениране на получените специфични фрагменти в настоящата разработка: <i>GSTP1</i> неметилиран (непатологичен) алел и метилиран (патологичен) алел, <i>T2-ERG</i> фузии, <i>AR</i> екзони, <i>KLF6</i> -таргетна секвенция).....	57
3.2.2.8. Real time PCR - метод за количествен анализ.....	58
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	62
4.1. Клинични групи, включени в проучването.....	62
4.1.1. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-биологична методика за оценка на експресионните нива на тумор-специфичния маркер <i>PCA3</i>	62
4.1.2. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-биологична техника за анализ на <i>T2-ERG</i> фузионните транскрипти.....	67
4.1.3. Оптимизиране на методика за анализ на промоторно хиперметиране в <i>GSTP1</i> гена чрез специфична по отношение на метилирането амплификация (MS-PCR).....	69
4.1.4. Въвеждане и оптимизиране на методика за анализ на <i>IVS1 -27:G/A</i> полиморфизма в <i>KLF6</i> гена.....	73
4.1.5. Секвениране на <i>AR</i> гена (екзон 1-екзон 8).....	74

4.1.6. Приложение на разработените методи за изследване на тумор-специфичните маркери за диагностика и контрол на заболяването при български пациенти с ПК или други патологии на простатната жлеза: ДПХ и хронично възпалително заболяване (простатит).....	77
4.1.7. Извършване на сравнителен анализ на базата на получените молекулни профили и наблюдаваните клинични и хистологични характеристики при изследваните пациенти с ПК, ДПХ и простатит.....	86
4.1.8. Разработване на системен подход за молекулно-генетичен анализ при пациенти с ПК; интердисциплинарен подход за индивидуализирана терапия.....	91
4.1.8.1. Първична диагностика.....	93
4.1.8.2. При наличие на агресивен КРПК подтип карцином.....	93
4.1.8.3. При наличие на агресивен андроген-податлив подтип карцином.....	94
4.1.8.4. Интердисциплинарен подход за индивидуализирана терапия на ПК.....	94
4.1.9. Обобщение на получените резултати.....	95
5. ИЗВОДИ.....	96
6. БИБЛИОГРАФИЯ.....	97
7. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	106
8. ПРИНОСИ.....	108

РЕЗЮМЕ:

Простатният карцином (ПК) е една от най-широко разпространените неоплазми и преобладаваща причина за смърт при мъже в Света. Представява хетерогенно заболяване с поликлонален характер, което може да остане индолентно десетилетия или да бъде животозастрашаващо. Молекулните механизми, определящи клинично-патологичното поведение и прогресия на ПК остават все още слабо изяснени. Най-обещаващите генетични маркери с безспорна полза за молекулното профилиране на ПК са епигенетични отклонения, генни сливания и иРНК флуктуации.

В настоящата разработка проведохме комплексни молекулярно-генетични изследвания при 150 български пациента с диагнози: агресивен ПК (18), неагресивен ПК (83), ДПХ (25) и простатит (24) и интерпретирахме получените резултати в светлината на клинично-хистологичните аспекти на болестта. Почти всички пробанди с агресивно поведение на ПК, показаха наличие на *PCA3* свръхзавишени експресионни нива, *T2ex1-ERGex4* фузия и *GSTP1* промоторно хиперметиране. Беше установена асоциация между *TMPRSS2-ERG* позитивен фузионен статус и умерено до слабо-диференцирани простатни тумори, по-висок туморен стадий. Този маркер има отношение и към допълнителни клинично-патологични данни за животозастрашаващ ПК, като перинеурална и периваскуларна инфилтрация, клетъчен плеоморфизъм, андрогенна неподатливост, метастазиране и др. Наличието на ПК специфични молекулни маркери в кръвта се асоциира с неблагоприятна прогноза, като *T2-ERG* позитивни пробанди са предразположени към образуването на метастази. *GSTP1* промоторното хиперметиране бе определено, като най-ранната епигенетична мутация, индикираща преканцерозни и малигнени промени в простатата и най-дълго персистиращ епигенетичен маркер в кръвта.

Не бяха детектирани соматични мутации в *AR* гена. При 41 % от пробандите с ПК беше установен по-къс *AR* алел ($AR (CAG)n \leq 22$ /критична точка/), който се приема като рисков за развитие на ПК. Всички изследвани пациенти показаха нормален генотип по отношение на *IVS1-27G>A* полиморфизма.

Фокуса на настоящата разработка беше върху разработване на системен подход за молекулярно-генетична диагностика, профилиране и мониторинг на ПК при български пробанди. Стриктното мониториране на молекулния профил на пациенти с ПК по време на курса на лечение е от голяма полза за определяне на индивидуалния терапевтичен отговор.

SUMMARY

PCa is a common neoplasm and increasingly prevalent cause of cancer death among men. PCa is a heterogeneous disease that can be indolent for decades, or can be life-threatening. The molecular mechanisms underlying its clinicopathological behaviour and progression remain poorly understood. The most promising genetic markers with benefits in PCa molecular subtyping are epigenetic fluctuations, gene fusions and mRNA alterations.

The present study concerns molecular-genetic analyses of a total of 150 patients divided in four clinical groups: 18 aggressive PCa, 83 non-aggressive PCa, 25 BPH and 24 chronic inflammatory diseases. The results were considered simultaneously with the clinicohistological aspects of the disease. Almost all probands with aggressive PCa behaviour were found to be positive for *PCA3* overexpression, *T2ex1-ERGex4* fusion and *GSTP1* promoter hypermethylation. An association between *TMPRSS2-ERG* positive status and moderate to poorly differentiated prostate tumors, higher tumor stage was established. This molecular marker correlates with additional clinico-pathological findings for life-threatening PCa, as perineural and perivascular infiltration, androgen insensitivity, metastasis formation. The appearance of PCa specific markers into the blood is associated with unfavorable prognosis, as *T2-ERG* positive probands are more susceptible to metastasis formation.

Positive *GSTP1* promoter hypermethylation seems to be highly specific and the earliest epigenetic change in the prostate gland, which indicates the beginning of the pathological process. *GSTP1* promoter hypermethylation was considered as a long-lasting epigenetic marker detectable in the blood flow.

No somatic mutations were detected in the *AR* gene. In 41% of patients with PCa a shorter *AR* CAG repeat (e.g., ≤ 22 repeats) was detected, which was considered as a risk factor for PCa development. All studied patients showed normal *KLF6-IVS1-27G>A* genotype in respect to the *IVS1-27G>A* polymorphism.

The current study was focused on the optimization of an PCa diagnostic approach. It can be used for molecular-genetic diagnostics, molecular profiling and monitoring of the PCa in Bulgarian probands.

The molecular profile of prostate cancer needs to be strictly monitored during the course of disease treatment, which is of a great help in determination of the patient's individual therapy response.

ВЪВЕДЕНИЕ

ПК е една от най-широко разпространените неоплазми в Света, с най-застрашителни размери в Северна Америка и Европа. Заболяването е преобладаваща причина за мъжка смъртност в световен мащаб, след рака на белия дроб. Представлява изключително хетерогенна неоплазма, с поликлонален характер. Заболяването би могло да остане индолентно десетилетия наред в определени пробанди или да се развие прогресивно и животозастрашаващо с летален изход при други. Предиспозицията към ПК е комплексна и включва множество хромозомни локуси, съдържащи потенциални рискови варианти в гени с ниска самостоятелна пенетрантност. Вероятната генетична причина на заболяването се търси във фактори, участващи във финната регулация, а не в кодиращата последователност на гените.

Състоянието на проблема в България е изключително сериозно, като най-пресните прогрозни данни на Националния онкологичен център в България са за ~ 2783 новорегистрирани случая с ПК и 949 починали от същата диагноза през 2015г.

Съвременната конвенционална диагностика на ПК не позволява ефективно ранно откриване на заболяването или може да доведе до фалшиво положителен резултат вследствие от други състояния и заболявания. Рутинният алгоритъм, използван в клиничната практика не позволява своевременното разграничаване на индолентен от метастатичен андроген-рефрактерен ПК, което е от голямо значение за избор на адекватно лечение.

За преодоляване на тези сериозни ограничения са необходими допълнителни изследвания за разработване на нови молекулни маркери за диагностика и мониторинг с подходяща пригностична стойност. Най-обещаващите генетични маркери с безспорна полза за ранна диагностика и молекулно профилиране на ПК са епигенетични мутации, генни сливания, иРНК флукутации, промени в генната експресия. Част от тези генетични флукутации вече официално се препоръчват от СЗО и специализирани асоциации на научната онкологична общност, като доказано ефективни и необходими за изясняване на молекулните и характеристични особености на ПК.

На функционално ниво, описаните дефекти се извяват главно с нарушаване регулацията на апоптозните процеси в раковите клетки и стимулиране процеса на малигнизация.

Настоящият дисертационен труд е насочен към изследването на някои молекулно-генетични характеристики на ПК в комбинация с клинични и хистологични данни. Целта е доизясняване на индивидуалния профил на ПК при всеки пациент с помощта на панел от високоспецифични генетични маркери.

Ще направим опит за едновременна интерпретация на молекулни, клинични и хисопатологични аспекти на болестта, като начални стъпки към осъществяване на индивидуализирана медицина.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. Честота и разпространение на ПК

Карциномът на простатата е най-често срещаното онкологично заболяване при мъжете в почти всички развити страни и втората по честота причина за мъжка смъртност след рака на белия дроб в Света. Най-сериозен мащаб бележи разпространението на болестта в Европа, Северна и Южна Америка (над 30% при мъжете на 50 г. и 80% от мъжете на 80 г. имат молекулярно доказуем простатен карцином). В Европа всяка година се диагностицират приблизително 190-200 000 нови случая на рак на простатата, което го определя като глобален здравен проблем в наши дни. Ежегодно се регистрират над 50 000 смъртни случая от рак на простатата [1]. В България честотата на заболяването се е увеличила почти двойно през последните 15 години. На база последни епидемиологични проучвания на Националния онкологичен център в България бяха съобщени прогнозни данни за приблизително 2783 новорегистрирани случая с ПК и 949 починали от същата диагноза през 2015г [2]. Въпреки нарастващия брой новооткрити и регистрирани случаи, се забелязва тенденция за намаляване на смъртността, както в САЩ, така и в Европа - 3,8% през последните години. За съжаление, според база данни на Световната здравна организация (СЗО), именно България, Румъния и Русия правят изключение от всеобщата тенденция. По последни данни, смъртността от простатен карцином в България е 10.17/100 000 мъже.

1.1.2 Произход

Простатният карцином (ПК) произхожда предимно от ацинарния епител (ацинарен аденокарцином), като в (0.2-0.8%) се развива от епитела на каналите (дуктален аденокарцином), често комбиниран с ацинарна карциномна компонента [3-4].

В над 70% от случаите ПК се развива от периферната простатна зона, но приблизително при 85% се касае за мултифокален аденокарцином. Независимо от първоначалната локализация, авансиралите солидни туморни формации често ангажират и централните отдели на простатната жлеза.

Първоначалните микроскопски огнища на простатни туморни клетки преминават в оформени възли, разположени сред нормалните тъкани на простатната жлеза, които постепенно нарастват. В хода на развитие на тумора, той увеличава постепенно размерите

си и когато достигне критична маса обхваща капсулата на простатната жлеза. До момента, в който малигнизацията на жлезата не е засегнала простатната капсула се счита, че заболяването е в начален стадий. След обхващане на простатната капсула туморът се развива в две възможни направления - локално, около простатната жлеза с метастази по лимфен път към тазовите лимфни възли или по кръвен път, като метастазите засягат най-често костите и централната нервна система (ЦНС). Поради неслучайната локализация на метастазите при прогресията на заболяването е възможна появата на парализи.

Обикновено ПК протича безсимптоматично. Често новооткритите случаи са резултат от случаен профилактичен преглед, ректално туширане или повишени серумни нива на простатно-специфичен антиген (ПСА). Понякога ПК се разкрива в напреднал стадий с наличие на множествени метастази, вследствие на епизодични болки в костите или спонтанна костна фрактура.

1.2. Диагностициране на ПК

Растящата честота на нови случаи на ПК и повишената смъртност в България, провокира засилен интерес към ранна диагностика, изработване на адекватни критерии за качествен превантивен скрининг при мъже над 50 години и изясняване на патологичните механизми на болестта, чрез обединяване на данни от всички аспекти на заболяването: клиника, хистология, молекулярна биология.

1.2.1. ПСА

Съществен момент в процеса на ранна диагностика е уточняване ролята на простатно-специфичния антиген (PSA-ПСА), който се използва широко в клиничната практика след 1987г. за диагностика, стадиране и контрол на лечението на ПК. ПСА представлява каликреин подобна протеаза, отделяща се от епителните клетки на простатната жлезна тъкан. Тези особености правят ПСА, органоспецифичен, но неспецифичен, когато се касае за неопластичен процес. Въпреки тъканната си специфичност е установено, че ПСА се открива и в други тъкани: неоплазми на слюнчени жлези, тератоми на яйчници, периуретрални жлези (при мъже и жени), 70% от туморите на гърда, като значителна експресия се наблюдава само при ПК и карцином на гърда.

Нивата на ПСА се увеличават и при други простатни смущения – простатит, доброкачествена хиперплазия (ДПХ), съдови оклузии в простатната тъкан, медицински прегледи и манипулации засягащи простатната област и др. С цел повишаване специфичността на маркера и възможностите за скринингово приложение, корелации със злокачественост, оценка на преживяемост, са разработени схеми за определяне на различните форми на ПСА и тяхното съотношение. Това безспорно повишава клиничната значимост на маркера и възможността за диференциална диагноза на ПК и ДПХ, както препоръчва в докладите си и Американската урологична асоциация [5].

Свободната форма на ПСА представлява ~ 10% от нивото на серумния антиген, а свързаната форма с алфа1-антихимотрипсин ~ 90%. При ПК се повишава свързаната форма и намаляват нивата на свободната форма при общо повишени стойности на маркера. Поради тази причина показателят съотношение на свободен и общ ПСА е най-често прилаган в клиничната практика за диференциална диагноза. Използва се за оценка на риска от развитие на ПК при мъже с негативни находки от дигитално ректално изследване (ДРИ) с ниво на ПСА 4-10 ng/ml в т.нар. сива зона.

Практиката показва, че ПСА маркерът не позволява достоверно да се предскаже патоморфологичния стадий на болестта. Доказателство за липсата на пряка корелация между клиничен стадий и нивата на ПСА в кръвта е фактът, че се отделя също в доброкачествени простатни епителни клетки. Затова, като изпитан алгоритъм в клиничната практика се е наложило използването на комбинацията от показателите: ПСА-ниво, оценка по Gleason при биопсия и клиничен T-стадий. Комбинираният подход дава по-добри резултати при прогнозиране на патологичен pT стадий, отколкото всеки от параметрите, разгледан по-отделно [5]. За оценка на риска от прогресия и смъртност от ПК в съвременната медицинска практика се препоръчва също тримесечно проследяване на показателите скорост на нарастване (PSAv) и време на удвояване (PSA dt) на ПСА [6-7]. Серумни PSA-нива в излишък спрямо общоприетия лимит за горна граница 4,0 ng/ml (понастоящем 3,0 ng/ml за някои държави) са намерени в 8-13% от мъжете без наличие на ДПХ или забележимо ПС, както и в повече от 30% от мъжете, имащи ДПХ, но нямащи видим, детектируем простатен карцином при дълъг период на проследяване. Подобни данни са публикувани от проучвания в различни популации [8], което засилва мненията за противоречивата значимост на ПСА скрининга в някои случаи на рак на простатата.

В съвременния подход за диагностика на ПК, наред с изследване на вариациите на ПСА маркера, след положителни ДРИ и ехографски находки, се пристъпва към провеждане на биопсия и последващ анализ.

1.2.2. Морфохистологична диагностика

Морфохистологичната диагностика на ПК се базира на изследване на биопсични материали от трансуретрална резекция, тру-кът биопсия (ТКБ), радикална простатектомия (РП) с дисекция на асоциираните лимфни възли. Съвременната диагностика се базира предимно на трансректална иглена биопсия, осигуряваща клетъчен материал от различните отдели на простатната жлеза и приблизително определяне на последващото клинично поведение. Всеки хистологично доказан ПК случай, подлежи на определяне на хистологичния вариант, оценка по Gleason, както и стадиране по TNM. При наличие на преканцерозни жлезни изменения, като атипична пролиферация, интраепителна неоплазия, хиперпластични или атрофични промени, минимален микроинвазивен карцином, се налага допълнителна верификация на нормални или туморни епителни клетки и жлезни структури чрез методите на имунохистохимията.

Хистологичните варианти на ПК се обединяват в 2 главни групи с няколко подтипа. Някои от субгрупите представляват твърде рядко срещани разновидности на малигненост на простатата, дори с недоуточнена хистогенеза и наименование. В таблица 1 са изброени основните хистологични типове ПК.

Таблица 1. Хистологични подтипове ПК, според техният произход , патоморфологични и хистологични особености.

Аденокарцином от периферните канали и ацини.	
<p>1). Пенестоклетъчен аденокарцином (foamy-gland) – Основно се оценява с ниски степени по Gleason (2-6), но често показва агресивен биологичен ход.</p>	<p>2). Аденокарцином с атрофични белези (атрофичен вариант) – Наподобява ДПХ, (3+3=6) по Gleason.</p>
<p>3). Псевдохиперпластичен аденокарцином – Характеристични белези са големи ядра, нуклеоли, митози, интралуминални кристалоиди и много често ПИН находки. (3+3=6) по Gleason.</p>	<p>4). Онкоцитен вариант (рядък) - Големи туморни клетки с гранулирани и еозинофилин цитоплазми и големи, овални хиперхромни ядра.</p>
<p>5). Лимфоепителиома-подобен карцином – Нискодиференциран вариант с изразена лимфоцитарна инфилтрация.</p>	<p>6). Саркоматоиден вариант (карциносарком) (рядък) – С все още неуточнена хистогенеза и крайно наименование, с жлезна компонента и малигнена пролиферация на вретеновидни клетки. Не се оценява по Gleason.</p>
<p>7). Муцинозен (колоиден) и пръстеновидноклетъчен (вакуолен) карцином (изключително рядък) - Трудно различим от други подобни карциноми с различна органна локализация, изисква прецизна диференциална диагноза с инфилтрация от съседно разположени органи. Оценка по Gleason 5.</p>	
Аденокарцином от големите („първични“) канали.	

<p>1). Дуктален аденокарцином - По-агресивен от ацинарните карциноми и обикновено се открива в авансирал стадий. Препоръчителна оценка по Gleason 4, при наличие на некротични находки 5.</p>	<p>2). Първичен уротелен (преходноклетъчен) карцином. Под 2% от ПК.</p>
<p>Други хистологични вариации.</p>	
<p>1). Невроендокринни тумори – Често косъществуват с обикновени ацинарни карциноми, смесен тип.</p>	<p>2). Плоскоклетъчен карцином – Диагностицира се само при абсолютна липса на жлезна компонента, което го отграничава от алтернативната диагноза аденосквамозен карцином. Възможна грешка в патологичната интерпретация се провокира от голямото сходство на този субтип с огнища на плоскоклетъчна метаплазия в зоните на инфаркти или след хормонална терапия.</p>
<p>3). Аденоид-кистичен базалноклетъчен карцином – Морфологично подобие със сходен тип карцином, развиващ се в слюнчените жлези.</p>	<p>4). Базалоиден (базалноклетъчен) карцином – Произхожда от базалните простатни клетки и има сходни хистохарактеристики с кожни и анални тумори. Изключително рядък и твърде агресивен подтип ПК.</p>

Хистологичната оценка по Gleason е златен стандарт и неизменна част от ПК диагнозата. Степенуването на ПК е важно за определяне на индивидуалната биологична активност на туморите и прогноза на болестта [9-12]. Основно се използва оригиналната схема за степенуване на Donald F. Gleason (предложена 1974г, включена в класификациите на СЗО 1993г.), базирана върху микроскопска оценка и интерпретация на биопсичен материал. Основен критерий е туморната архитектура: форма, размери, диференциация на жлезните структури в 5 степени. Биопсичната оценка по Gleason представлява сума от точковата оценка на най-преобладаващата хистологична структура плюс втората по

честота морфологична находка в препаратите [11]. Числово биопсичната оценка по Gleason варира от 2 до 10. На база създадената система за оценка степента на диференциация се обособяват 3 главни групи: високо диференциран карцином с Gl.score (2-4); умерено диференциран карцином Gl.score (7) и ниско диференциран карцином Gl.score (8-10), като последните две групи се свързват с по-неблагоприятна прогноза и развитие на болестта. Естествено редица допълнителни хистологични показатели, проявяващи се в препаратите на определени клинични случаи, допълват и изясняват становищата на патолозите за по-лоша прогноза и степен на злокачественост.

Стадирането по pTNM класификацията, въведена 2002 г, отразява ПК-стадия, според разпространението на малигнения процес в самата жлеза, в съседните тъкани, органи и органни системи и/или наличието на далечни метастази. Най-общо системата за стадиране обхваща 4 клинични стадия на туморно развитие T1-T4. T1 се определя, като клинично неоткриваем тумор, който не се вижда и не се палпира. Открива се биопсично при хистологичен анализ. В T2 стадий, туморът засяга единствено простатната жлеза, а при T3 се разпространява извън пределите на простатната капсула. В T4, туморът е фиксиран или инвазира околните структури и органи: пикочен мехур, ректум, тазова стена и др. С N0 се отбелязва липсата на лимфни метастази, а с N1 присъствие на такива. M0 отразява липсата на далечни метастази, а M1 наличието им. Стадирането по pTNM системата в съчетание с определяне на хистологичния тип ПК и хистологично степенуване по Gleason представляват златни стандарти в диагностичния подход и имат значение за предприемането на бъдещи терапевтични мерки и мониториране на заболяването.

Няколко причини от 90-те години насам фокусират вниманието на редица специалисти по онкологична урология, хирурзи, лъче и химиотерапевти, молекулярни биолози и генетици в световен мащаб да работят по проблемите на ПК, свързани с ранна диагностика, скрининг, лечение. Една от тях е осъзнаването на пандемичния мащаб на разпространение на болестта, високата честота на ежегодно новооткрити случаи, високата смъртност и ниска преживяемост. Друга причина е противоречивата роля и диагностичната ефективност на ПСА – скрининга, свръхдиагностиката на ПК и многото нерентабилно проведени инвазивни биопсични процедури. Значение има и високото разпространение на ДПХ и свързаните с тази патология множество изследвания, които доведоха до много по-задълбочено разбиране на процесите, протичащи в простатната

жлеза на много нива: тъканно, клетъчно, биохимично и в частност взаимодействията епител-строма.

Развития от Dunning модел на ПК при плъхове и произхождащите от него разнообразни моноклонални и генотипно стабилни клетъчни линии с различни варианти на простатен епител, позволиха достигането на прогрес в разбирането на патогенетичните механизми, лежащи в основата на заболяването. Проучванията върху тези модели провокираха идеи за таргетни пътища на терапия и индивидуализиран подход в лечението на ПК. Изясни се необходимостта от молекулярно профилиране на рака, като един от значимите аспекти на болестта.

Специфична проблематика представляват недостатъците на съвременната диагностика на ПК чрез трансректалните тру-кът биопсии. Лимитирането на този, най-широко използван метод идва от наличието на висока неоплазмена хетерогенност. Вследствие, не всички тъканни късчета, добити чрез ТРБ от зоните на жлезата са репрезентативни за цялостната формация, което носи риск за фалшиво-отрицателни резултати. Ограничение представлява и фактът, че въпреки сравнително по-ранната диагностика, която се постига чрез горните две стъпки ПСА и ТРБ - биопсиите, около 25% от пациентите вече имат метастатично заболяване. Често първият тур биопсии са негативни, но профилактичните резултати на пациента изискват вторично подлагане на простатна биопсия след определено време, при което се постига между 10 и 35% детекция при вторичния сет биопсии.

Всички тези доводи, налагат необходимостта за обединяване усилията на медици, учени и терапевти в търсене на нови биомаркери с по-висока ПК-специфичност, диагностична и терапевтична значимост, с възможност за изследване в ТРБ, както и в телесни флуиди, като: урина, еякулат, простатен експримат, кръв.

1.3. Молекулни характеристики на ПК

В тази насока изучаването на молекулните характеристики на болестта и генетичните отклонения на различни нива, съпровождащи прогреса на заболяването има неоспорим принос и значение.

По литературни данни, предразположението към рак на простатата се дължи на комбинирания ефект от мутации и полиморфизми, които засягат гени с ниска пенетрантност. Публикуваните данни от широкомащабни асоциативни геномни проучвания, проведени във водещи европейски центрове сочат, че генетичната предиспозиция към рак на простатата е комплексна и включва множество хромозомни локуси, съдържащи потенциални рискови варианти. Находките за неравновесна скаченост са най-значителни в и около гени, но има такива в генетично „бедни” геномни региони [13-14]. Тези факти насочват световната научната общност, занимаваща се с проблемите на простатната туморогенеза към търсене на вероятната причина на заболяването във фактори, участващи във финната регулация, а не в кодиращата последователност на гените. Ключова роля за възникване на простатния карцином имат промени в генната експресия, както и епигенетични модификации, като промоторното хиперметиране, хистонови модификации и др. На функционално ниво, описаните флукутации се извяват главно с нарушаване регулацията на апоптозните процеси в раковите клетки и стимулиране процеса на малигнизация.

Съществуват безспорни доказателства за наличие на генетично предразположение към поява на простатен карцином. Изследвани са родословия, засегнати от заболяването, при които е изчислено, че относителният риск за развитие на заболяването е 2 пъти по-висок за индивиди със засегнати първородственици и рискът допълнително нараства ако близкородствениците са заболяли в млада възраст [15].

Открити са няколко геномни участъка, показали най-висока степен на скаченост със заболяването рак на простатата и множество други с по-ниска степен на асоциация. Хромозомният участък 24q24 показва най-висока степен на връзка с простатния аденокарцином, което го определя като гореща точка в генома [16-19]. Друг такъв участък е 17q12 [20].

Много автори откриват асоциации на различни локуси, намиращи се на хромозоми 7, 10 и 11 [21]. Има данни и за еднонуклеотидни полиморфизми (SNPs), намиращи се в хромозоми 3, 6, 7, 10, 11, 19 и X, които са свързани с повишен риск от появата на тумори. Данните сочат, че вероятно комбинираната изява на многобройни полиморфизми от различни хромозомни локуси води до предразположение към рак на простатата, тъй като самостоятелно имат слаб ефект.

При възникване на рак на простатата, се засягат гени, участващи в жизненоважни биохимични пътища, определящи няколко възможни патогенетични механизми за възникване на простатния аденокарцином: хормон-индуциран механизъм, репарация на ДНК, механизми за защита от оксидативен стрес, епигенетични промени в различни гени и др. Често при рак на простатата се установяват полиморфизми и мутации в гени, отговорни за поддържането на андрогенната хомеостаза. Доказано е, че при отклонения в съответните гени, възниква така нареченият хормон-индуциран рак на простатата. Функционалната роля на тази група гени е свързана с модифициране на тестостерона до интактните му форми, както и на цяла група хормони, с обезвреждане на разнообразни екзо- и ендогени субстрати. Грешки и промени от различен характер водят до сериозни нарушения на тази финна регулация и провокират появата на злокачествен процес. Примери за гени, спадащи към тази група са *CYP11B1*, *SRD5A2* и *CYP19*, *AR*, *ESR1*, *ESR2*, *RARB*, *RARRES1* и др.

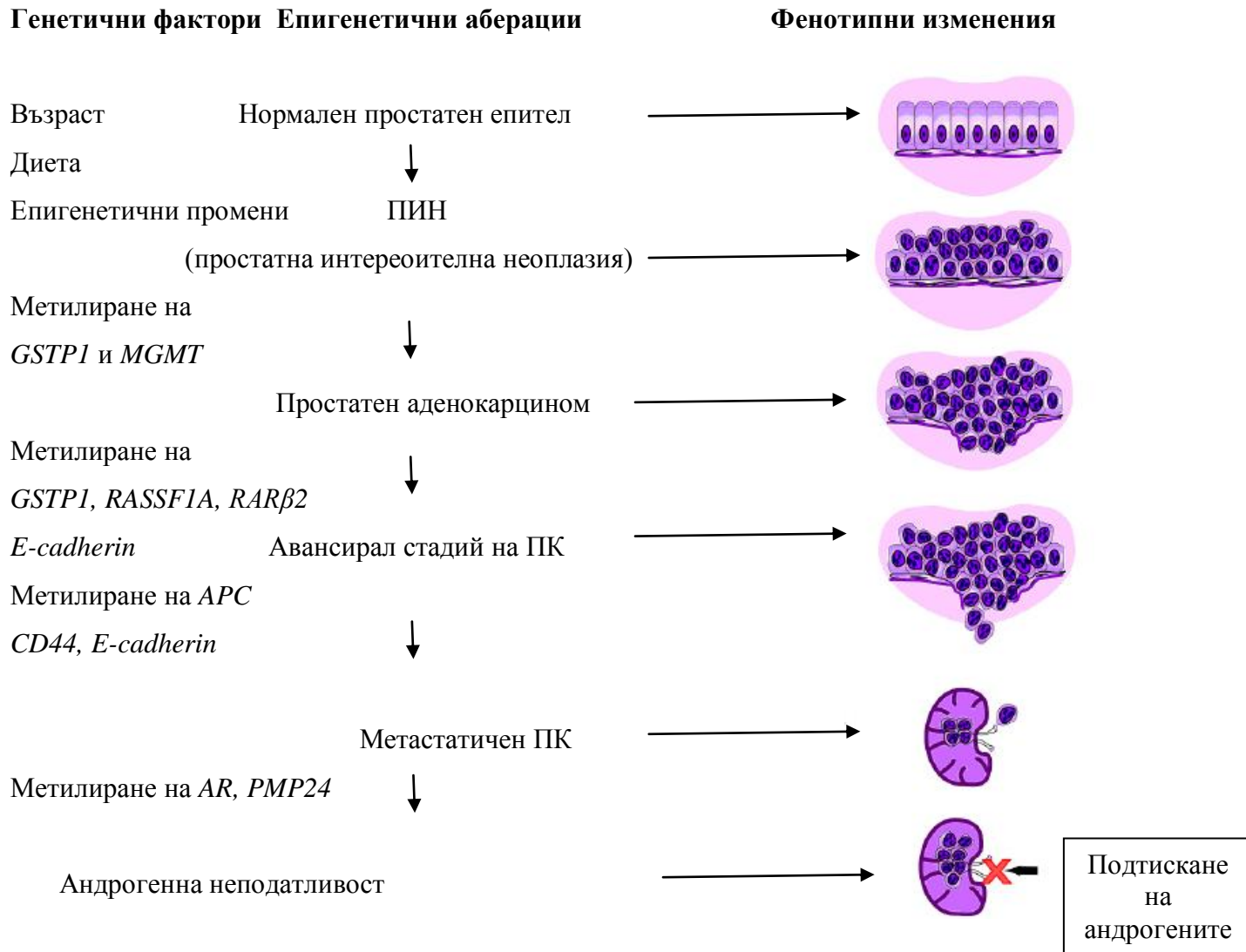
Друг модел на патогенетичен механизъм на заболяването, обхваща отклонения в гени, свързани с механизмите на репарация на ДНК. Всеизвестно е, че системите за поправка на ДНК в отговор на увреждания са в основата на запазване цялостта на генома и повреди от различен характер в сигналните пътища за репарация, водят до обща геномна нестабилност. Примери за гени от тази група, чиято цялост и функции са нарушени при рак на простатата са: *NBS1*, *CHEK2*, *BRCA1*, *MGMT* и др.

За важен патогенетичен механизъм в развитието на рак на простатата, се приемат възможните нарушения в гени, свързани със защита на организма от оксидативен стрес, считан за ключов фактор, провокиращ появата на простатен аденокарцином. Промените в тези гени са свързани главно с отклонения в нивата на генна експресия (свърхекспресия, намалена експресия или генно заглушаване-липса на експресия). *AMACR* и *GSTP1* гените напълно илюстрират този вариант на възникване на простатната канцерогенеза.

Епигентичните промени в различни гени, асоциирани с рак на простатата се приемат, като най-ранни и изключително чести молекулярни събития, провокиращи първичната поява на ПК. Пример за гени с променен статус на метилиране и индикиращи раков процес са: *GSTP1*, *APC*, *RASSF1*, *MDR1*, *MGMT*, *CDKN2A*, *p14(ARF)*, *MGMT* и др. Най-честата епигенетична промяна представлява хиперметирането на промоторни и други регулаторни региони, което води до подтискане на генната експресия и последваща дисфункция [22-23]. Има данни за аберантно хиперметиране в над повече от 30 гена при ПК (Таблица 2). Тази група гени включва класически и потенциални тумор-супресорни гени, участващи в широк набор клетъчни пътища: хормонален отговор, туморно-клетъчна инвазия, туморна архитектура, контрол на клетъчния цикъл, ДНК системи за репарация на генома. Генното заглушаване чрез промоторно хиперметиране на изброените важни фактори допринася за първоначално инициране на туморния процес, последваща прогресия, инвазия по различен път (кръвен, лимфен) и метастазиране [24]. Хиперметирането в ПК може да корелира с патологичната степен, клиничния стадий и/или андрогенна неподатливост (Фигура 1).

Таблица 2. Гени, повлияни чрез епигенетични аберации при рак на простатата.

Епигенетична аберация	Генетичен символ	Цитат
ДНК-хиперметиране		
Хормонален отговор	<i>AR, ESR1, ESR2, RARB, RARRES1</i>	24-28
Контрол върху клетъчния цикъл	<i>CCND2, CDKN2A, CDKN1A, SFN</i>	29-31
Туморна инвазия/туморна архитектура	<i>APC, CAV1, CD44, CDH1, CDH13, LAMA3, LAMB3, LAMC2</i>	32-35
Поправка/репарация на ДНК повреди	<i>GSTP1, MGMT</i>	36-37
Сигнална трансдукция	<i>DAB2IP, DAPK1, EDNRB, RASSF1</i>	38-39
Възпалителен отговор	<i>PTGS2</i>	29
Други	<i>ALDH1A2, HIC1, MDR1, PXMP4</i>	40-42
ДНК-хипометиране	<i>CAGE, HPSE, PLAU, XIST</i>	43-44
Хистоново хипоацетиране	<i>CAR, CPA3, RARB, VDR</i>	45-46
Хистоново метилиране	<i>DAB2IP, GSTP1, PSA</i>	47-48



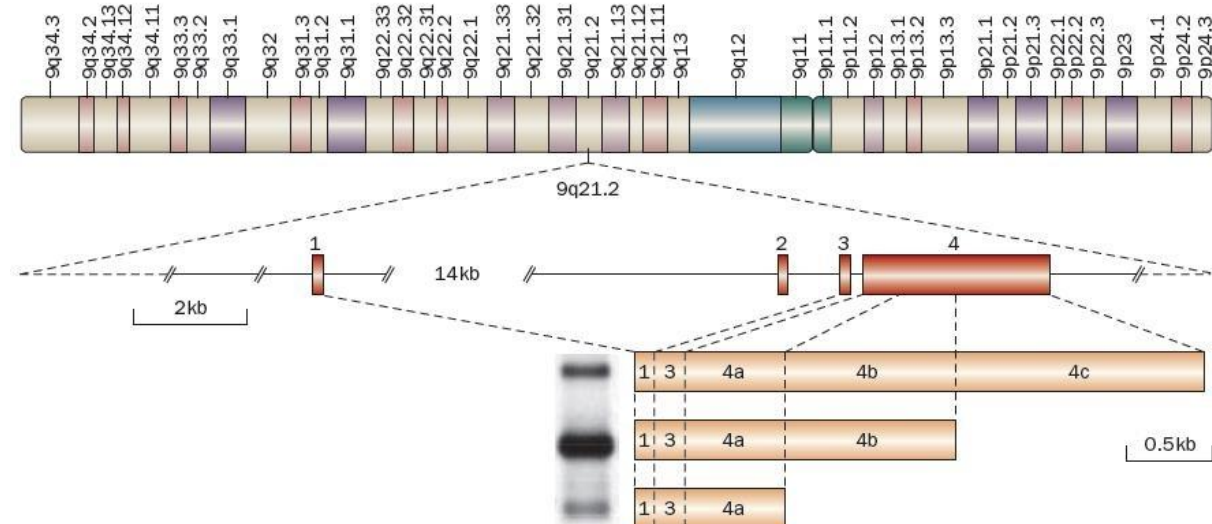
Фигура 1. Участие на епигенетичните промени в инициацията, прогресията и метастазирането на ПК.

1.3.1. Differential display code 3 (*DD3/PCA3*):

DD3/PCA3 генът е идентифициран и охарактеризиран, като свръхекспресиран в простатно туморни тъкани, с експресия, ограничена изцяло в простатата. *PCA3* се явява един от най-простатноспецифичните гени, описани до момента в литературата, многообещаващ маркер за ранна детекция на простатен карцином, а също и мощен биоиндикатор за разграничаване на доброкачествено от злокачествено състояние на

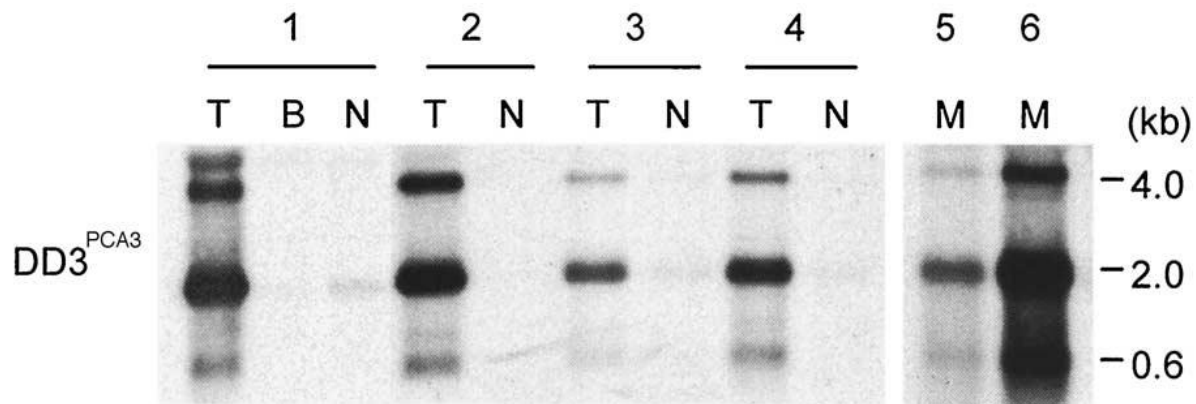
простатната жлеза [49]. Установено е, че *PCA3* се експресира до краен продукт некодиреща РНК, функционираща като полиаденилиран (процесиран) транскрипт (с предполагаема регулаторна функция). При липсата на протеинов продукт, единствената прицелна молекула, която би могла да се използва при изследването на маркера е РНК.

Генът, кодиращ *PCA3* - фактора е разположен на 9-та хромозома (9q 21-22) и заема регион от приблизително 25kb. *PCA3* генът съдържа 4 екзона, а молекулната характеристика на *PCA3* транскрипционната единица разкрива, че алтернативният сплайсинг в екзон 4 е в три позиции, даващи начало на 3 различни по големина транскрипта. Най-често откриваният транскрипт, който покрива ~60% от всички анализирани кДНК – клонове, съдържа екзони 1, 3, 4a и 4b (Фигура 2) [49-50].



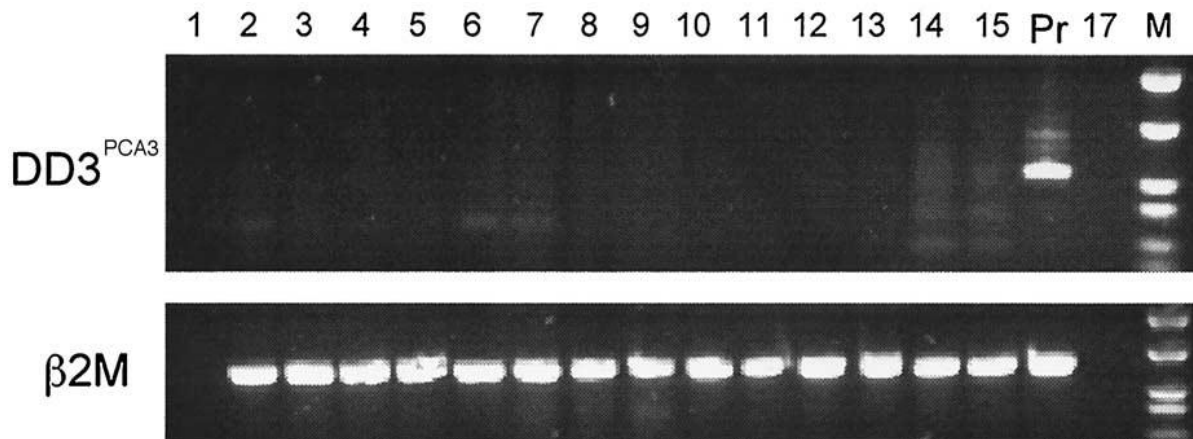
Фигура 2. Структура на *PCA3*-транскрипционната единица. Алтернативното полиаденилиране в три различни позиции в екзон 4,(4a, 4b, and 4c) дава 3 различни по големина транскрипта.

Чрез използването на специфични методи, като Northern blot и RT-PCR, се доказва чувствителна разлика в експресионните нива на маркера, която е от порядъка на 70-100 пъти завишени нива при ПК, в сравнение с липсващи или пренебрежимо ниски нива на *PCA3* експресия при доброкачествено уголемяване или нормално състояние на жлезата [49] (Фигура 3).



Фигура 3. Резултати от Northern blot. Т- туморна клетъчна линия В- доброкачествена хиперплазия; N- норма М- метастатична проба

Резултатите са недвусмислени относно простатно-туморната специфичност на маркера от проучванията. В изследваните многообразни непростатни туморни клетъчни линии (от млечна жлеза, маточна шийка, яйчници, ендометриум, тестиси, и др.) и проби с различен органен произход в норма (млечна жлеза, пикочен мехур, тестиси, гастроинтестинални органи, скелетно-мускулни тъкани) липсва каквато и да е DD3 експресия [49-51] (Фигура 4).



Фигура 4. Нива на експресия на *PCA3* в проба с РСa (Pr) и β-2microglobulin, използван за контрола. 1-15 – проби от клетъчни линии с различен органен произход.

Отличната асоциация на *PCA3* свръхекспресията със злокачествената трансформация на простатния епител, подсказва евентуалното му приложение в

клиничната практика, като скринингов тест за рак на простатата. Друго предимство е, че повишената експресия на маркера, се счита за твърде ранно събитие в развитието на заболяването рак на простатата, тъй като *PCSA3* повишена експресия е наблюдавана в добре диференцирани, умерено диференцирани и слабо (незадоволително) диференцирани тумори на простатата. Тези особености, правят възможно индикирането на злокачествено заболяване в много ранен етап, когато липсват каквито и да било клинични находки [49].

Именно тази висока експресия на *PCSA3* в туморни клетки, е благоприятна за детектирането на нищожно малко ракови клетки (<10%) в простатни биопсии и в телесни флуиди, като кръв, урина, еякулат, простатен експримат. Това позволява детектирането на простатно туморни клетки в тъкани с ниско съдържание на тумор [50,52].

Данни, обобщени от различни научни екипи, работещи върху проблема, потвърждават високата простатно-туморна специфичност на този ген и го описват, като надежден и мощен биоиндикатор, който би могъл да намери приложение в ранната диагностика на рака на простатата [53-57]

1.3.2. *TMPRSS2-ERG* фузионни транскрипти:

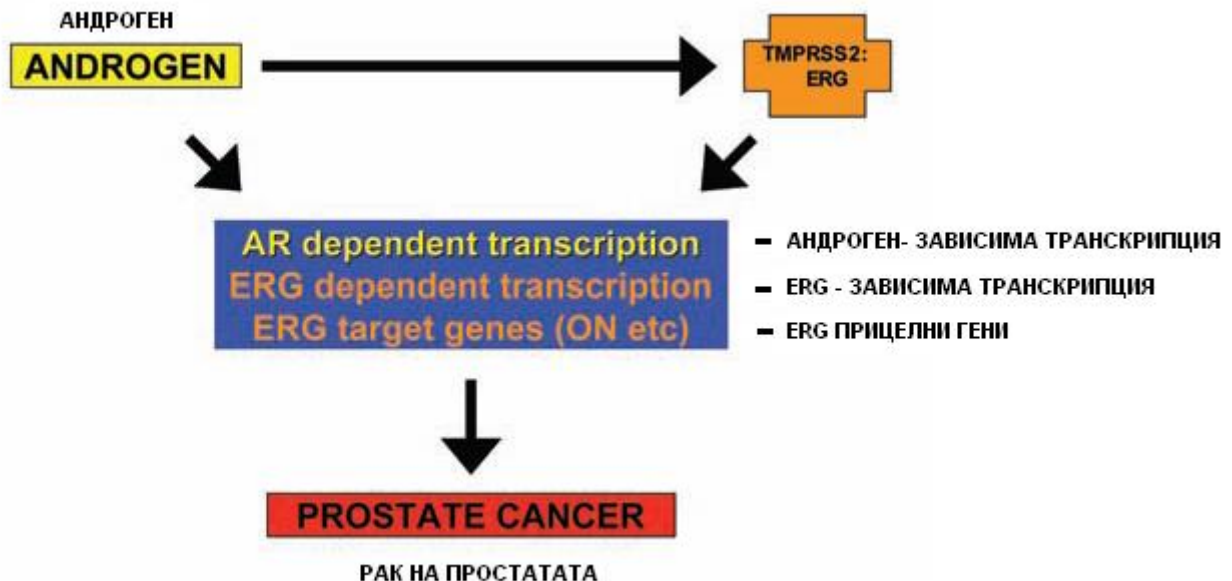
В зависимост от чувствителността на използваните методи (FISH, RT-PCR, директно секвениране и др.) *TMPRSS2-ERG* фузионни сливания се срещат в ~60 % от онкоболните с простатен карцином. *TMPRSS2-ERG* се свръхекспресират в простатно туморни клетки (тъкани), но не и в нормални простатни клетки [58-59].

На база съвременни проучвания се счита, че има значителна асоциация между наличието на *TMPRSS2-ERG*-фузионните транскрипти и възможността за рецидив на заболяването сред пациенти с клинично локализиран тумор (ПК) [60]. В многобройни проучвания, се доказва потенциала за използването на *TMPRSS2-ERG*, като мощен прогностичен фактор за туморна прогресия [60]. Докладвани са данни, че *TMPRSS2-ERG* сливанията играят роля в прогресията от локализиран към метастазиращ карцином на простатата. Транскриптите се експресират в различни стадии на ПК: клинично локализиран, метастатичен, както и в по-агресивните андроген-рефрактерни клетъчни линии от простатен тумор [61] и донякъде определят клиничния ход и поведение на болестта.

Не по-малко значим е фактът, че *TMPRSS2-ERG* транскриптите, представляват потенциален маркер, за детектиране на циркулиращи простатно-туморни клетки в кръвни проби от пациенти. Установяването на *TMPRSS2-ERG* сливания в кръвни проби, предоставя възможност за скрининг и диагноза на първоначален ПК, както и за мониториране на стадии на метастазиране [60].

По отношение на асоциацията на *TMPRSS2-ERG* патологичните транскрипти със степента, стадия и диагнозата на заболяването, има спорни резултати от няколко екипа (счита се обаче, че случаите и контролите в изследваната ДНК-пациентска банка са подбрани некоректно, т.е. не са от един и същ източник, което затруднява точната интерпретация на корелационните резултати, спрямо конкретните туморни параметри).

В проучванията се доказва липсата на *TMPRSS2-ERG* сливания в проби от пациенти с доброкачествена хиперплазия на простатата и се потвърждава специфичността на описания фузионен статус за малигнени туморни тъкани [61].



Фигура 5. Схематично представяне на връзката между простатната туморогенеза и *TMPRSS2-ERG* фузионните транскрипти, изработено на базата на колективни изследвания [61].

Непрекъснатото излагане на простатните туморни клетки на влиянието на андрогените, индуцира повишена честота на *TMPRSS2-ERG* фузионни сливания. *ERG*, като транскрипционен фактор от ETS фамилията, има своята роля в транскрипционната

регулация, чрез свързване на геномната ДНК, предимно в промоторните и регулаторни области на съответни прицелни гени. Завишените нива на *ERG*, закономерно усилват транскрипционната активност на прицелните гени. По този начин, тези гени могат да бъдат ефектори на генетичната програма, инициирани и поддържани от високите *ERG* нива. Счита се, че свръхекспресията на *ERG*, както и на *TMPRSS2-ERG* е андроген-индуцирана (Фигура 5).

Завишените *ERG* нива, респективно ще усилят транскрипционната активност на познатите *ERG* таргетни гени (например *SPARC-Osteonectin* (ON), който е свързан с пътя на костното метастазиране), което довежда до повишаване на клетъчната пролиферация. Тези променени биохимични пътища са въввлечени в механизмите на простатната туморогенеза и е много вероятно *TMPRSS2-ERG* сливанията, да играят значителна роля в прогресията на РСа.

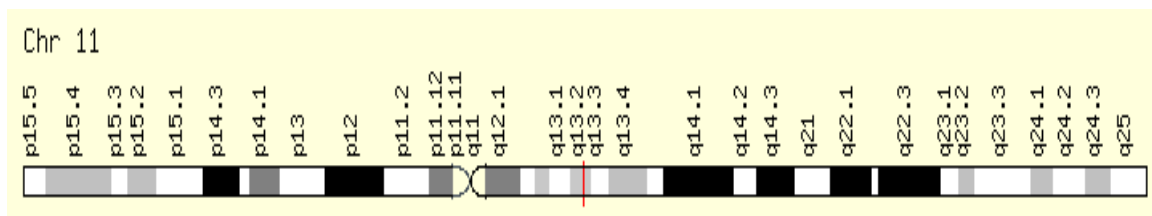
Все по-често излизат публикации, за възможно комбинирано изследване на двата маркера: *TMPRSS2-ERG* геномните сливания и *PCA3* маркера, с цел повишаване чувствителността на анализа за ранна детекция на простатен аденокарцином, особено когато използваните биологични проби са по-достъпни за рутинна употреба, като например уринни седименти или еякулат, получени след ДРИ [62].

1.3.3. *GSTP1*:

Промените в профила на ДНК метилирането, са сред най-ранните и най-често разпространените събития в туморогенезата. Много генни промотори съдържат CG богати региони от ДНК, познати, като CpG-острови. Метилирането им над определена степен, може да се изяви в намаляване на транскрипционната активност чрез локални ефекти на ДНК свързани протеини и естествено чрез промяна в хроматиновата структура. Абнормално метилиране на гени, включени в контрола на клетъчния растеж (тумор-супресорни гени), се открива при широк спектър от злокачествени тумори при човека [63]. Доказано е, че хиперметилирането на нормални неметилирани CpG-острови в промоторните региони на тумор-супресорни гени, корелира с подтискане на генната експресия (генно заглушаване) в туморни формации [64-66].

Ролята на епигенетичния феномен ДНК “de novo” метилиране в модуляцията на генната експресия, се превръща във важен фокус на проучване в простатната

канцерогенеза. Един от гените, подложени на епигенетично повлияване и замесени в патогенезата на рака на простатата е *GSTP1* генът, който е обект на настоящето проучване. *GSTP1* генът е локализиран в 11q13 генен локус (Фигура 6).



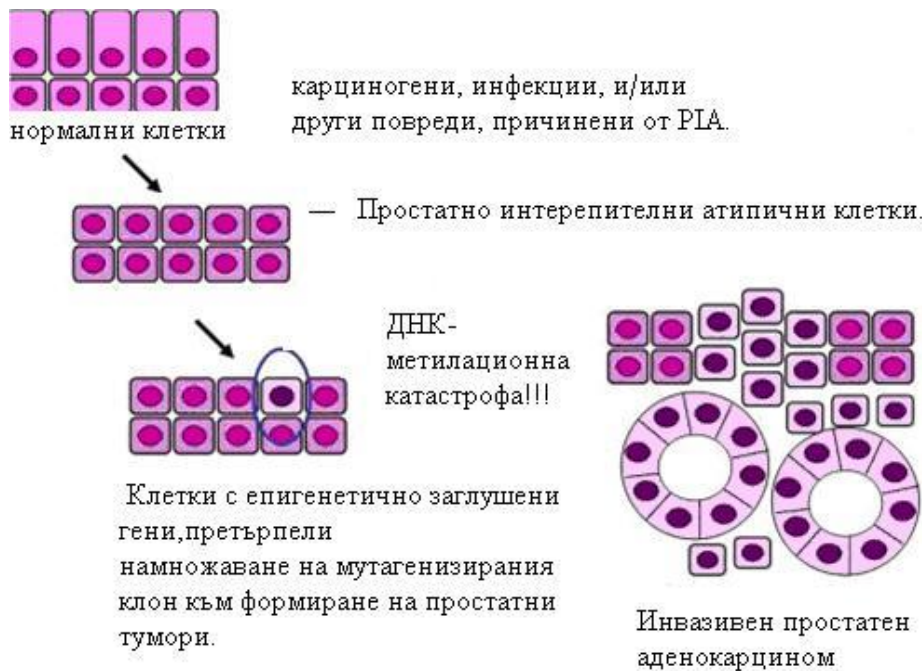
Фигура 6. Схематично представяне на генетичната локализация на *GSTP1* гена. Хромозомна идеограма.

Този ген принадлежи към ензимната суперфамилия GSTs, включена в детоксикацията на електрофилни компоненти, като карциногени, цитотоксични лекарства, чрез глутатионна конюгация [67-68]. Счита се, че тези ензими играят роля в защитата на ДНК структурата от повреди, причинени от оксидативен стрес [69].

Най-изследваният ген, регулиран чрез “de novo” метилиране в простатната канцерогенеза е генът *GSTP1*, който също кодира ензим от описаната фамилия, отговорен за детоксикацията на електрофили и оксиданти, застрашаващи клетките от геномни повреди. *GSTP1* генът се експресира нормално в човешки епителни клетки, включително простатни и би могъл да бъде соматично инактивиран чрез хиперметиране на промоторния регион [70-72]. Хиперметирането на *GSTP1* регулаторни промоторни секвенции, е детектирано в повече от 90-96% от случаите с първоначални простатни тумори в повече от 50 независими научни изследвания (далеч по-често от всеки друг познат соматичен генен дефект) [73].

Хиперметиране на *GSTP1* не е установено в нормална простатна тъкан, нито в други типове нормални тъкани или в случаи на проби с наличие на доброкачествена хиперплазия [70]. Подтискане (заглушаване) на *GSTP1* функцията, вследствие на промоторното хиперметиране се счита за едно от най-ранните събития в простатната канцерогенеза. Затова свидетелстват резултатите на редица екипи за откриване на

промоторно *GSTP1* хиперметиране в някои от възпалителните простатни интраепителни атрофични лезии PIA (5-10%), както и в повече от 70% от най-ранните простатно-туморни прекурсори PIN лезиите (простатни интраепителни неопластични лезии), показващи преанцеровено състояние на жлезата [72-74]. На фигура 7 е представен схематично процеса на индуциране и прогресия на простатната канцерогенеза:



Фигура 7. Схема на клетъчните изменения при развитие на простатен карцином.

Публикуваните данни, че се наблюдава промоторно хиперметиране на *GSTP1* в случаи на PIN лезии, както и малкото спорадични случаи с установена експресия на *GSTP1*, загатват за необходимостта от достигане на определено критично ниво на метилиране за постигане на генно заглушаване и загуба на функция [75]. Използването на молекулярно-биологични методики, в това число специфичен по отношение на метилирането PCR (MS-PCR), позволява точно и бързо определяне на *GSTP1* промоторно хиперметиране. Това позволява разграничаване между простатно биопсични проби с доброкачествен или неопластичен характер [76].

Две големи проучвания доказват, че чрез MS-PCR тест на *GSTP1* гена недвусмислено се повишава чувствителността на диагностиката на рака на простатата [77]. Комбинирането на хистологията с *GSTP1* молекулярния тест, води до коректно

диагностициране на простатен аденокарцином с 79-80% чувствителност, т.е. наблюдава се 15% подобрене, в сравнение със самостоятелната хистологична оценка [78].

Диагностиката на простатен аденокарцином чрез стандартна хистология на биопсии може да е затруднена, особено в случаи на малки, умерено-диференцирани тумори [79], където на помощ идват молекулните тестове. В подобни случаи, проверката на промоторното хиперметиране на *GSTP1*, спомага за изясняване на диагнозата и улеснява вземането на важни клинични и терапевтични решения.

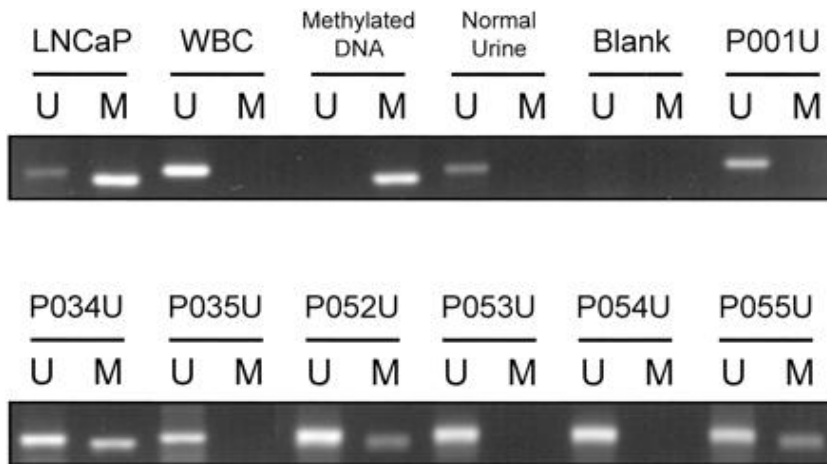
Благодарение на доказаната в редица публикации чувствителност и специфичност на *GSTP1* маркера и важното му приложение в клиничната практика, се появиха и данни за комбинирани тестове, изследващи специфични простатно-туморни гени, които се хиперметилират в простатната туморогенеза. Такъв пример е четворният тест *TIG1/ APC/ RARB 2/ GSTP1*, за който са публикувани обещаващи резултати за достигане на 97% точност в диагностиката и 33% повишаване на чувствителността, в сравнение със самостоятелната хистология [78].

В последни публикации изследването на *GSTP1* промоторното хиперметиране се провежда в неинвазивни проби - уринни седименти [79]. Общозвестно е, че приблизително (20-36%) от мъжете, показващи резултат за негативен първоначален тур биопсии, са диагностицирани с рак на простатата на последващ биопсичен тур, т.е. има доста висок процент фалшиво-негативни резултати в рутинния способ за диагностика на болестта.

Фактът, че детектирането на ниско съдържание на тумор си остава диагностично предизвикателство, според редица учени, прави важно приложението на *GSTP1* молекулярно-генетичния тест в уринни проби [80-83].

Промоторно хиперметиране на *GSTP1* е докладвано в урина от пациенти с рак на простатата, но не и от пациенти с доброкачествена хиперплазия [84]. В същото проучване чувствителността на теста при изследване на уринни проби била оценена на 58% в пилотните анализи, а след технически подобрения за колектиране на проби - на над 76% [85]. Изследването на уринни проби за промоторно хиперметиране на *GSTP1* гена, като биоиндикатор за ранна диагностика на рак на простатата е безценно в случаи на негативен резултат от първоначален сет биопсии. Целта е да се отсеят пациенти с висок риск да развият болестта, на базата на което тези пациенти могат да се подложат на стриктно

наблюдение и обоснована необходимост от повторна биопсия. Фигура 8 онаглежда начина, по който изглеждат резултатите от MS-PCR анализ:



Фигура 8. Молекулярен анализ на *GSTP1* чрез MSP в уринни проби, взети след претърпяна биопсия при пациенти, суспектни за рак на простатата. Генерирането на PCR продукт, индикира наличието на неметириани (U) или метириани (M) *GSTP1* аели. Легенда: **LNCaP**- клетъчна линия ДНК (позитивна контрола за метириране); **WBC, WBC ДНК**- (негативна контрола за метириране); **Метирирана ДНК**– позитивна контрола за метириране. Нормална урина –негативна контрола за метириране; **Blank**- контрола за контаминация, съдържа вода, без матрица; **P001U** до **P055U**- уринни проби с идентификационни номера

Напоследък се публикуват данни от съвременни проучвания за използването на т.нар. промиване на простатни биопсии, при което се демонстрира *GSTP1* метириране в 10 от 10 (100%) пациенти, диагностицирани с простатен аденокарцином, 4 от 6 (67%) пациенти с простатни интраепителни неопластични лезии и липса на метириране при всички пациенти с доброкачествена хиперплазия [86]. При 100% от пациентите с негативен резултат от първоначална простатна биопсия, в случай на атипичност или ПИН и положителен резултат за промоторно *GSTP1* хиперметириране, извършването на повторна биопсия показва рак на простатата.

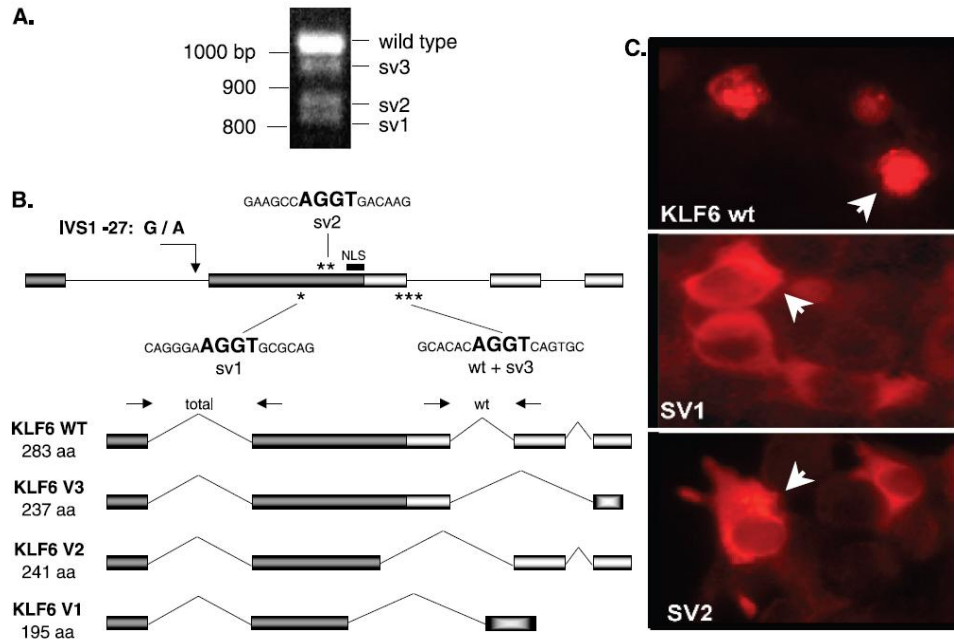
При рака на простатата, епигенетичните промени възникват, като най-ранни стъпки на трансформация и персистириат с инвазия, метастазиране и животозастрашаваща малигнена прогресия. Поради този факт, нарастването на познанията за ролята и значението на епигенетичните промени в простатната канцерогенеза, има безспорен фундаментален смисъл за науката и медицинската практика.

1.3.4. IVS1-27:G/A полиморфен вариант в *KLF6* гена:

В научната литература се натрупаха данни за връзката на тумор супресорния ген *KLF6* (Kruppel подобен фактор 6), познат още с абривиатурите *COPEB* и *ZF9* и рака на простатата. *KLF6* генът, спада към семейство транскрипционни фактори „цинкови пръсти” и се инактивира чрез загуба на алели и наличие на соматични мутации при мъже със спорадичен простатен карцином [87-88]. При наличие на раков процес на функционално ниво описаните мутации се изявяват в повишаване на експресионните нива на *KLF6* гена [89].

Установено е, че герминативен *KLF6* нуклеотиден полиморфизъм, (потвърден в повече от 3 големи независими проучвания с над 3411 мъже) категорично се асоциира с повишен риск от развитие на агресивен рак на простатата. Такава асоциация се доказва въпреки наличие или отсъствие на наследствена компонента, определяна като един от най-изявените рискови фактори за предразположение към заболяването [90].

Алелът, който се счита за специфичен при рак на простатата, генерира появата на ново функционално, свързващо място за SRp40 рестриктазния ензим, повишавайки транскрипцията на 3 алтернативни сплайсинг форми на *KLF6* гена: *KLF6-SV1*; *KLF6-SV2* и *KLF6-SV3*. Интерес представлява *KLF6-SV1* варианта, който е резултат от базова замяна G/A на -27 позиция в свързващата секвенция за SRp40 рестриктазата **AGGT** (IVS1-27:G/A). По отношение на алелната комбинация, описаната мутация се наблюдава в хомозиготно рецесивно състояние [90]. Наличието на полиморфизма води до алтернативен сплайсинг вариант *KLF6-SV1*. Механизмът на генериране на алтернативните сплайсинг форми на *KLF6* гена е илюстриран на Фигура 9.



Фигура 9. Механизъм на генериране на 3 различни KLF6 варианта, вследствие от алтернативен сплайсинг (А и В). Промяна на нормалната клетъчна компартментализация на KLF6-SV1 и KLF6-SV2 протеиновите продукти, спрямо продукта на дивия тип ген KLF6 от ядрото към цитоплазмата (С).

Причината за подбор именно на KLF6-SV1 варианта, като предмет на проучване в настоящата разработка е, че другите 2 варианта се срещат много по-рядко и данните за асоциация с развитието и поведението на рака на простатата са спорни. Както бе отбелязано в описанието на Фигура 9, вследствие от алтернативния сплайсинг, получените KLF6-SV1 и KLF6-SV2 форми придобиват погрешна клетъчна локализация, в сравнение с нормалния продукт на *KLF6* гена и се натрупват в цитоплазмата, а не в ядрото.

Данни от големи проучвания доказват значително повишена експресия на KLF6-SV1 в простатни тумори с агресивен характер [91] и разкриват ключовата му роля в регулацията на възлови пътища в туморогенезата, като: апоптоза, ангиогенеза, пролиферация, клетъчна миграция. Публикуваните резултати правят KLF6-SV1 атрактивен кандидат прогностичен маркер за неблагоприятен клиничен ход на рака на простатата, наличие на бързи рецидиви, резистентност към определени терапевтични схеми [90, 91 и непубликувани работни резултати от екипа на Narla Goutham (Department of Genetics and Genomic Sciences and Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, USA)].

“*In vivo*” изследвания с миши опитни модели доказват, че повишената KLF6-SV1 експресия в простатни туморни клетки, благоприятства доста по-бързото метастазирание на рака на простатата към лимфни възли, кости, мозък (централна нервна система) [89]. Тези доказателства отнеждат място на KLF6-SV1 сплайсинг варианта, като нова обещаваща терапевтична мишена за подтискане процеса на метастазирание. В подкрепа на евентуалното приложение на подобна генна терапия са данните от експерименти със заглушаване на KLF6-SV1, при които са използвани siRNAs и се отбелязва значително забавяне на метастатичния процес. Инхибирането на KLF6-SV1 в експериментални модели с рак на простатата забавя туморното метастазирание [A.Di Feo und J.A.Martignetti – непубликувани данни].

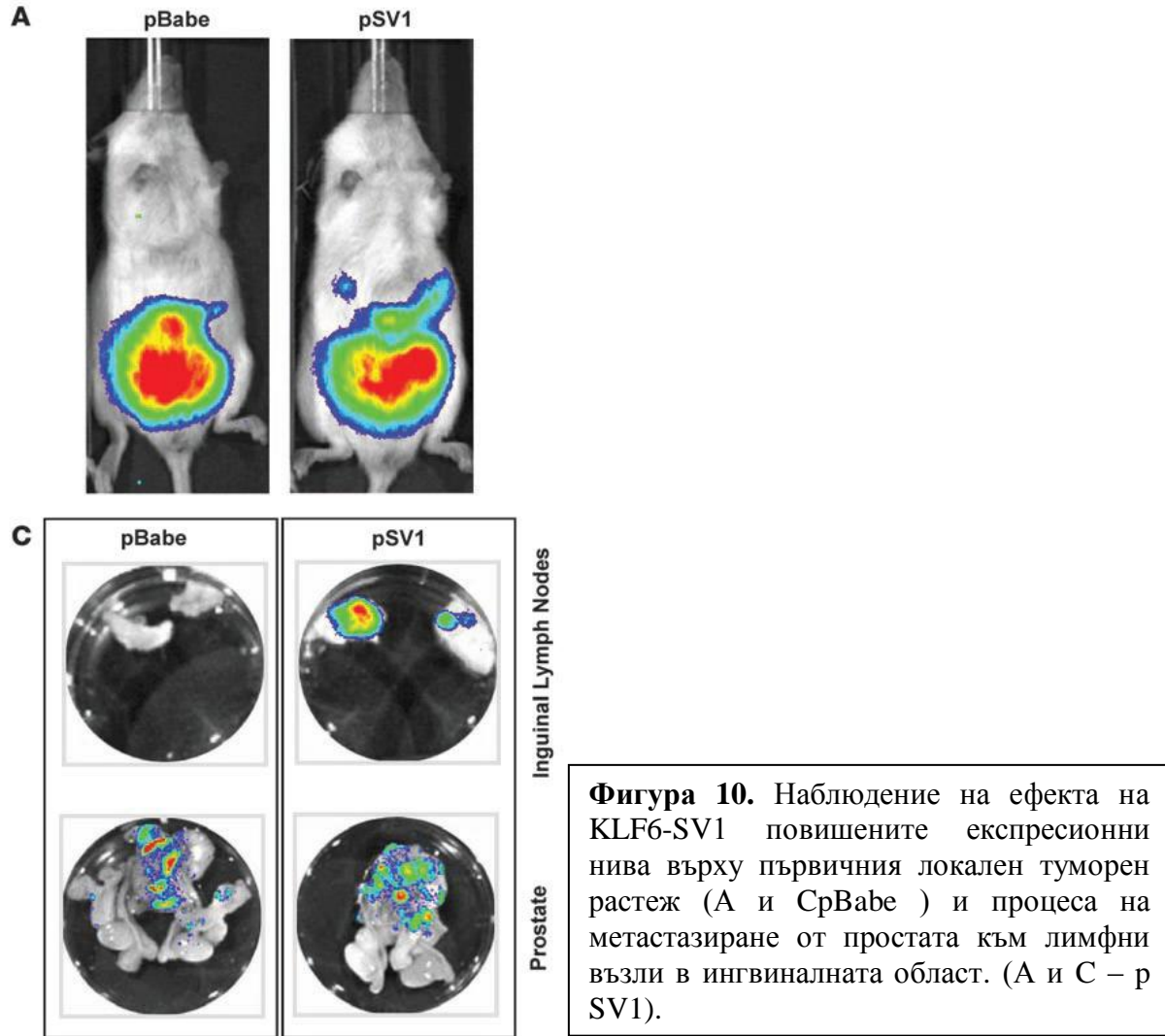
Доказателства за безспорното участие на KLF6-SV1 сплайсинг формата в стимулиране на туморната пролиферация и инвазия, се съобщават в големи проучвания, използващи стабилни KLF6-SV1 простатни клетъчни линии от локализиран тумор PC3 и PC3 метастазиращи производни туморни клетъчни линии PC3M [90-91]. В анализа са наблюдавани експресионните профили на известен брой прицелни гени, участващи в общите процеси на туморогенеза, в частност простатната туморогенеза. Доказва се, че повишената експресия на KLF6-SV1 варианта, пряко повлиява експресията на циклин-зависимия киназен инхибитор p21, като я понижава.

Редица данни, показват прякото участие на KLF6-SV1 в туморната клетъчна миграция, пролиферация и инвазия при рак на простатата. Тъй като този вариант се докладва също при рак на белия дроб, рак на яйчниците, KLF6-SV1 се счита за характеристичен показател за наличие на процес на метастазирание и хормонално неподатлив подтип рак [90-92].

Повишените KLF6-SV1 експресионни нива, изследвани в пациенти с рак на простатата, с цел оценка клиничния ход на заболяването, в комбинация с данни за хистологичната степен по D.Gleason, показват лоша прогноза при мъже с локализиран карцином, свързано с летален изход до 2 години след диагностицирането [90-92]. Цикълът високотехнологични анализи завършва с изследването на “*in vivo*” миши модели, чрез телесно биолуминисцентно изобразяване. Дават се доказателства, че повишената експресия на KLF6-SV1 стимулира метастазиранието при рака на простатата, но не засяга първичния локален туморен растеж (Фигура 10). Тези открития са от изключително

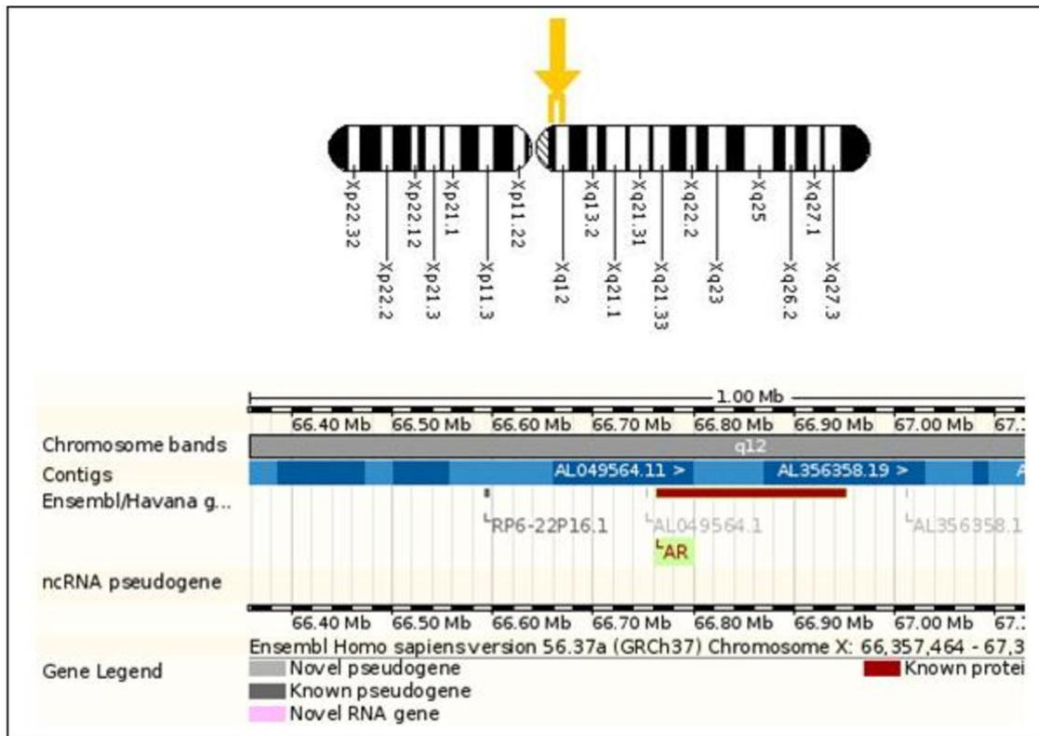
значение за изясняване фундаменталната проблематика на рака, като социално значима и широко разпространена патология. Данните недвусмислено подкрепят теорията, че туморообразуването и метастазирането са два отделни процеса. Изясняването на базисен научен проблем, като този, касае подобласти с научно и приложно значение, както и цялостния лечебен подход в медицината.

Безспорно трудностите в съвременната диагностика и борба с рака на простатата, използвайки рутинните методи, произхождат от клиничната хетерогенност на заболяването и трудната задача за разграничаване на индолентните простатно туморни клетки от такива с потенциал към метастазиране в момента на поставяне на диагнозата. IVS1-27:G/A полиморфизмът, който генерира KLF6-SV1 алтернативната сплайсинг форма е наскоро описан маркер, но също с потенциал за разграничаване на агресивния, хормон-неподатлив подтип рак на простатата, както описаните по-горе *TMPRSS2-ERG* фузии.



1.3.5. AR:

Човешкият андрогенен рецептор за стероидни хормони играе ключова роля за мъжкото полово съзряване (първични и вторични полови белези) и процеса на сперматогенеза [93]. Представлява лиганд-активиращ се транскрипционен фактор с протеинова природа 110 kD, съставен от 919 аминокиселинни остатъка. Кодира се от андроген-рецепторен ген, локализиран върху X хромозомата в Xq11-12 генен локус (Фигура 11) [94]. Активира се чрез специфично свързване с тестостерон и дихидротестостерон, както и под влияние на други андрогенни хормони.



Фигура 11. Схематично изображение на цитогенетичен локус на *AR* гена, Xq11.2-q12 и молекулярна локация върху X хромозомата.

Нормалната здрава простата, както и засегнатата от ПК е зависима от присъствието на андрогени за растеж и развитие, респективно андрогенният рецептор (АР) се явява възлов медиатор на андрогенната активност на жлезата. Поради този факт, ПК тумори показват временна регресия при кастрация (медикаментозна или хирургична). АР се експресира в андроген-податливи и неподатливи КРПК тумори и персистира при прогресия на болестта до хормон-рефрактерен подтип рак. АПТ се фокусира върху блокирането на андрогенната активност и причинява атрофия на простатният епител. Първоначалният ефект от АПТ е блокиране на продукцията на андрогени чрез медикаментозна кастрация или използване на антиандрогени, като например bicalutamide и enzalutamide (MDV3100).

При липса на терапевтичен ефект и когато АПТ е неуспешна, авансираният ПК прогресира до резистентен към настоящата терапия и се обособява специфичен (КРПК) профил. Рецидивът на болестта е следствие от реактивацията на АР-активността. В клиничната практика, възстановяването на активността на АР индуцира драматично повишение на ПСА нивата, сигнификантни за наличие на КРПК. Обикновено 80% от

пациентите с ПК се повлияват благоприятно от АПТ, но за съжаление този период трае максимално 12-18 месеца.

Всеобщо утвърдени теории сред урологичната и онкологична общност сочат AR-мутациите, като основа на механизма за стимулиране на простатен растеж в отсъствие на андрогени. Мутациите в гена за AR предизвикват т.нар. „синдром на андрогенна нечувствителност”.

В голям набор от изследвани пациенти с първичен ПК не са открити мутации в AR (само един случай), което определя нулева или много ниска честота на мутантен AR в първоначален стадий на заболяването.

За разлика от случаите с първичен ПК, съществуват данни за наличие на разнообразни AR-мутации при КРПК [95-97]. Резултатите на функционално ниво подсказват, че мутантните андроген-рецепторни гени представляват своеобразно селективно предимство в метастатичния андроген-неподатлив ПК, вероятно защото именно по този начин остават активни след АПТ. Тези мутантни гени могат да се активират впоследствие от други лиганди (нормално представени в тялото), които в норма не изпълняват роля на AR-активатори (положителни ефектори). Пример за такива неестествени активатори, придобити в хода на прогресия на ПК, като част от „тумор-спасителната програма” са адреналните андрогени, секретирани от сърцевината на надбъбречните жлези. Именно това е причината за по-висока ефикасност на АПТ, когато използва за таргет и този тип андрогени.

На фигура 12 е представен механизмът на AR-реактивация, както и функционалните промени, свързани с прехода към метастатичен КРПК профил.

AR (CAG)_n повторите са локализирани в екзон 1 на *AR* гена, който кодира големият му аминокиселинен терминален домен. Било наблюдавано, че скъсената дължина на *AR(CAG)_n* повторите (критична точка < или = 22) оказва по-висока трансактивационна активност върху *AR* рецептора и предизвиква повишен афинитет към свързване с андрогени [98]. Тези характеристики правят простатата по-уязвима към хронична андрогенна свръхстимулация и повишават пролиферативната и активност. Усилената пролиферация на свой ред би могла да повиши честотата на соматичните мутации сред тумор-супресорните гени, както е примера с *AR*. В контраст, експанзията на (CAG)_n повтора

(> 40) води до по-ниско от нормалното ниво на андрогени, респективно отново до нарушена андрогенна хомеостаза.

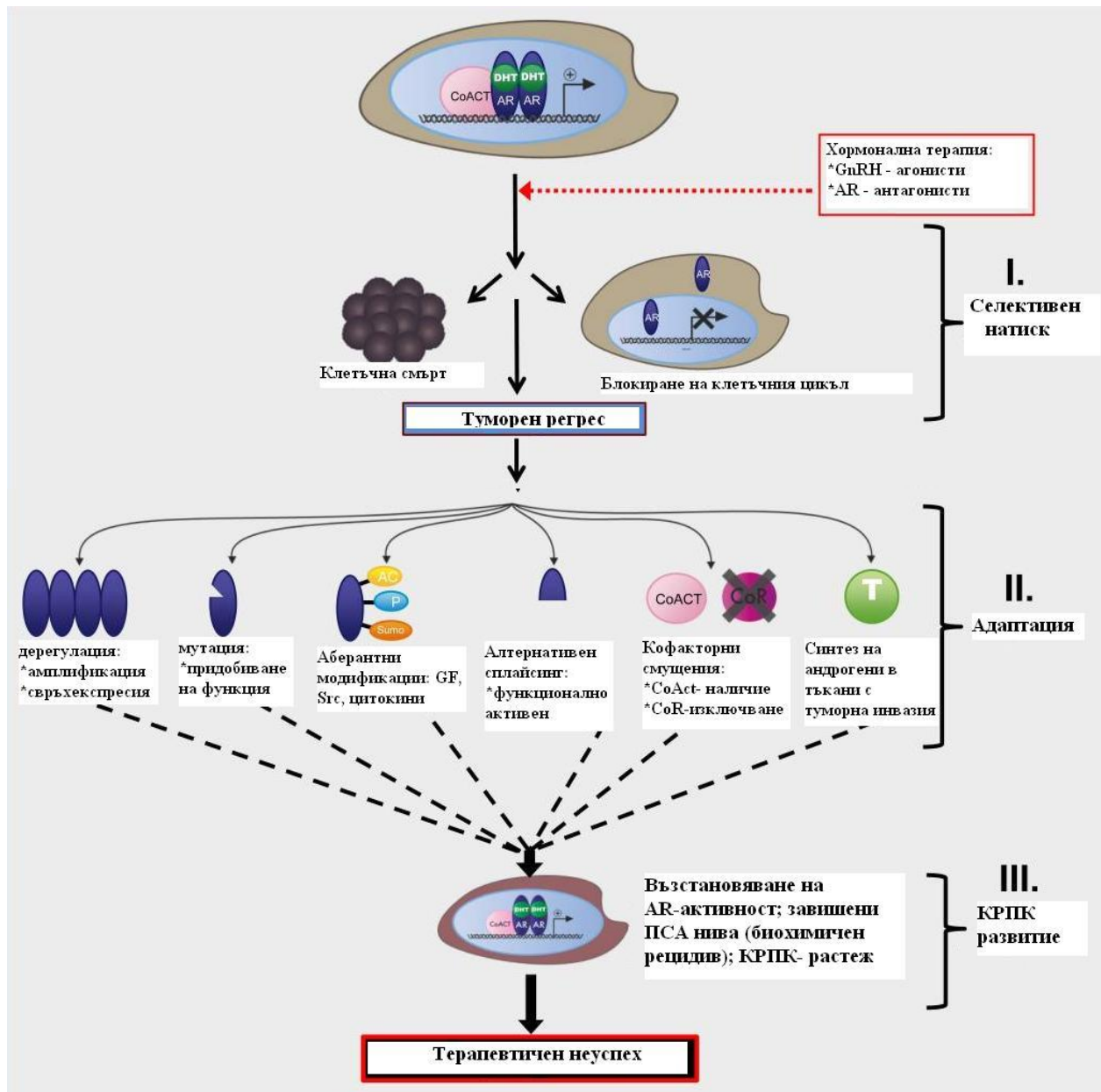
AR(CAG)n микросателитите кодират полиглутаминова аминокиселинна последователност, чиято дължина е обратнопропорционално и линейно свързана зависимост с *AR* активността.

Авторите се фокусират върху дължината на (CAG)*n* повтора, защото съвременните проучвания сочат, че мъжете със скъсена дължина равна или по-ниска от 22 са с вродена предразположеност и повишен риск от развитие на ПК, отколкото тези с по-дълги варианти. По-късите варианти на (CAG)*n* андрогеновия повтор се свързват освен с ПК, с разнообразни патологии, като: анкилозен спондилит, мозъчна изостаналост, по-ранна начална атака на ревматоиден артрит, автоимунни заболявания, хепатит В-свързан чернодробен/ хепатоцелуларен карцином и др.

Дългите *AR(CAG)n* варианти се свързват със спинална и булбарна мускулна атрофия, синдром на Кенеди и др. Интересно е да се отбележи, че мъже с диагноза спинална булбарна атрофия са диагностирани също с ПК. Приема се също, че експандираните *AR(CAG)n* микросателити са замесени в преканцерогенезата на маточните ендометриални клетки [98].

Скъсената дължина на (CAG)*n* повтора се асоциира не само с вродено предразположение към ПК, но също така с по-ранна атака на заболяването. Съвсем късите *AR(CAG)n* варианти се свързват с висока агресивност, по-висока хистологична степен по Gleason и неблагоприятен клиничен ход по данни на някои проучвания [98].

Има някои доказателства, че *AR(CAG)n* повтора се намира в неравновесна скаченост с други полиморфизми в *AR* локуса. Бяха публикувани резултати за наличие на неравновесна скаченост (алелна асоциация) с *Stu I* мутации, които също се асоциират с ПК[99]. Има данни и за скаченост между *AR(CAG)n* повторите и *GGC/N* алелите сред пробанди с простатен карцином [100].



Фигура 12. Андрогенна дерегулация и КРПК развитие.

I. Успешно повлияване на AR-активността чрез потискане на тестикуларните андрогени и чрез AR-антагонисти, резултиращи в туморна клетъчна смърт и забавяне (блокиране) на клетъчния цикъл. **II.** Последващи адаптационни събития, които водят до: възстановяване на AR-сигнализицията, включваща амплифициране или свършекспресия на AR, придобиване на функционални соматични AR-мутации; аберантни AR- посттранслационни модификации (често задвижвани чрез растежни фактори и цитокинови каскади); алтернативен сплайсинг, резултиращ в хиперактивни рецептори, безконтролност в активността на кофакторите и андрогенов синтез в тумор-позамените тъкани. **III.** Активизиране на AR-активността, индуцираща развитие на неизлечим КРПК, придружен с повишени нива на ПСА.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

Изследване на някои молекулни характеристики в комбинация с клиничко-патологичните аспекти на простатен карцином и други патологии на простатната жлеза за диагностика и мониториране на заболяването при български пациенти.

2.2. ЗАДАЧИ

2.2.1.1. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-биологична методика за оценка на експресионните нива на тумор-специфичния маркер *PCSA3*.

2.2.1.2. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-биологична техника за анализ на *T2-ERG* фузионни транскрипти.

2.2.1.3. Разработване и въвеждане на методика за анализ на промоторно хиперметиране в *GSTP1* гена.

2.2.1.4. Въвеждане и оптимизиране на методика за анализ на *IVS1-27:G/A* полиморфизма в *KLF6* гена.

2.2.1.5. Секвениране на *AR* гена и анализ на $(CAG)_n$ повтора в екзон 1 на гена.

2.2.1.6. Приложение на разработените методи за изследване на тумор-специфичните маркери за диагностика и контрол на заболяването при български пациенти с ПК или други патологии на простатната жлеза: ДПХ и хронично възпалително заболяване (простатит).

2.2.1.7. Извършване на сравнителен анализ на базата на получените молекулни профили и наблюдаваните клинични и хистологични характеристики при изследваните пациенти с ПК, ДПХ и простатит.

2.2.1.8. Разработване на системен подход за молекулярно-генетичен анализ при пациенти с ПК; интердисциплинарен подход за индивидуализирана терапия.

2.2.1.9. Сравняване на получените данни при български пациенти със световната база данни.

2.2.3. Обобщение на получените резултати.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИАЛИ

3.1.1. Клиничен материал

Молекулярно-генетичните изследвания са проведени върху 150 пациента. На база клинична диагноза, пациентите са обособени в групи, както следва:

- пациента с ПК	101
	83 с първично/индолентно заболяване
	18 с КРПК
- пациента с ДПХ	25
- пациента с хроничен простатит	24

В проучването бяха използвани, като контроли следните клетъчни линии, предоставени от Gerald W. Verhaegh PhD, Radboud University Nijmegen Medical Centre :

- Q3657 22Rv1(ДПХ клетъчна линия с пренебрежимо ниски нива на *PCSA3* експресия, кДНК)
- Q3658 22Rv1 (ПК туморна клетъчна линия с високи нива на *PCSA3* експресия, кДНК)
- DNA 810 pCMV-*PCSA3* plasmid (6008bps) (плазмидна ДНК ~ 150000 молекули/пикограм).
- Q2353 DuCaP (ПК клетъчна линия, кДНК, съдържаща *T2/ERG* фузии).

Всички изследвани клинични случаи са спорадични и с български произход.

Пациентите са клинично диагностицирани и насочени за ДНК анализ от: Военномедицинска академия- София Клиника по Обща Урология, Катедра по Патология. Настоящото изследване е финансирано частично по договори : №4-Д/2011, 26-Д/2012 и 17-Д/2013 на Медицински Университет София, България.

Клиничната диагноза е поставена на базата на стандартни клинични и лабораторни изследвания: провеждане на ПСА анализ, специализиран преглед при уролог-специалист, провеждане на различен вид биопсия, според профила на пациента и последващо хистологично изследване.

3.1.2. Биологичен материал

При провеждане на генетичните анализи извършени в настоящият дисертационен труд беше използвана високомолекулна ДНК и РНК, изолирани от свежа простатна тъкан (след проведена простатектомия, аденомектомия, биопсичен тур), “tru-cut” биопсичен материал, уринен седимент и венозна кръв.

Таблица 3. Биологични материали, използвани в дисертационния труд :

Биологичен материал:		Брой проби:
Свежа простатна тъкан :	простатектомия	13
	аденомектомия	5
Биопсичен тур		31
“tru-cut” биопсичен материал		98
уринен седимент		13
венозна кръв		88

Задължително условие за акуратен генетичен анализ по отношение на тъканните проби е да не се фиксират във формалин поради работата с РНК, която се характеризира с по-голяма нестабилност спрямо ДНК. След вземане на тъканните проби се замразяват незабавно на -20°C .

Уринните седименти се добиват след задължително провеждане на стандартно ДРИ в съгласие със световните изисквания за качество на пробите. Транспортират се незабавно до лабораторията или се замразяват аналогично на тъканните проби и се транспортират в замразен вид.

В настоящия дисертационен труд се използват 3-6 ml венозна кръв, взета в пластмасова епруветка (тип вакутейнер) и антикоагулант етилен диамин тетраацетат-натриева сол (ЕДТА). Кръвните проби се взимат след нахранване и се съхраняват на $+4^{\circ}\text{C}$ до времето за обработка (за изолиране на високомолекулна ДНК и РНК се съхраняват не повече от 48 часа).

3.2. МЕТОДИ

3.2.1. Преданалитична обработка на материала

3.2.1.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв и уринни седименти.

За изолиране на високомолекулна ДНК от уринен седимент, венозна кръв и “tru-cut” биопсии беше използван комерсиален кит на AmpliSens Ecoli s.r.o Slovac republic. Бяха спазени стриктно всички инструкции към методичния протокол на производителя.

3.2.1.2. Изолиране на високомолекулна ДНК от тъканни проби по фенол-хлороформен метод.

Процедура:

- разрушаване на клетките и клетъчните ядра;
- екстрахиране на белтъците;
- преципитация на ДНК.

Разрушаване на клетките и клетъчните ядра:

Изходните клетки се поставят в епруветка тип Eppendorf от 1,5 ml и към тях се добавят 500 µl SE-буфер, 25µl 10%-ен натриев додецил сулфат (SDS) и 25µl протеиназа К (10 mg/ml). Разбърква се леко и се инкубира на 55 °C за 3-4 часа.

Преципитация на белтъците:

След протеолизата в епруветката се добавят 300µl фенол (pH=8,0) и 300µl хлороформ/изоамилов алкохол в съотношение 24:1. Разбърква се интензивно на вортекс и се центрофугира 15 min на 12 000 rpm.

Преципитация на ДНК:

Горната фаза се прехвърля в нова Eppendorf-епруветка чрез внимателно отпипетиране без да се увлече интерфазата. Добавя се 1/10 от обема 3 M натриев ацетат (CH₃COONa) и внимателно се размесва. Добавят се 2 обема ледено студен абсолютен етанол и се инкубира 30 min на -70 °C. Центрофугира се 15 min на 13000 rpm. Надутаечната течност се отлива внимателно. Утайката се промива с 0,5 ml 70% етанол,

след което се центрофугира 10 min на 13000 rpm. Надутаечната течност се отлива и утайката се суши на въздух. Утайката се разтваря в ТЕ буфер.

Буфери използвани за изолирането на ДНК:

SE буфер (pH=8,0): NaCl – 75 mM; Na₂EDTA – 25 mM

TE буфер (pH=7,4): TRIS/HCl (pH=7,4) – 10 mM; EDTA (pH=8,0) – 1 mM

3.2.1.3. Колектиране и предварителна обработка на уринни проби с цел последващо изолиране на РНК от уринен седимент.

Уринни проби се вземат обикновено преди провеждане на трансректална биопсия. Ако все пак е взета биопсична проба е необходимо да се спази срок от най-малко две пълни седмици между биопсията и колектирането на урина от пациента.

Процедура:

- Колектиране на урина
- Предобработка на уринна проба

Колектиране на урина:

Преди провеждане на задължителното ДРИ, пациента изпива 300мл. вода или друга безвредна течност. След провеждане на ДРИ, 30мл. от отделената уринна проба се прехвърля незабавно в 50мл. флакон, съдържащ 2мл. 0,5 М ЕДТА. В този вид пробата се транспортира до лабораторията. Ако не е възможно да бъде обработена незабавно, урината се замразява на -20 °C.

Предобработка на уринна проба:

Урината се центрофугира за 10мин. на 3000 rpm. при 18-25 °C. Супернатантата се отстранява внимателно, без да се разрушава седимента. Седимента се ресуспендира в 10мл. ледено студен буфериран NaCl(pH=8). Пробите се центрофугират отново 10 мин. на 3000 rpm. на 18-25 °C. Надстоящата течност се отпипетирва внимателно и към седимента, останал на дъното се добавя 1мл. ледено студен NaCl(pH=8). Следва мощно вортексиране и прехвърляне на седимента в стерилен епендорф 1, 5мл. Пробата се центрофугира за

1 мин. на 3200 грт. и супернатантата се отпипетирва внимателно. Полученият седимент се замръзва на -20 °С, когато предстои да се използва до 1 месец след обработка и на -70 °С с цел съхранение за дълъг период от време (до 1 година). От полученият уринен седимент се изолира високомолекулна РНК по метод, описан в **3.2.1.4.**

3.2.1.4. Изолиране на високомолекулна РНК от уринни седименти и венозна кръв чрез използването на тризол (TriPure Isolation reagent, Life Technologies).

Процедура:

- преместване на дълбоко замразените уринни седименти върху лед
- разрушаване/лизиране на клетките и клетъчните ядра
- екстракция на РНК
- преципитация на РНК

Разрушаване на клетките и клетъчните ядра:

Към изходните клетки в седимента се прибавят 750мл. TriPure Isolation reagent, като се лизират чрез непрекъснато ресуспендиране. Хомогенизираната проба се инкубира за 5 минути на стайна температура за пълна дисоциация на нуклеопротеиновия комплекс.

Екстрахиране на РНК:

Добавя се 150µl хлороформ към всяка проба. Следва мощен вортекс и инкубация на пробите за 2-15 минути на стайна температура. За разделяне/сепариране на разтвора в 3 фази се извършва центрофугиране за 15 минути на 12 000 грт. След тази стъпка се прехвърля най-горната безцветна водна фаза в нова епруветка.

Преципитация на РНК:

Добавя се 300 µl изопропанол към всяка проба. Следва инкубация 5-10 минути на стайна температура, която позволява на РНК да преципитира. Пробите се центрофугират за 10 минути на 12 000 грт. Внимателно се премахва супернатантата. Прибавя се 150 µl 75-80% етанол. След мощно вортексиране на пробите, се центрофугират за 5 минути на 7500 грт. Отстранява се надстоящата течност и остатъка от етанол се отстранява чрез сушене на въздух на стайна температура. Утайката от РНК се вижда, като белезникава желеподобна маса на дъното на епруветката. РНК утайката се ресуспендира няколкократно в DEPC вода (диетил-пирокарбонат-третирана вода, пречистена от РНКазы). Следва инкубация на пробите за 10-15 минути в термостат на 60-65 °С. Крайният обем на DEPC

водата варира в зависимост от типа проба, която се изолира. За уринни седименти обема е 35-40 μ l, а за венозна кръв 50 μ l.

Изолирането на високомолекулна РНК от венозна кръв се провежда абсолютно аналогично на изолирането от урина, като изходният обем на венозната кръв е 250 μ l.

3.2.1. 5. Изолиране на високомолекулна РНК от тъканни проби:

Процедура:

-лизиране на клетките и клетъчните ядра

-екстракция на РНК

-преципитация на РНК

При изолиране на РНК от “tru-cut” биопсичен материал се използва аналогичен протокол на РНК изолирането от уринен седимент. Единствената разлика е, че се използва специален стъклен хомогенизатор за тъкани в първата стъпка за хомогенизиране на пробата.

При изолиране на РНК от биопсичен материал (след простатектомия, аденомектомия, биопсичен тур) се използват различни обеми на реагентите поради факта, че тъканните проби надвишават 50-100 мгр. и РНК утайката се разтваря в по-голям обем DEPC вода.

Лизиране на клетките и клетъчните ядра

250 мгр. биопсичен материал се смесват с 1ml Тризол. Пробите се хомогенизират с помощта на ръчен стъклен хомогенизатор за тъкани. Следва 5 минути инкубация на стайна температура за пълно отделяне на нуклеопротеиновия комплекс.

Екстрахиране на РНК:

Добавят се 200 μ l хлороформ, след което следва силно вортексиране (15-20 секунди) и 2-3 минути инкубация на стайна температура. Пробите се центрофугират за 15 минути на 13 000 rpm. Отпипетирва се горната безцветна прозрачна фаза от епендорф-епруветката, съдържаща сепарираната проба, като се внимава да не се „засмуче” от интерфазата.

Преципитация на РНК:

Към отделената горна фаза, където се съдържа РНК, се добавя 500 μ l изопропанол. Следва инкубация 10 минути на стайна температура и центрофугиране на пробата 10

минути на 13 000 rpm. Супернатантата се отстранява, при което на дъното на епендорф-епруветката остава желатиноподобна, белезникава утайка от РНК. Извършва се промиване с 1мл. 70 % етанол и центрофугиране за 5 минути на 13 000 rpm. След отстраняване на супернатантата, утайката се суши на въздух. РНК- преципитата се разтваря в 100 µl DEPC вода, след което се извършва 10 минути инкубация в термостат на 50-60 С°.

3.2.1.6. Бисулфитно конвертиране на ДНК

Принцип:

Метилираните и неметилираните алели се модифицират различно в присъствие на натриев бисулфит. Използваният реагент конвертира цитозиновите остатъци до урацилови остатъци в едноверижни ДНК фрагменти, докато метилираният цитозин (5-метилцитозин) остава непроменен. В хода на последващата амплификация цитозиновите остатъци представляват метилирани остатъци в изходната верига, докато неметилираният цитозин, конвертиран в урацил се детектира, като тимин в получения амплификат. По този начин чрез бисулфитното конвертиране се визуализират и разграничават метилирани и неметилирани фрагменти. Метилираният хомолог е транскрипционно неактивен, докато неметилираният е активен. В настоящият дисертационен труд бисулфитно конвертирана ДНК се използва в молекулярната диагностика на ПК чрез визуализация на метилиран *GSTP1* алел в промоторната област. Наличието му е индикатор за неопластично състояние, както и за първоначалните етапи на канцерогенеза.

Процедура:

За бисулфитното конвертиране на ДНК се използва фабричен кит EZ DNA Methylation–Gold™ Kit (Zymo Research, USA). Към 20 µl от изходната ДНК проба се добавят 130µl CT Conversion Reagent (този реагент за конвертиране се приготвя непосредствено преди процедурата чрез добавяне на 900 µl вода, 300 µl M-Dilution Buffer и 50µl M-Dissolving Buffer към една епруветка CT conversion Reagent). Смесената проба с конвертиращия реагент се миксира добре. Бисулфитното конвертиране на ДНК се извършва при следния температурен режим: 98 С° за 10 min денатурация; 64 С° за 2 h и 30 min конвертиране и след това съхранение на 4 С°. Към предоставените в кита колонки (Zymo-Spin™ IC Column) се накапват 600µl M- Binding Buffer и конвертираната проба. Затварят се капачките и се миксира чрез няколкократно обръщане на колонките.

Следва центрофугиране на пълни обороти ($>10\,000 \times g$) за 30 sec. Изхвърля се събраната в държателя под колонката течност. Към колонките се добавят 100 μ l M-Wash Buffer и се повтаря центрофугирането при същите условия. Изхвърля се събраната течност. Към колонките се добавят 200 μ l M-Desulphonation Buffer и се инкубират за десулфониране 15-20 min на стайна температура. След стъпката на десулфониране се повтаря центрофугирането при същите условия. Отново се изхвърля събраната в държателя течност. Към колонките се добавят отново 200 μ l M-Wash Buffer и се повтаря центрофугирането при същите условия. Изхвърля се събраната течност. Последната стъпка на промиване се повтаря два пъти. Елуирането на бисулфитно конвертираните ДНК молекули се извършва с 10 μ l M-Elution Buffer, които се накапват директно върху мембраната на колонките. Колонките се поставят върху 1,5 ml Eppendorf епруветки и се центрофугират кратко за елуиране на бисулфитно конвертираната ДНК.

Апаратура: GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA, центрофуга MiniSpin Eppendorf.

3.2.2. Аналитична обработка на материала

3.2.2.1. Протокол за провеждане на обратна транскрипция.

За провеждане на обратна транскрипция на РНК беше използван комерсиален кит TRANSCRIPTME RNA kit (Gdansk, Poland). Бяха спазени всички инструкции на фирмата производител.

В таблица 4 е посочена оптималната концентрация на компонентите в реакционната смес за провеждане на обратна транскрипция, а в таблица 5 специфичната програма за провеждане на кДНК синтез.

Таблица 4. Оптимална концентрация на компонентите в реакционната смес за провеждане на обратна транскрипция чрез RT-PCR.

Компоненти на реакционната смес	Обем (µl)
Високомолекулна РНК	5
ММ(2x) (Мастър микс, съдържащ oligo-dT/random primers и всички необходими буферни компоненти)	10
Обратна транскриптаза	2
DEPC вода	3
	До краен обем 20 µl

Таблица 5. Оптималната програма за провеждане на RT-PCR на РНК маркерите *PCAZ* и *T2-ERG* фузии.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
1	25 °C	10min	1
2	50 °C	30min	
3	85 °C	5 min	

3.2.2.2. Полимеразна Верижна Реакция (ПВР; Polymerase Chain Reaction; PCR) .

Протокол за намножаване на специфични, използвани в дисертационният труд генини региони. Дизайн на праймери.

Секвенциите на таргетните генини региони, използвани в дисертацията са извадени по аналогия на различни предишни публикации, където са посочени номенклатурните им номера и чрез проверка на секвенциите в известни утвърдени бази данни.

Забележка: За намножаване на специфичен участък от *GSTP1* гения промотор, бяха използвани две двойки праймери за извършване на специфична по отношение на метилирането ПВР (MS-PCR). Намножават се два вида PCR фрагменти, според статуса на пациента. Алелите биват неметиран здрав алел и / или метилиран патологичен алел, доказващ наличие на неоплазма. Нуклеотидните последователности на избраните праймери, използвани в настоящата разработка са посочени в таблица 6.

Таблица 6. Нуклеотидна последователност на праймери за амплификация на: *PCA3*, *T2-ERG* фузионни варианти, *B2M* хаускипинг ген, *GSTP1*, *KLF6*, *AR* и *AR(CAG)n*.

Име на маркера	Нуклеотидна последователност на праймерите	Размер на ампликон (бд.)
<i>PCA3</i>	Fex1 5'FAM6-GGTGGGAAGGACCTGATGATAC-3' Rex4 5'-GGGCGAGGCTCATCGAT-3'	262
<i>TMPPRS2</i> <i>ERG</i>	T2ex1F 5' CGCGAGCTAAGCAGGAG -3' ERG ex4R 5' GTCCATAGTCGCTGGAGGAG -3'	180
<i>TMPPRS2</i> <i>ERG</i>	T2ex1F 5' CGCGAGCTAAGCAGGAG -3' ERGex6R 5'CCATATTCTTTCACCGCCCACTCC -3'	180
<i>TMPPRS2</i> <i>ERG</i>	5'TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAG-3' 5'GTAGGCACACTCAAACAACGACTGG-3'	125 (по Tomlins)
<i>TMPPRS2</i> <i>ERG</i>	5'CAGGAGGCGGAGGCGGA-3' 5'GGCGGTTGTAGCTGGGGGTGAG-3'	595 (по Tomlins)
<i>B2M</i>	ex2F 5'FAM6-AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA 3' ex4R 5'GCAGAATTTGGAATTCATCCAA -3'	317
Unmethylated <i>GSTP1</i>	F 5'GAT GTT TGG GGT GTA GTG GTT GTT-3' R 5'CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA-3'	107
Methylated <i>GSTP1</i>	F 5'TTC GGG GTG TAG CGG TCG T-3' R 5'GCC CCA ATA CTA AAT CAC GAC G-3'	101
<i>KLF6</i>	F 5'CGGGCAGCAATGTTATCTGTCCCTTC-3' R 5'CCCTGCTATGTTTCAGCCTCAGAA-3'	171
<i>AR</i> ex1	ex1F1 5' CGCATCATCACAGCCTGTTGAA-3' Ex1R1 5' GGTCAGCGGAGCAGCTGCTTA-3'	630
<i>AR</i> ex1	ex1F2 5'GAGTGCCACCCCGAGAGAGGTT-3' ex1R2 5'CCAGCGGGTTCTCCAGCTTGAT-3'	811

<i>AR ex1</i>	ex1F3 5'GGACACTTGAAGTCCCGTCTA-3' ex1R3 5'GCAGGTAGGAGCCGCTAGATA-3'	692
<i>AR ex2</i>	F 5'GCCTGCAGGTTAATGCTGAA-3' R 5'GGGCCTTGCCAATGACTCTA-3'	363
<i>AR ex3</i>	F 5'CCTGCCATACTCTGTCCACTT-3' R 5'CCCTTGGAAGCATCAAAGAA-3'	354
<i>AR ex4</i>	F 5'GACCAGGGAGAATGGTGAT-3' R 5'GCCTGAGTTAATGGGCAGAA-3'	506
<i>AR ex5</i>	F 5'GGATGGTCCCTGGGGATCCTTA-3' R 5'GCGACAAGTGCAGATCAAAT-3'	386
<i>AR ex6</i>	F 5' CCTGGAGCACCAGCAGGAGAA-3' R 5'CCAGGAGCTGGCTTTTCCCTA-3'	365
<i>AR ex7</i>	F 5'CCCAAGCACACAGACTTCAA-3' R 5'GCCAGACTCTAGAGAAGCATA-3'	390
<i>AR ex8</i>	F 5' GGGAGGACCAAGGAAGTA-3' R 5'CCAGCAAATAGAATTCAGGAA-3'	447
<i>AR (CAG)_n</i>	F 5'TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3' R 5'GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3'	288

Оптималните концентрации на компонентите в реакционната смес при PCR на *PCA3*, *T2-ERG* фузии, *B2M*, *GSTP1* и *KLF6*, са посочени в Таблица 7.

Таблица 7. Оптимална концентрация на компонентите в реакционната смес за амплификация на *PCAZ*, *T2-ERG*, *B2M*, *GSTP1* и *KLF6* гена.

Компоненти на реакционната смес	Обем (μl)
Високомолекулна ДНК или кДНК	2
Праймер F (20 pmol/ μl)	0,4
Праймер R (20pmol/ μl)	0,4
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM)	1
10x буфер	1
Prime Taq ДНК полимераза	0,05
Дестилирана вода	5,15
	До краен обем 10 μl

Оптималната концентрация на компонентите в реакционната смес за размножаване на *PCAZ* при провеждане на алтернативен real time PCR са посочени в Таблица 8.

Таблица 8. Оптимална концентрация на компонентите, участващи в амплификация на *PCAZ* гена чрез real time PCR.

Компоненти на реакционната смес	Обем (μl)
Високомолекулна к ДНК	4
Праймер F (30 pmol/ μl)	2
Праймер R (30pmol/ μl)	2
Taq man <i>PCAZ</i> probe (20pmol/ μl)	2
Master mix (съдържа разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ, буфер и ДНК полимераза)	10
	До краен обем 20 μl

В процеса на оптимизиране на условията за амплификация, беше съставен следният първоначален протокол за размножаване на *PCAZ* и *B2M* гена в мултиплексна PCR реакция. PCR условията за амплификация са посочени в Таблица 9.

Таблица 9. Програма за провеждане на *PCAZ* и *B2M* амплификация (I вариант)

Протокол за провеждане на полимеразна верижна реакция (PCR)					
Компонент	обем [μl]	Стъпка	температура	времетраене	
ДНК	2	денатурация	95°C	10 min	
Праймер F [20 pmol/ μl]	0,4	денатурация	95°C	60 sec	} 40 цикъла
Праймер R [20 pmol/ μl]	0,4	анилинг	60°C	75 sec	
dNTPs	1	синтез	72°C	1 min	
10x буфер	1	синтез	72°C	10min	
ДНК полимераза	0,05		4 °C	30 мин	
dH ₂ O	5,15				
краен обем на реакцията	10				

Оптималната програма за амплификация на специфични *B2M* и *PCAZ* продукти, която беше предпочетена, като най-удачен вариант в разработката е посочена в Таблица 10.

Таблица 10. Оптималната програма за провеждане на PCR за получаване на специфични *B2M* и *PCAZ* продукти (вариант II).

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	10 min	1
Денатурация	95°C	30 sec	} 30 цикъла
Хибридизация на праймерите	60°C	75 sec	
Синтез	72°C	1 min	

Оптималната програма за амплификация на специфични *B2M* и *PCA3* продукти чрез real time PCR е посочена в Таблица 11.

Таблица 11. Оптимална програма за real time PCR за амплификация на *PCA3* и *B2M* фрагменти.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	10 min	1
Денатурация	95°C	30 sec	} 50 цикъла
Хибридизация на праймерите	60°C	75 sec	
Синтез	72°C	1 min	

Оптималната програма за провеждане на PCR за получаване на специфичните *T2-ERG* фузионни транскрипти е посочена в Таблица 12.

Таблица 12. Оптимална програма на PCR за размножаване на *T2-ERG* фузии (ex1/ex4;ex1/ex6)

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	2min	1
Денатурация	94°C	45 sec	} 40 цикъла
Хибридизация на праймерите	64°C	45 sec	
Синтез	72°C	45 sec	
Синтез	72°C	10 min	
	4°C	+/- безкрайност	

Оптималната програма за провеждане на PCR за получаване на специфични *GSTP1* продукти е представена в Таблица 13.

Таблица 13. Оптимална програма за специфична по отношение на метилирането PCR за амплификация на *GSTP1* промоторния регион (неметилиран здрав алел и/или метилиран патологичен алел).

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	10min	1
Денатурация	94°C	15 sec	45 цикъла
Хибридизация на праймерите	62°C	30 sec	
Синтез	72°C	30 sec	
Синтез	72°C	1 min	

Оптималната програма за получаване на *KLF6* специфичен генен продукт е посочена в Таблица 14.

Таблица 14. Оптимална PCR програма за получаване на специфичен *KLF6* ампликон.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	5 min	1
Денатурация	95°C	30 sec	35 цикъла
Хибридизация на праймерите	64°C	40 sec	
Синтез	72°C	30 sec	
Синтез	72°C	5 min	
	15°C	+/- безкрайност	

Оптималната концентрация на компонентите в реакционната смес при провеждане на PCR на *AR* екзоните (1-8) са посочени в Таблица 15.

Таблица 15. Оптимална концентрация на компонентите, участващи в PCR за намножаване на AR (ex1-ex8):

Компоненти на реакционната смес	Обем (µl)
Високомолекулна ДНК	2
Праймер F (20 pmol/µl)	1
Праймер R (20pmol/µl)	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM)	2
10x буфер	2,5
Prime Taq ДНК полимераза	0,1
Дестилирана вода	16,4
	До краен обем 25 µl

Оптималната програма за PCR за намножаване на AR екзоните е посочена в Таблица 16.

Таблица 16. Оптимална PCR програма за получаване на специфични AR амплификати (екзон1-8).

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	5 min	1
Денатурация	95°C	45 sec	} 30 цикъла
Хибридизация на праймерите	60°C	45 sec	
Синтез	72°C	1,30 sec	
Синтез	72°C	5 min	
	15°C	+/- безкрайност	

Оптималната концентрация на компонентите в реакционната смес при провеждане на PCR на AR CAG повтора е посочена в Таблица 17.

Таблица 17. Оптимална концентрация на компонентите, участващи в PCR за намножаване на AR (CAG) n повтора, локализиран в екзон 1.

Компоненти на реакционната смес	Обем (µl)
Високомолекулна ДНК	2
Праймер F (20 pmol/µl)	1
Праймер R (20pmol/µl)	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM)	2
10x буфер	2,5
DMSO	2
Betaine	4
Prime Taq ДНК полимераза	0,1
Дестилирана вода	10,4
	До краен обем 25 µl

Оптималната PCR програма за амплификация на AR CAG повтора е посочена в Таблица 18.

Таблица 18. Оптимална PCR програма за намножаване на AR CAG повтора, локализиран в екзон 1.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	5 min	1
Денатурация	94°C	45 sec	} 35 цикъла
Хибридизация на праймерите	60°C	45 sec	
Синтез	72°C	1,30 sec	
Синтез	72°C	7 min	
	15°C	+/- безкрайност	

Апаратура: За провеждане на PCR са използвани апарати: Applied Biosystems, USA;

3.2.2.3. Електрофореза в агарозен гел :

Количеството и качеството на получените амплификационни продукти чрез PCR се контролира посредством агарозна гел-електрофореза. Използва се 3% агарозен гел, хоризонтална електрофорезна система. ДНК фрагментите се разделят в зависимост от молекулната им маса, като пробите се анализират в присъствието на молекулен маркер, спрямо който се отчита дължината на намножения фрагмент. Визуализацията на получените продукти от PCR се осъществява чрез разтвори в агарозния гел етидиев бромид, който представлява интеркалиращ агент. Етидиевият бромид се вгражда между базите в ДНК молекулата и позволява визуализирането ѝ на UV – светлина.

Използвани буфери:

1x TBE буфер: TRIS – 90 mmol/l; Борна киселина – 90 mmol/l; Na 2EDTA – 1 mmol/l Буфер за нанасяне на пробите: 0,25% бромфенол блу; 25% фикол Апаратура: За изливане на агарозния гел: Микровълнова фурна – SM 20MW, SOGO, China; нивелирна масичка; ваничка за изливане на агарозен гел (2500x1800 mm); стартови гребени с размер 2x22 бр., размери на ямките 5x4x1 mm;

За провеждане на електрофорезата:

Апарат за хоризонтална подводна гел- електрофореза A. Hartenstein, Wuerzburg, Germany; токоизправител Consort EV222, Turnhout, Belgium; За визуализиране на пробите: Трансилюминатор LKB Bromma 2011 Macrovue, LKB Vertriebs GmbH, Vienna, Austria. За архивиране на получените резултати: Фотодокументационна система: Alpha DigiDoc Pro, Alpha Innotech, Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, CA, USA.

3.2.2.4. Фрагментен анализ в полиакриламиден гел.

Приготвяне на пробите за електрофоретично разделяне: По 2.5 µl от всяка амплифицирана проба се смесват с 12 µl Ni-Di формамид (Applied Biosystems) и 0.6 µl ROX 500 size standard (Applied Biosystems). Така приготвените проби се денатурират на 95°C – 5 мин и се поставят в лед.

Капилярна електрофореза: Електрофорезата се провежда на къса капиляра 47 см (Applied Biosystems) в полимер POP4 (Applied Biosystems).

Визуализиране и отчитане на пробите:

Електрофоретичния профил се обработва и анализира посредством програмата ABI310 GeneScan v3.1.2, при което се получават в готов вид под формата на електрофореграма.

Апаратура:

За провеждането на MLPA анализа се използва PCR апарат GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA; Bioer XP cycler, Hangzhou, P.R. China

Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

3.2.2.5. Електрофореза за фрагментен анализ на денатуриращ полиакриламиден гел на ALFexpress автоматичен секвенатор.

Приготвяне на полиакриламиден гел

Стъклата на апаратурата за вертикална електрофореза се измиват с топла вода, детергент и дейонизирана вода. Накрая се почистват със спирт. Апаратурата се сглобява, като се поставят ограничителните ленти (спейсери). Върху всяко стъкло в областта на стартовете се нанасят по 25 µl смес Bind Silan, която се разпределя равномерно по ширината на стъклото. Остатъкът се попива с филтърна хартия. Стъклата се почистват с обезпрашаваща салфетка и спирт, така че да се отстранят всички пращинки, които може да доведат до разсейване на лазерния лъч. Поставят се почистените със спирт и обезпрашени кварцови спейсери и апаратурата се сглобява. Гелът се излива между двете стъкла, без да се допуска образуването на мехурчета въздух. Поставя се гребенът между двете стъкла.

За изливането на 6% 7М урея денатуриращ полиакриламиден гел (ПААГ) се смесват:

- 45 ml 40% 19:1 (AA:БАА)
- 18 ml 10 X ALF TBE буфер
- 126 g 7М Урея
- dd H₂O до 300 ml краен обем

Гелната смес се филтрува с филтър 0,45 и се смесват

- 35 ml изходен разтвор за ПААГ
- 40 µl TEMED
- 160 µl 10% APS

Подготовка на пробите

По 3 µl от всяка амплифицирана проба се смесват с по 3 µl буфер за нанасяне, съдържащ декстранблу 2000 в дейонизиран формаид и вътрешен стандарт. За вътрешен стандарт се използват PCR-продукти с дължина 106 и 347 б. дв. Поради присъствието обаче на маркера AMEL (който дава продукт с дължина 106 б. дв. при жени и 106/112 б. дв. при мъже) е използван само стандарт за 347 б. дв. Пробите се денатурират за 5 мин. на 94°C, след което се поставят на лед и се нанасят на денатуриращия полиакриламиден гел.

Електрофореза на ALFexpress автоматичен секвенатор

Електрофорезата се извършва на автоматичен секвенатор ALFexpress (Pharmacia). Стартира се софтуерът за работа с автоматичния секвенатор. Задават се следните параметри за електрофореза: 1500 V, 70 mA, 45 W, 50°C, интервал на отчитане на емитирания сигнал – 1 sec.

Стартира се пре-електрофореза за 10 минути, след което денатурираните проби се нанасят на стартовете на полиакриламидния гел. Същинската електрофореза продължава средно 250 min, като времето за разделяне на фрагментите се определя от дължината на използвания по-дълъг вътрешен стандарт (в случая – 347 б. дв.). Амплификационните продукти се анализират с помощта на съответния софтуер – Fragment Manager V1.2 software (Pharmacia), който автоматично изчислява относителните площи на пиковете на флуоресценция.

Апаратура:

За провеждането на полиакриламидна електрофореза е използван автоматичен секвенатор ALFexpress (Pharmacia).

3.2.2.6. Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди. Принцип на метода на Sanger:

Секвенирането е ензимен метод за определяне на нуклеотидната последователност на участък от ДНК. Използва се реакция за синтез *in vitro* на ДНК вериги върху едноверижна матрица с участието на ДНК полимераза. Полимеразната реакция се инициира на точно определено място, където синтетични олигонуклеотидни зародиши (праймери) хибридизират с матрицата. Чрез случайно включване на нуклеотидни аналози, които не позволяват удължаване на растящата верига, реакцията се прекратява в различни места. Като такива аналози се използват 2', 3'-дидезоксинуклеозид 5'-трифосфати (ддНТФ). Те спират изграждането на ДНК веригата, тъй като нямат 3'-хидроксилна група. Ензимът Thermo Sequenase II ДНК-полимераза е термостабилна ДНК-полимераза, толерантна към високи солеви концентрации и с висока процесивност. Това позволява използването ѝ за ДНК синтезата *in vitro*, която се извършва чрез PCR реакция. В резултат на това се получават различни по дължина вериги с еднакво начало и различен край, определен от включването на един от четирите вида ддНТФ. Тези фрагменти се разделят електрофоретично. Визуализацията им може да се осъществи по различен начин в зависимост от това с какво са белязани терминаращите дидезоксинуклеотиди.

Принцип на работа на автоматичен секвенатор ABI310 Sequence Genetic Analyzer: В настоящото изследване за разделянето на фрагментите е използван автоматичен секвенатор ABI310 Sequence Genetic Analyzer на фирмата Applied Biosystems. Разделянето на фрагментите в автоматичния секвенатор ABI310 се извършва на принципа на капилярната гел-електрофореза. Използваните при секвенционната реакция терминаращи дидезоксинуклеотиди са флуоресцентно белязани, поради което се осъществява лазерна детекция. Всеки от четирите дидезоксинуклеотида (ddG, ddA, ddT и ddC) е белязан с два флуорофора – флуоресцин и един от четирите типа родамин. Флуоресцинът има висок екстинкционен коефициент при дължината на вълната 488 nm. (това е и дължината на вълната, емитирана от аргоновия лазер, който се използва в автоматичните секвенатори). Играейки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния лъч и я прехвърля към акцепторния родамин върху същата молекула. Всеки от четирите акцептора емитира светлина с определена

дължина на вълната, която се детектира от апарата и така се идентифицира съответният нуклеотид.

3.2.2.7. Секвениране на получените специфични фрагменти в настоящата разработка: *GSTP1* неметилиран (непатологичен) алел и метилиран (патологичен) алел, *T2-ERG* фузии, *AR* екзони, *KLF6*-таргетна секвенция):

Процедура:

- Пречистване на амплификационните продукти
- Провеждане на секвенционна реакция
- Анализ на секвенционните реакции чрез автоматичен секвенатор

Пречистване на амплификационните продукти

Аликвоти от намножените фрагменти се подлагат на пречистване с екзонуклеаза I (Exo) и алкална фосфатаза, изолирана от скариди (Shrimp Alkaline Phosphatase - SAP). Ензимната обработка протича на 37°C за 30 мин и неутрализиране на ензимите на 80°C за 15 мин.

Секвенционна реакция

Пречистените продукти се секвенират по Sanger с помощта на кит за секвениране BigDyeTerminator v.3.1 (Applied Biosystems) - включващ Thermo Sequenase II ДНК-полимераза и флуоресцентно белязани нуклеотиди. Реакцията се извършва в специфичен секвенционен буфер и малко количество праймер (праймерът може да е идентичен с използваните в амплификационната реакция или специфичен за секвениране). Следва се работния протокол, предложен от производителя. Реакцията за секвениране чрез cycle sequencing се извършва отново в апарат за PCR - GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

Анализ на секвенционните реакции чрез автоматичен секвенатор

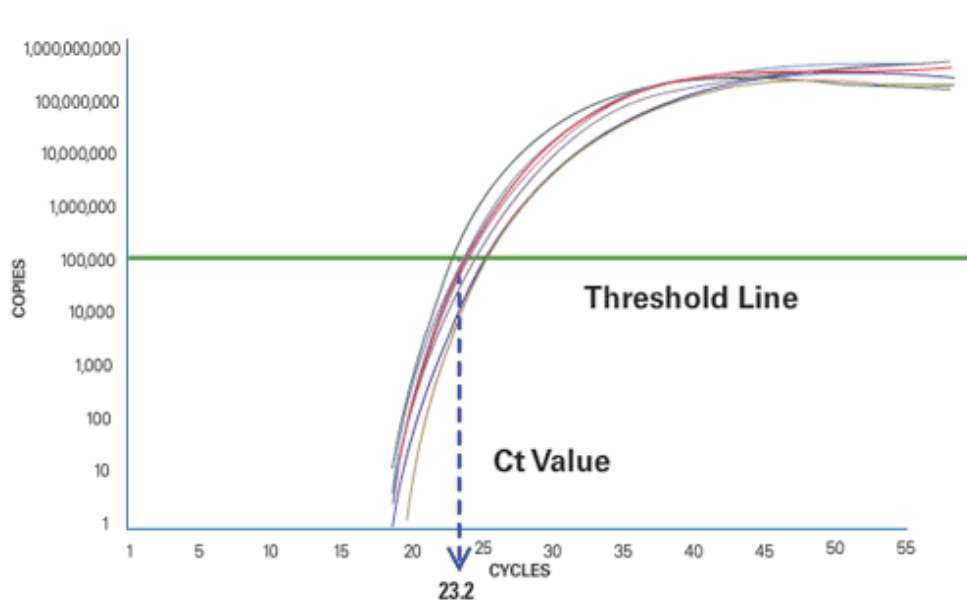
Продуктите на секвенционните реакции се преутаяват с помощта на 3М натриев ацетат (pH 5.3)/125mM EDTA (pH 8) и абсолютен етанол, изсушават се и се разтварят в Ni-

Di TM Formamide. Следва електрофоретично разделяне чрез капилярна гел-електрофореза на автоматичен секвенатор ABI Prism 310 Sequence Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Отчитането на фрагментите става чрез лазерна детекция на флуоресцентно белязаните нуклеотиди, намиращи се в кита за секвениране BigDyeTerminator v.3.1 (Applied Biosystems). Получените данни се събират и обработват със специализирана програма Sequencing Analysis v3.4.1.

3.2.2.8. Real time PCR - метод за количествен анализ

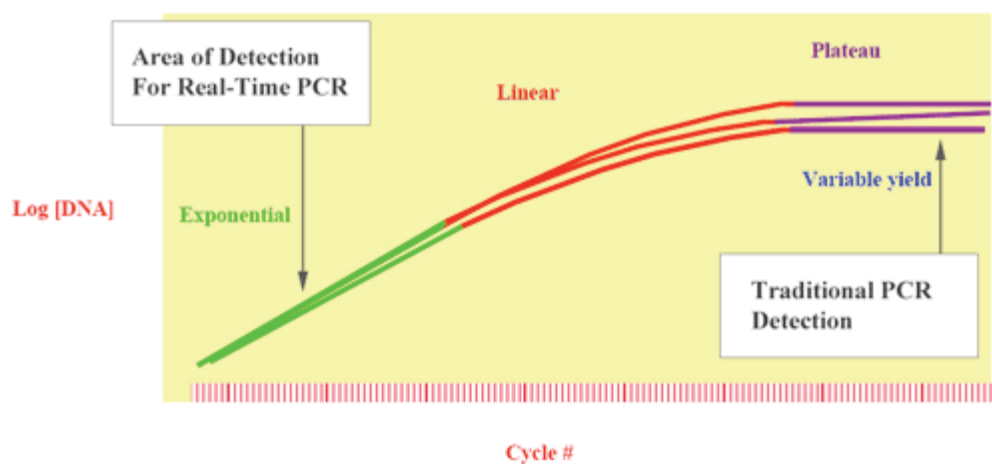
Базира се на детекцията и количественото определяне на флуоресцентното багрило (секвенциално специфично или неспецифично) във всеки един отделен цикъл на PCR реакцията. Не е необходим гел за анализ, което има своите предимства, свързани с избягването на: занижена прецизност, ниска чувствителност, ниска разделителна способност, невъзможност за изразяване на резултатите в числови стойности и др. Метода позволява непрекъснато наблюдение на акумулираните продукти от PCR по време на амплификацията, като измерва флуоресциращото излъчване, като индикатор за копираните продукти за всеки един цикъл PCR в реално време.

Първото значително повишение на количеството на продукта от PCR реакцията (Ct–прагов цикъл) корелира с началното количество ДНК (Фигура13).



Фигура 13. Ct –прагов цикъл на реакцията, равен на изходното количество матрица (ДНК, РНК), което позволява количествено определяне.

Двата метода (конвенционален PCR и real time PCR) ни позволяват да отчетем резултатите в различен етап от амплификацията. Конвенционалният PCR метод ни дава възможност да видим продукта на последния цикъл – момента когато реакцията е достигнала плато. PCR в реално време ни позволява да видим как се увеличава броя на копията на нашия продукт през цялото време на реакцията. По този начин можем да отчетем реалните разлики в началните количества на матрицата в различните проби. Нарастването на флуоресценцията с всеки изминал цикъл от експоненциалната фаза е право пропорционално на увеличението на броя копия на продукта (Фигура 14).



Фигура 14. Фази на амплификационната реакция. Области на детекция на амплификатите при двата метода: real time PCR-експоненциална фаза; PCR-плато.

Съществуват два варианта на количествен анализ:

- абсолютен – измерва се точния брой копия от дадена нуклеотидна последователност;
- относителен – определя се колко пъти повече/по-малко е дадена последователност в сравнение с референтна такава.

Основни принципи на количествения PCR:

Техника на хидролизационни „probe” секвенции

Хидролизационните „probe” секвенции са свързани с флуорохромен сигнален попивател, който абсорбира флуоресциращите сигнали от флуорохрома на сигналния флуорохром докато „probe” е свързан. Впоследствие при амплификация на определена

секвенция хидролизационният „probe“ се размества, след което се хидролизира от Taq полимеразата. Това води до разделяне на сигналния и попиващия флуорохром и вследствие на това флуоресциращия репортерен флуорохром се установява. По време на всеки следващ цикъл, този сигнал на флуоресциране се засилва поради прогресивното и експоненциално акумулиране на свободни сигнални флуорохроми.

Техника на хибридизационните “Hybprobes” секвенции

Това са олигонуклеотиди, комплементарни на участък между двата праймера. В 5' края му е разположен флуорофор, а в 3' края т. нар. затихвател (quencher). Когато върху пробата попадне лазерен лъч, високо енергийния флуорофор поема фотона, но ниско енергийния затихвател подтиска светенето му. В хода на амплификацията полимеразата започва да добавя нуклеотиди към 3' края на праймера, а когато наближи пробата я разгражда (5'>3' екзонуклеазна активност). Разпадането на пробата раздалечава флуорофора от затихвателя, в резултат на което той започва да свети. Съществуват две основни приложения на флуоресцентно белязаните TaqMan проби за PCR в реално време:

- количествен анализ – определяне на брой копия от дадена секвенция.
- алелна дискриминация – разграничаване на два (или повече) варианта на една и съща секвенция.

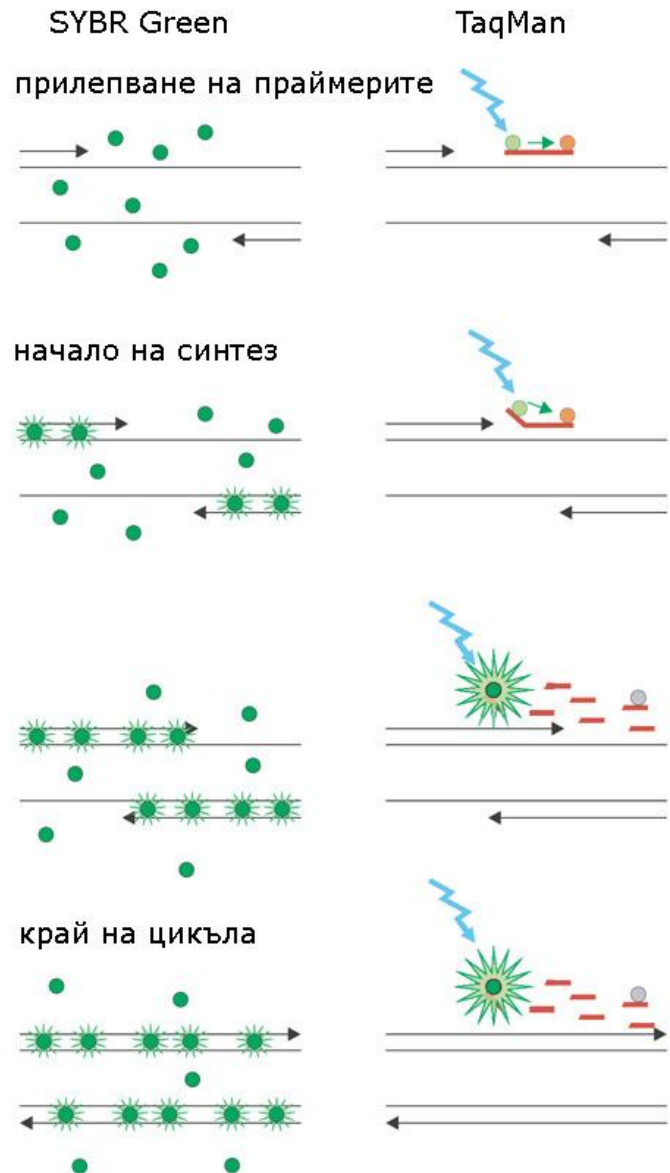
За нуждите на количественият анализ използваме факта, че TaqMan пробите ни позволяват да отчетем броя на ново синтезираните фрагменти през експоненциалната фаза на амплификацията.

Когато трябва да различим алели, използваме проби, които са комплементарни на съответните варианти и са белязани с различни флуорофора.

Техника на SYBR Green белязане

Молекулите на SYBR Green багрилото интеркалират с ДНК – когато се закачат за малката бразда на двойно верижните спирали те започват да флуоресцират. Предимства на SYBR Green детекцията е, че е универсален маркер, който не изисква специфични проби, икономически по-изгоден, по-висока чувствителност, която се постига чрез закачането на много флуорофорни молекули към продукта. Недостатък е, че ако се прилага за провеждане на алелна дискриминация се изисква сериозна допълнителна оптимизация.

Също така съществува риск от фалшиво-положителен резултат, поради възможността на багрилото да бележи и неспецифични продукти (Фигура 15).



Фигура 15. Принцип на количествения PCR в реално време, фази. SYBRGreen и TaqMan белязани.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ:

4.1. Клинични групи, включени в проучването.

Обект на молекулярно-генетични изследвания в настоящия дисертационен труд са 150 пациента, разпределени в групи според конкретната патология засягаща простатната жлеза (Таблица 19).

Таблица 19. Клинични групи, участващи в проучването.

Диагноза:	Описание:	Брой пациенти:
1. Агресивен ПК (КРПК):	Кастрация резистентен простатен карцином (КРПК), установен в хода на АПТ чрез ПСА мониторинг.	13
	Хормонално-податлив агресивен ПК с неблагоприятна клинично-патологична прогноза, висок риск от рецидив. Клиничен ход : трансформация към КРПК.	5
2. Неагресивен ПК:	Първичен, индолентен ПК с нисък риск от биохимичен рецидив.	83
3. ДПХ:	Доброкачествена простатна хиперплазия.	25
4. Простатит:	Хронично възпалително заболяване на простатата.	24

Възрастта на пациентите, участващи в разработката варира между 37 и 87 години, като средната възраст е 66г. Резултатите от клинично-генетичните изследвания са съобщени в 4 публикации [Tsvetkova et al., 2015; Цветкова и сътр., 2013/2014/2015].

4.1.1. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-биологична методика за оценка на експресионните нива на тумор-специфичния маркер *PSA3*.

По време на реализацията на настоящата разработка, методите използвани за детектиране и оценка на тумор-специфичния маркер *PSA3* претърпяха многостъпкова промяна и развитие с цел избор на най-добрата и информативна методика.

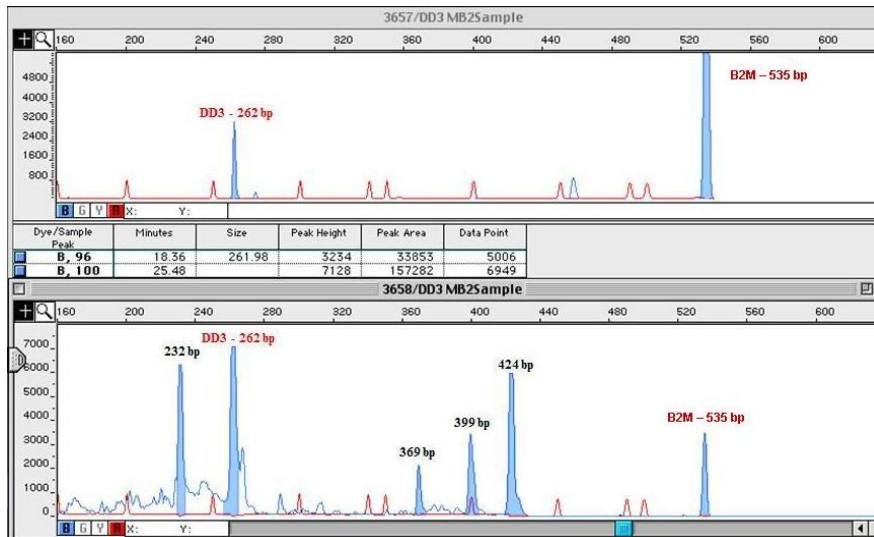
По отношение на изолирането на РНК от неинвазивни уринни проби бяха изпробвани няколко комерсиални кита с добри отзиви за РНК добив при рутинна употреба в предклиничната практика (AmpliSens RNA isolation kit Ecoli s.r.o, Slovak Republic; EXTRACTME Total RNA kit, Gdansk, Poland). Бяха спазени стандартните изисквания за стерилност и избягване на потенциална контаминация (филтър връхчета, DEPC вода и др.) при екстракция на РНК. Въпреки това, РНК добивът не удовлетвори изискванията на екипа. По тази причина бяха въведени лабораторни протоколи за колектиране на уринни проби, чрез използване на 0,5 М ЕДТА стабилизатор за начално транспортиране, както и за предобработка до получаване на уринен седимент.

В резултат на множество проведени експерименти и консултации беше разработен и оптимизиран протокол за изолиране на високомолекулна РНК от уринен седимент и тъканни проби (виж глава „Материали и Методи“).

Бяха въведени оптимизации по отношение на хомогенизирането на тъканните проби (“tru-cut” биопсии и свежи тъкани от солидни тумори, след простатектомия, аденомектомия и биопсичен тур), което е от значение за изолирането на качествена и в достатъчно количество РНК, особено при “tru-cut” биопсиите където разполагаме с минимално количество тъканен материал (1-2 цилиндъра).

Изследване на *PCА3* и *B2M* гена в качеството му на вътрешна контрола чрез амплификация на копии ДНК: Амплификационните продукти от двата гена бяха проверени по отношение на интензитет и специфичност на хоризонтална агарозна електрофореза след оцветяване с етидиев бромид. Поради нужда от допълнителна оптимизация първоначалният протокол претърпя промени – чрез промяна температурата на анилинг, като максималната температура на анилинг не бива да надхвърля теоретично определената температура на праймерите и това беше спазено. Поради твърде голямата разлика в размерите на двата фрагмента *PCА3* (262bp) и *B2M* фрагмента (535bp), получените резултати не бяха задоволителни. В редица случаи се наблюдаваше преимуществена амплификация на един от двата фрагмента и нелогична загуба на фрагмент, който трябва да присъства в профила на контролна проба. На тази база се наложи промяна в експеримента: намалихме размера на *B2M* фрагмента от 535 bp на 317 bp., което доведе до оптимална амплификация на двата фрагмента (контролен *B2M* и простатно тумор-специфичен *PCА3*) в мултиплексна реакция при всички използвани

контроли. В пациентски проби, обаче резултатите бяха все още незадоволителни поради намаляване чувствителността на *PCA3* амплификацията. На Фигура 16 е показан електрофоретичен профил на използвани стандарти (контролни проби) при размер на *B2M* фрагмента 535 bp.



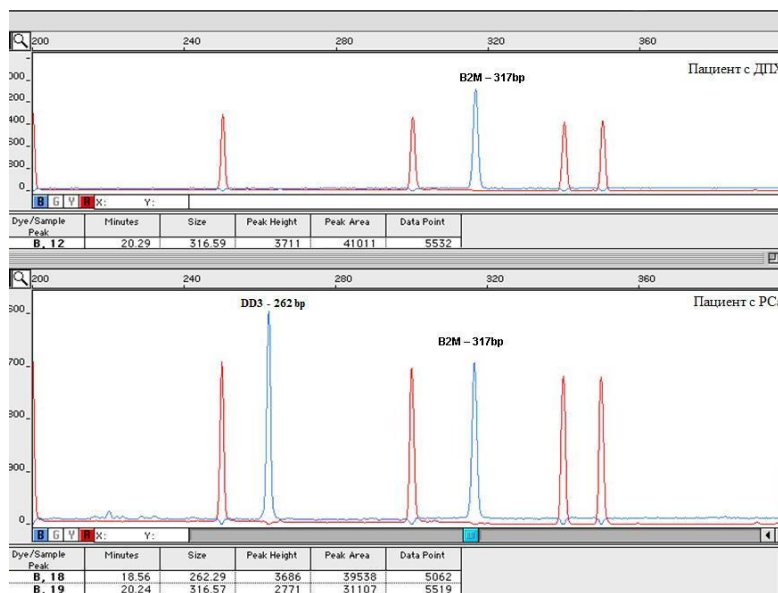
Фигура 16. Електрофорограмен профил при фрагментен анализ на маркери *PCA3(DD3)* и *B2M*.

При първата проба номер 3657 (ДПХ в култивирана клетъчна линия), се детектират два основни пика. Единият пик 535 бд. е генът, използван за вътрешна контрола *B2M*, а другият по-слаб пик 262 бд. е маркерът *PCA3(DD3)*. Втората проба номер 3658 е контрола с простатен карцином в култивирана клетъчна линия. Освен очакваните фрагменти с размери 262 бд и 535 бд се получават множество допълнителни неспецифични фрагменти, които се наблюдаваха само в тази проба и се прие, че са свързани с артефакти в култивираната клетъчна линия. Прави впечатление, че при злокачествената простатна клетъчна линия, сигналът за *PCA3* (височина и площ на пика) е с доста по-голям интензитет, отколкото сигналът за контролния *B2M* ген, обратно на профила при ДПХ.

При проби от пациенти успехът на анализа зависи от фазата на заболяването и вида на биологичната проба. Предполага се, че туморната формация, експресираща специфичния маркер *PCA3* е в пъти по-малко съотношение спрямо здравата тъкан. В

резултат на това предприехме стратегия, целяща засилване чувствителността на *PCAZ* амплификацията. Беше въведен нов протокол за амплификация, чрез който в отделни реакции се размножават *PCAZ* и *B2M* гените върху едно и също количество изходна копи ДНК матрица. Този начин на провеждане на анализа се наложи с цел максимално да се избегнат възможни субективни фактори и разлики в протичане на амплификацията на фрагментите.

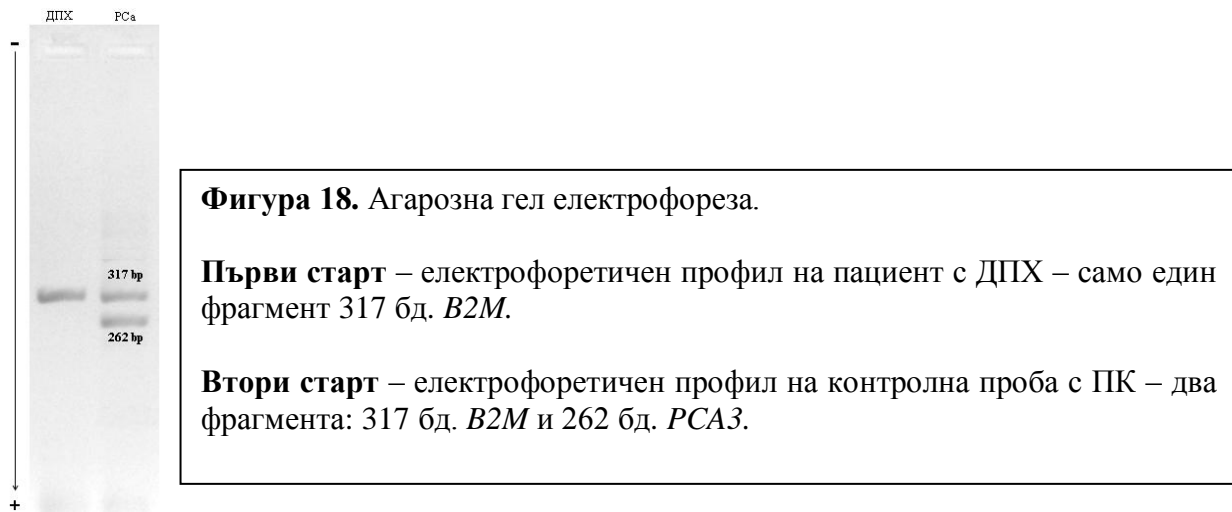
След като беше утвърден протоколът за амплификация на *PCAZ*, първоначално резултатите бяха анализирани чрез фрагментен анализ на автоматичен секвенатор ABI310. За целта, амплификационните *PCAZ* и *B2M* продукти бяха смесени в обща реакция в еквивалентни количества. Приложението на оптимизираните методики при реални проби от пациенти доведе до задоволителни резултати, приложими за диагностични цели. На Фигура 17 са представени резултати от фрагментен анализ след оптимизация в методичния протокол и намаляване размера на амплифицирания контролен *B2M* ген от 535 бд. на 317 бд.



Фигура 17. Електроферограмен профил при фрагментен анализ на маркери *PCAZ* (*DD3*) и *B2M*.

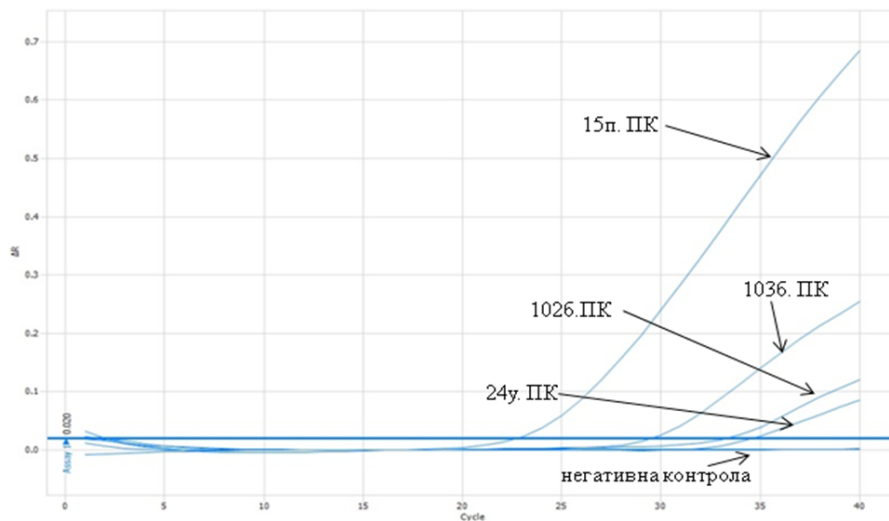
Проба номер 1 представлява молекулен профил при пациент с диагноза ДПХ. Детектира се добре изразен пик на *B2M* и липса на *PCAZ* (*DD3*) експресия. Проба номер 2 представлява амплифициран стандарт с ПК. Установяват се тумор-специфичния маркер и

контролния продукт. На Фигура 18 е представен агарозен електрофоретичен профил на същите две проби 1 и 2.

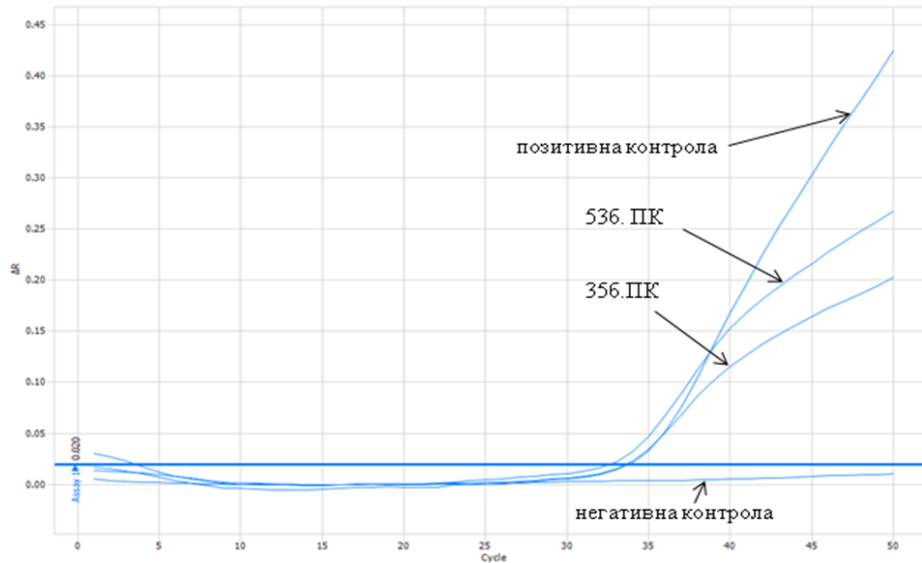


В допълнение, разширихме анализа на маркера *PC3* чрез приложението на друга методика на амплификация в реално време (real time PCR), с помощта на която се оценява количествено нивото на *PC3* експресия.

Бяха изпробвани 2 варианта на метода чрез SYBRgreen mix амплификация и чрез използване на TaqMan*PC3* probe и Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), като за диагностични цели се спряхме на варианта с TaqMan*PC3* probe. На Фигури 19 и 20 са показани резултати от real time PCR на *PC3* маркера.



Фигура 19. Резултати от *PC3* тумор-специфична експресия в различни видове биологични проби чрез real time PCR с TaqMan *PC3* проба. 15п.ПК- свежа тъкан от простатектомия; 1036. и 1026.ПК –”tru-cut “ биопсии; 24-уринен седимент.



Фигура 20. Резултати от *PCA3* тумор-специфична експресия в ”tru-cut “ биопсии чрез real time PCR с TaqMan *PCA3* проба: позитивен стандарт за ПК; ”tru-cut “ биопсии 536. и 356. на пациенти с ПК и негативна контрола.

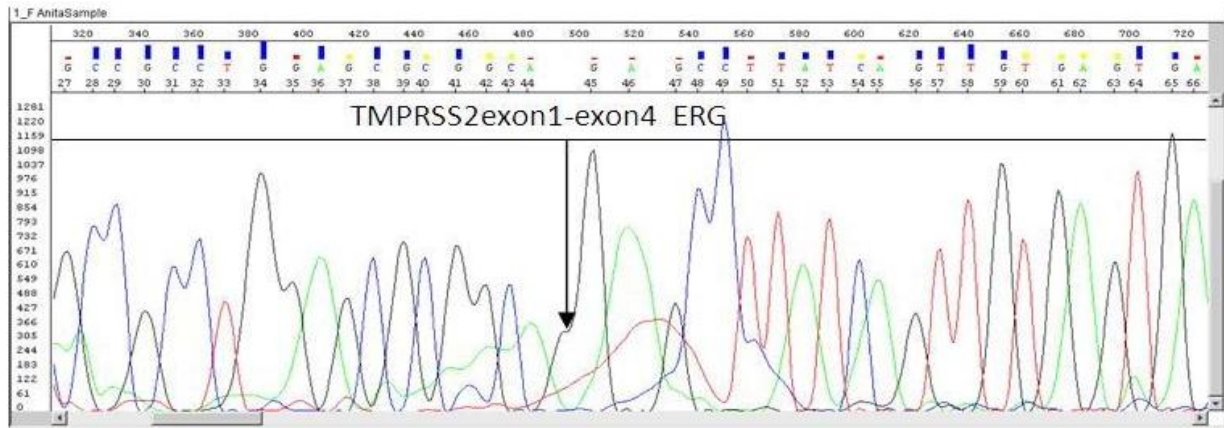
4.1.2. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-биологична техника за анализ на *T2-ERG* фузионните транскрипти.

При разработването на методика за анализ на специфични за ПК фузии между *TMPRSS2* и *ERG* гените бяха използвани аналогични стъпки на колектиране, предобработка и изолиране на биологичните проби, както при *PCA3* маркера. Същото важи и за етапите на обратна транскрипция и синтез на копи ДНК матрица за последващ анализ.

За дизайн на праймери за амплификация бяха използвани нуклеотидните последователности на копи ДНК от базите данни NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> както и програма за провеждане на виртуална полимеразна верижна реакция PCR (PRIMER 3) <http://simgene.com/Primer3>.

В хода на разработката, използвахме като стандарт клетъчна линия ПК, експресираща *T2-ERG* фузионен вариант. При наличие на фузионен транскрипт се получава амплификационен продукт 180бд., който се подлага на секвениране за идентифициране точката на сливане на двата гена.

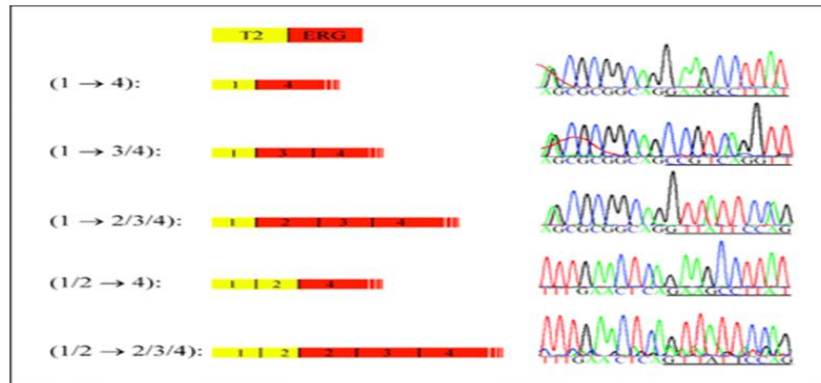
На Фигура 21 е показан секвенционен профил на *T2-ERG* фузионен вариант, получен при амплификация на контролната клетъчна линия ПК.



AGCGCGGCAGGAAGCCTTAT

Фигура 21. Секвенционен профил на най-честата *TMPRSS2ex1-ex4ERG* фузия в контролна проба клетъчна линия от ПК. Стрелката обозначава точката на сливане между двата гена.

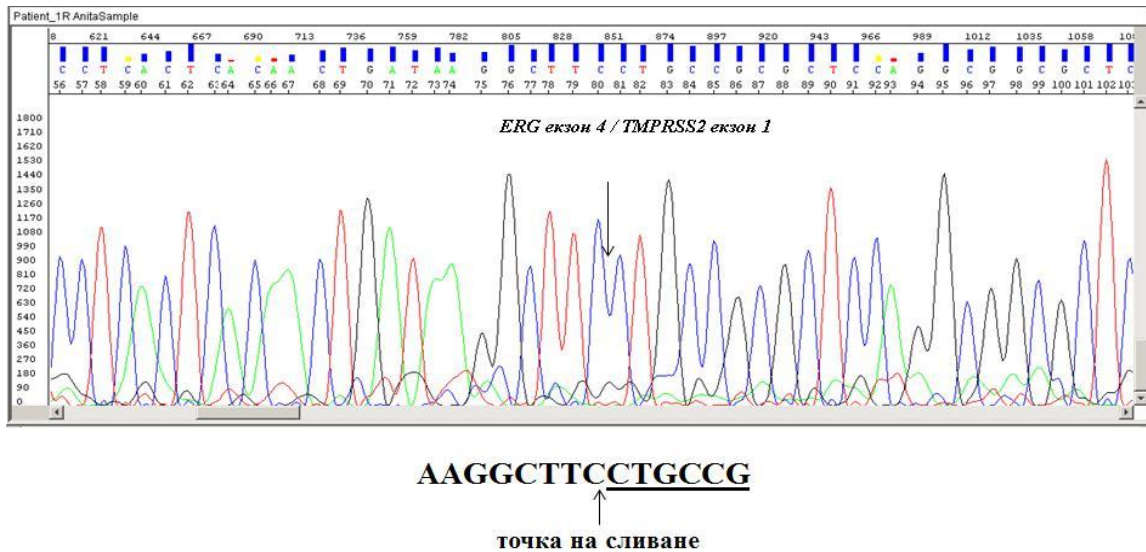
В литературата са описани редица фузионни варианти с вариабилна точка на сливане, което е демонстрирано на Фигура 22.



Daphne Hessels et al. 2007

Фигура 22. Вариабилност на горещата точка на сливане между гените *T2* и *ERG*.

На Фигура 23 е показана *T2-ERG* фузия детектирана при наш пациент с ПК.



Фигура 23. Секвенционен профил, представящ точката на сливане на гените *TMPRSS2* и *ERG* при пациент с ПК.

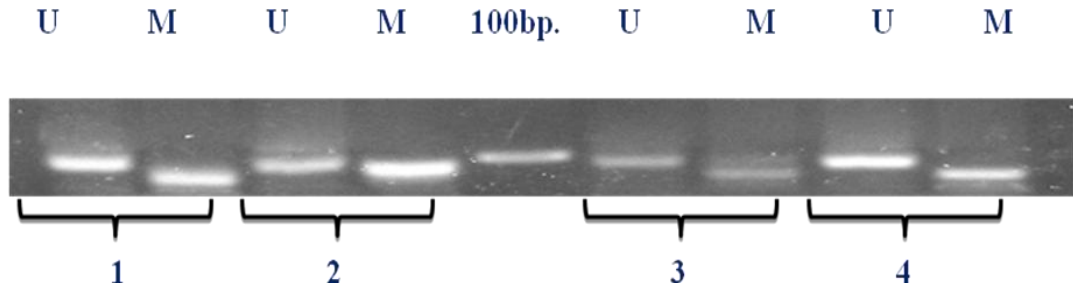
В анализираната от нас група български пациенти беше детектиран само един вариант на фузионен транскрипт, идентичен с показания по-горе на Фигура 23. Този вариант е аналогичен на наблюдавания в контролната проба (виж Фигура 21), попада в същите екзони (екзон 1 на *T2* и екзон 4 на *ERG* гените) и спада към най-честите фузионни транскрипти с диагностична значимост. При анализ на *T2-ERG* маркера беше използвана допълнителна потвърдителна амплификационна реакция за проверка на копи ДНК синтеза, като за целта се използва същият хаускипинг ген *B2M*, както при *PCA3* анализа (виж глава „Материали и Методи“).

4.1.3. Оптимизиране на методика за анализ на промоторно хиперметиране в *GSTP1* гена чрез специфична по отношение на метилирането амплификация (MS-PCR).

За размножаване на част от *GSTP1* гения промоторен регион, бяха използвани две двойки праймери за извършване на специфична по отношение на метилирането полимеразна верижна реакция (MS-PCR). Намножават се два вида PCR фрагменти, според статуса на пациента: неметиран здрав алел и/или метилиран патологичен алел, доказващ наличие на неоплазма.

По отношение на бисулфитното конвертиране на изолираната ДНК матрица направихме някои промени, касаещи основно уринните проби. Уринните проби са по-бедни на клетъчен материал и ДНК концентрацията е значително по-ниска, поради което увеличихме двойно изходната ДНК. Същият протокол беше използван и за кръвни проби.

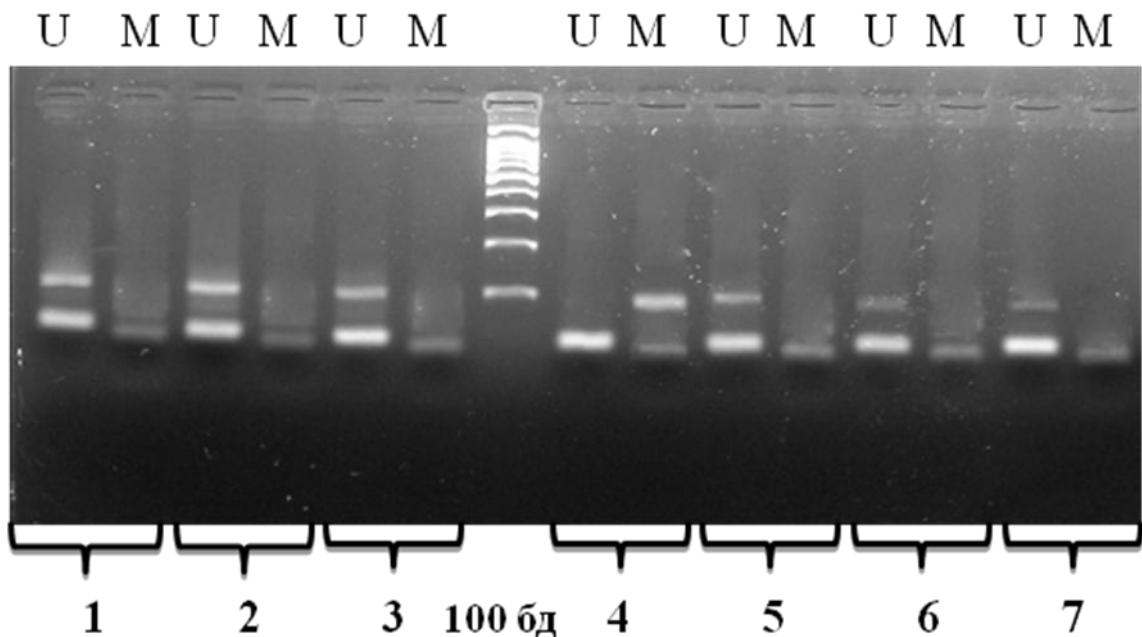
На Фигура 24 е показана снимка на агарозен гел с профил на *GSTP1* промоторно хиперметиране.



Фигура 24. Агарозен гел, представящ получените метилирани и неметилирани фрагменти при анализ на промотора на гена *GSTP1*.

- 1). Пациент с рак на простатата - свежа тъкан от простатектомия
 - 2). Пациент с рак на простатата – “tru-cut”биопсия
 - 3). Пациент с рак на простатата (=1) –венозна кръв, след 1г. лечение
 - 4). Пациент с доброкачествена простатна хиперплазия (ДПХ), множествени кисти, хроничен простатит и PIA находки - биопсичен тур.
- U- неметилиран алел (норма) M –метилиран алел, доказателство за неопластичност.

На Фигура 25 е представен резултат от анализ на *GSTP1* промоторно хиперметиране в различни проби от изследваните пациенти.



Фигура 25. Агарозен гел, представящ промоторно хиперметиране на *GSTP1* гена в различни проби.

1- 3). Пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия (ДПХ).-биопсичен тур.

4). Пациент с рак на простатата – “tru-cut”биопсия- (първоначален стадий)

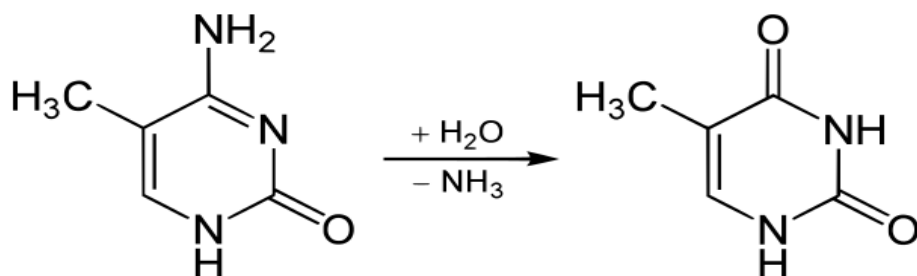
5= 4). Венозна кръв от пациент с рак на простатата. (първоначален стадий)

6-7). Пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия (ДПХ).-уринен седимент.

U-неметиран алел (норма) M –метиран алел, доказателство за неопластичност.

След провеждане на MS-PCR, получените фрагменти при извадка от двама пациента бяха изрязани и екстрахирани от агарозния гел с цел последващо секвениране. Секвенирането на специфичните *GSTP1* фрагменти (метиран и неметиран) целеше да потвърди специфичността на MS-PCR метода. Метираните и неметираните алели се модифицират различно в присъствието на натриев бисулфит [Clark et al., 1994]. Натриевият бисулфит конвертира цитозиновите остатъци до урацилови остатъци в едноверижни ДНК фрагменти, докато метилираният цитозин (5-метилцитозин) остава непроменен. В хода на последващата амплификация цитозиновите остатъци представляват метилрани остатъци в изходната верига, докато неметираният цитозин, конвертиран в урацил се детектира като тимин в получения амплификационен продукт. По този начин бисулфитното конвертиране позволява визуализиране и разграничаване на метилиран от

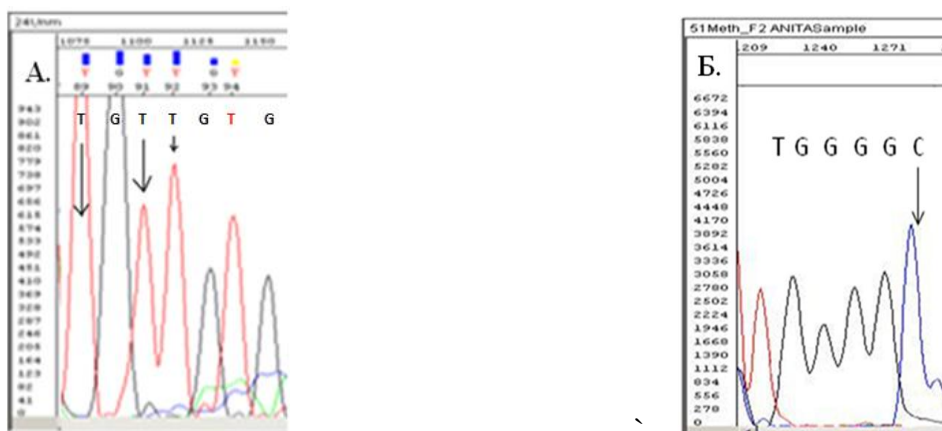
неметилиран фрагмент. Метилираният хомолог е неактивен, докато неметилираният е транскрипционно активен (Фигура 26).



Фигура 26. Мутагенеза чрез дезаминиране на 5-метил цитозин до тимин.

Резултат от бисулфитно конвертиране при пациент от нашата извадка е представен на Фигури 27А и Б. Върху приложената част от секвенция се наблюдава наличие само на Т бази (червени пикове) и липса на Ц бази в местата на CpG островите, което доказва на секвенционен ниво характерният профил на неметилиран *GSTP1* алел.

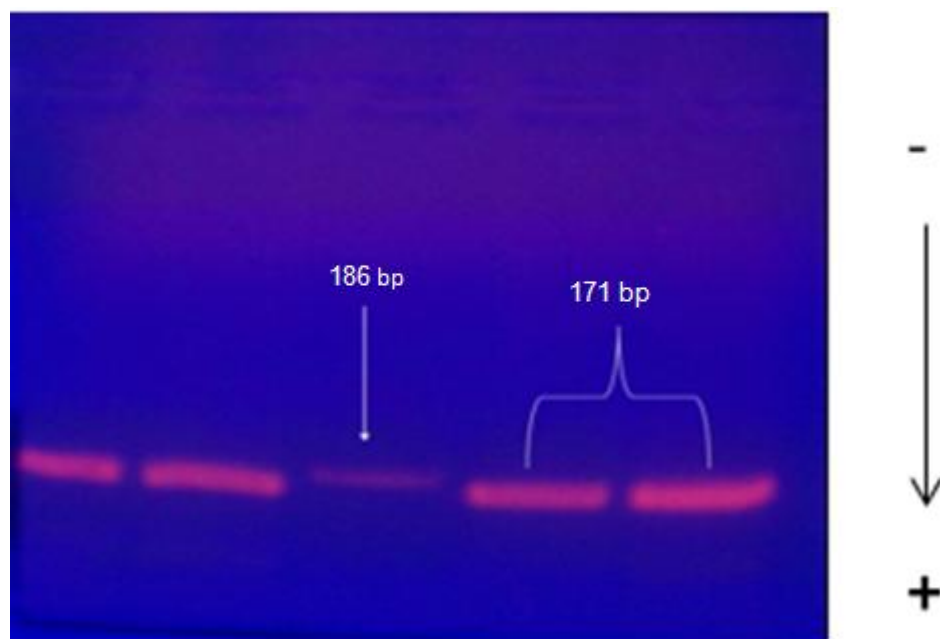
При секвенционния анализ на метилирания (неопластичен) алел, се наблюдава профил с наличие на запазени С бази в CpG островите.



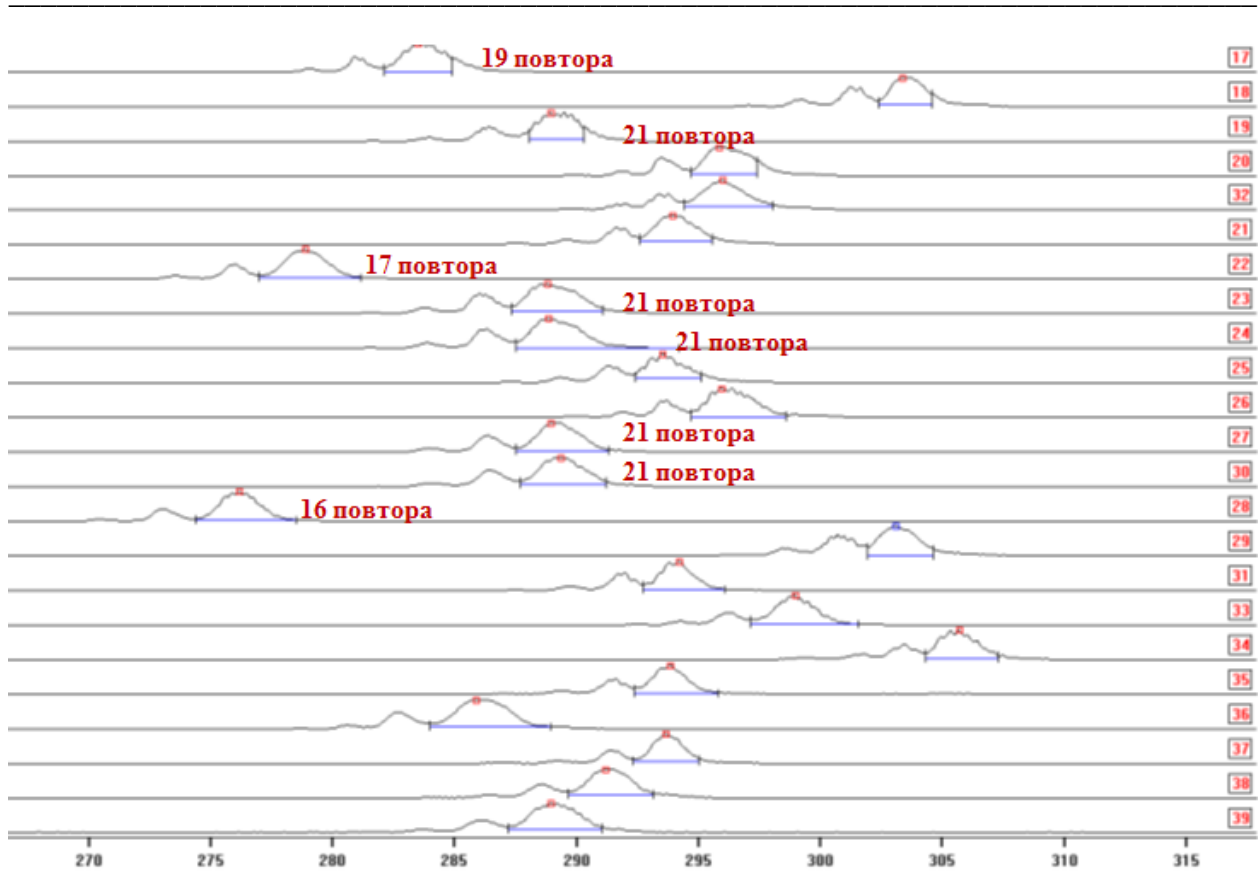
Фигура 27. Секвенционен профил на *GSTP1* алел в промоторната област на гена след бисулфитно конвертиране : А неметилиран *GSTP1* алел; Б метилиран *GSTP1* алел.

4.1.4. Въвеждане и оптимизиране на методика за анализ на IVS1-27:G/A полиморфизма в *KLF6* гена.

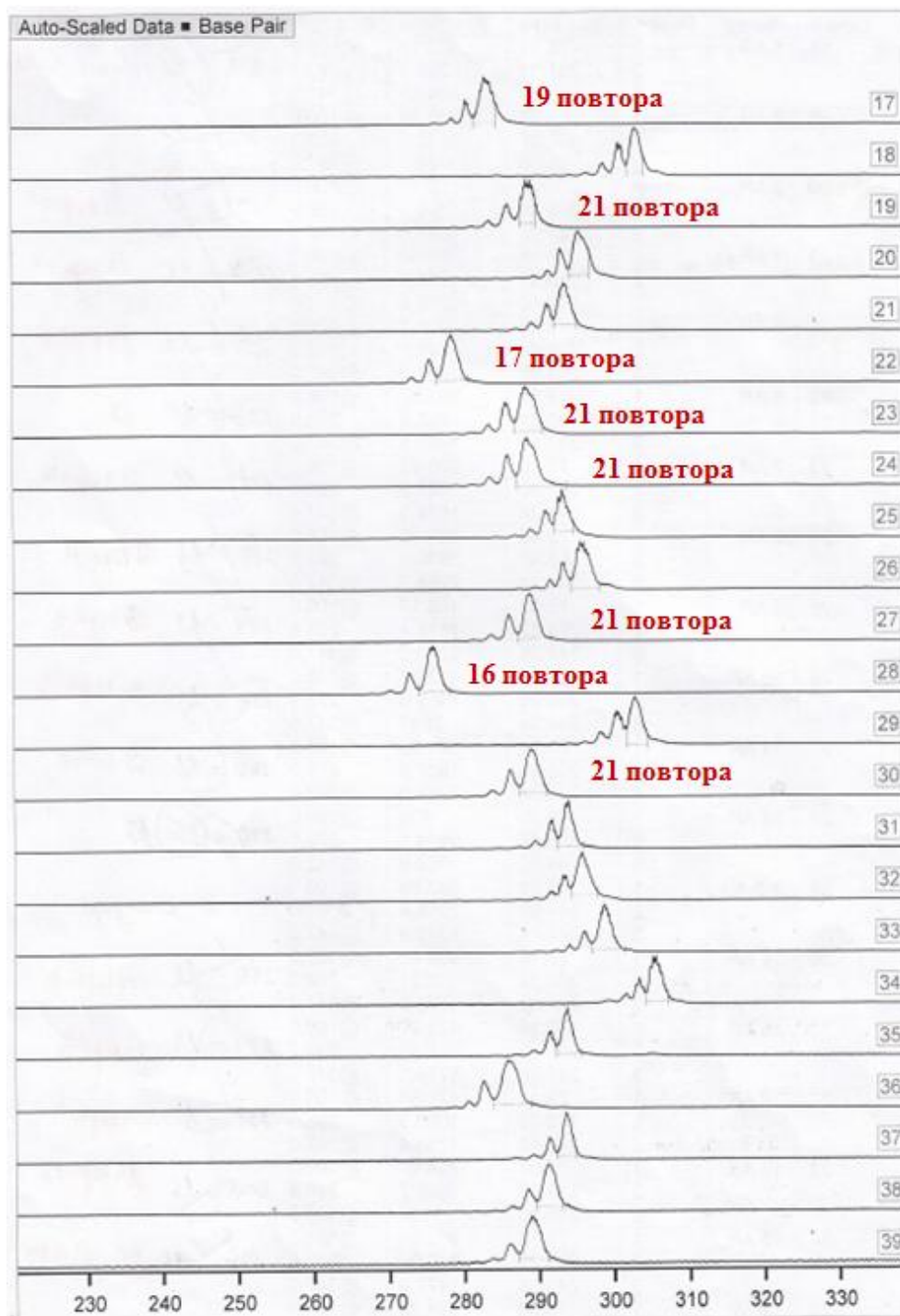
Амплификационният продукт с размер 171бд е представен електрофоретично на Фигура 28.



Фигура 28. Гел електрофореза на *KLF6* амплификационен продукт – 171бд.



Фигура 30. Електрофоретичен профил на (CAG)*n* повтори в AR при ПК пробанди (ALF Express). С червено са отбелязани профилите на пациенти с AR(CAG)*n* ≤ 22, която се приема за критична точка. Такъв генотип се асоциира с вродена предразположеност към ПК.



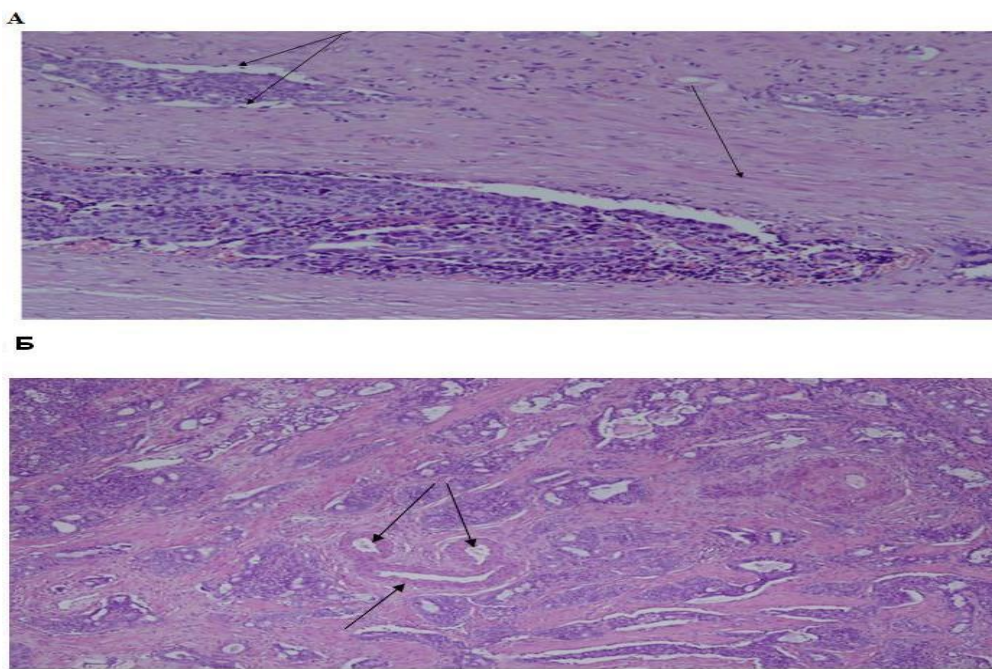
Фигура 31. (CAG) n повтори в AR при ПК пробанди (ALF Express). С червено са отбелязани профилите на пациенти с AR(CAG) n \leq 22, която се приема за критична точка. Такъв генотип се асоциира с вродена предразположеност към ПК.

4.1.6. Приложение на разработените методи за изследване на тумор-специфичните маркери за диагностика и контрол на заболяването при български пациенти с ПК или други патологии на простатната жлеза: ДПХ и хронично възпалително заболяване (простатит).

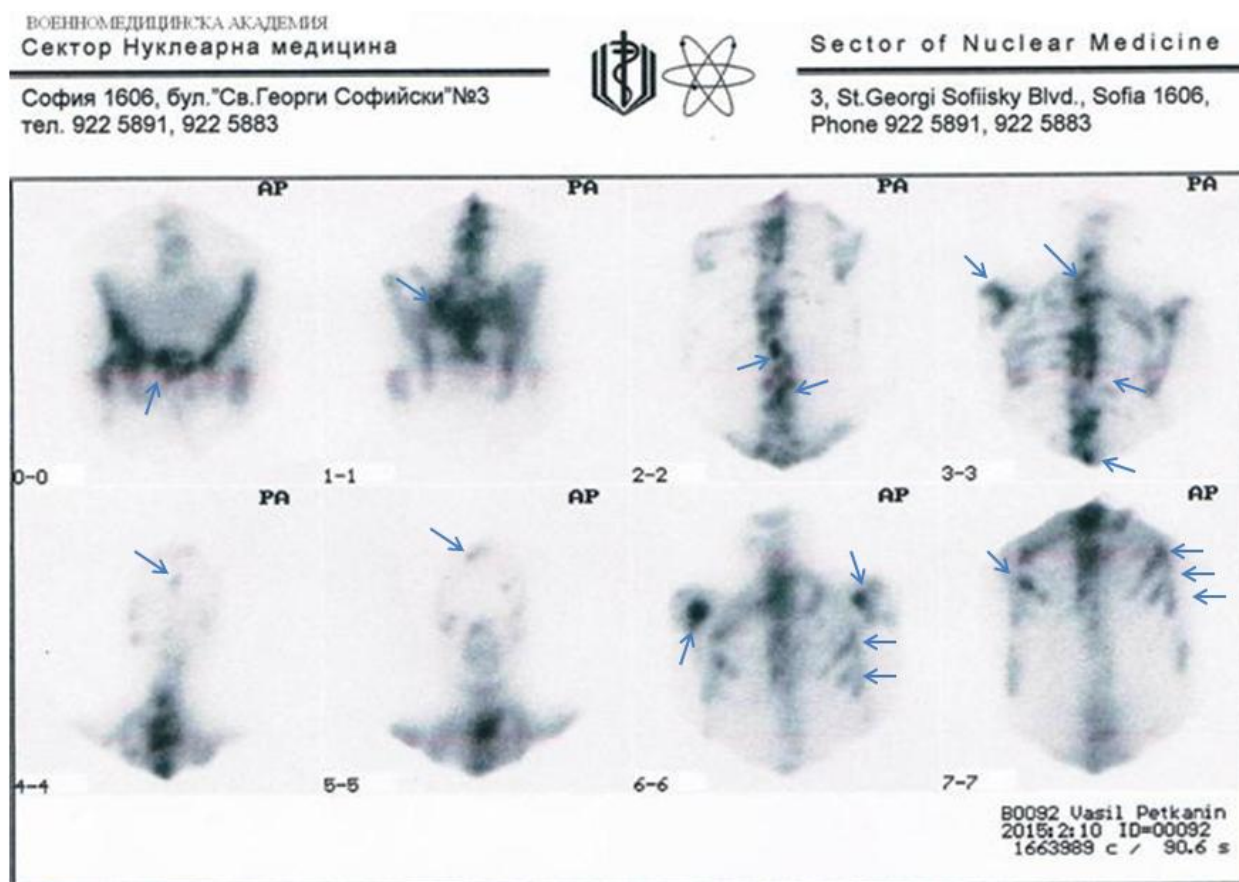
Обект на настоящето проучване са 101 спорадични пациенти с ПК, обособени в две основни групи: агресивен ПК и неагресивен ПК. Наред с клиничните и хистологични данни при пациентите бяха проведени молекулярно-генетични изследвания с набор от молекулни маркери за оценка на тяхната диагностична и прогностична стойност. Клиничните, хистологични и молекулни данни за подгрупите с агресивен и неагресивен ПК са представени в Таблица 21 и Таблица 22 по-долу. Комбинацията от маркери *PCSA3*, *T2-ERG* фузии и *GSTP1* промоторно хиперметиране беше изследвана също в 2 допълнителни клинични групи (здрави по отношение на ПК): ДПХ (25 пациента) и хронично възпалително заболяване на простатата/простатит (24 пациента). Получените резултати са представени по групи.

I. Агресивен ПК (16 пациента):

Хистологичните и клинични резултати в изследваната група пациенти показаха наличие на агресивен подтип ПК, включващ перинеурална и периваскуларна инфилтрация (Фигура 32 А и Б), както и метастази в черепа и скелетните кости (Фигура 33).



Фигура 32. А. Наличие на простатни туморни клетки в лимфни цепки, умерено-диференциран тумор; **В.** Хистологично изображение на ПК. Наличие на периваскуларни туморни инфилтрати; туморни огнища и артериални съдове. GS 4+3=7, умерено-диференциран тумор.



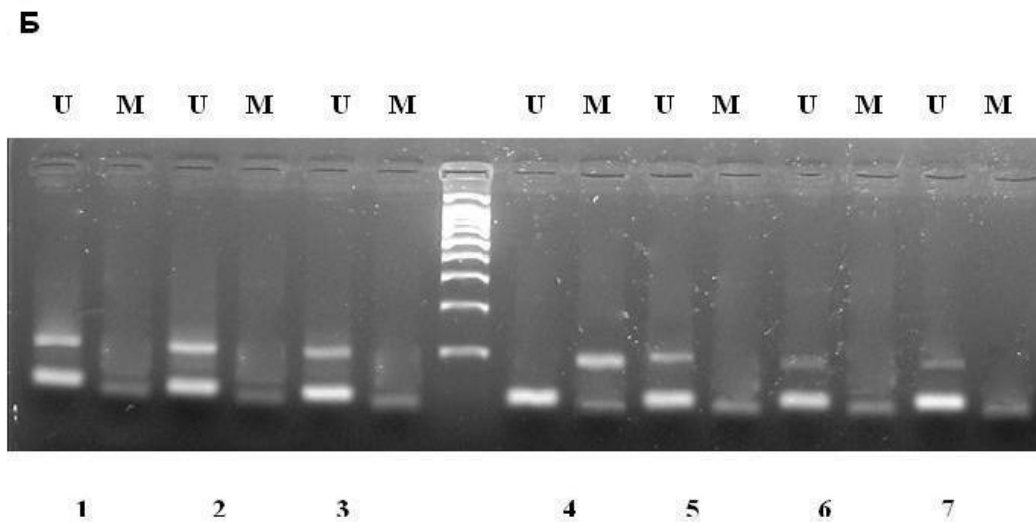
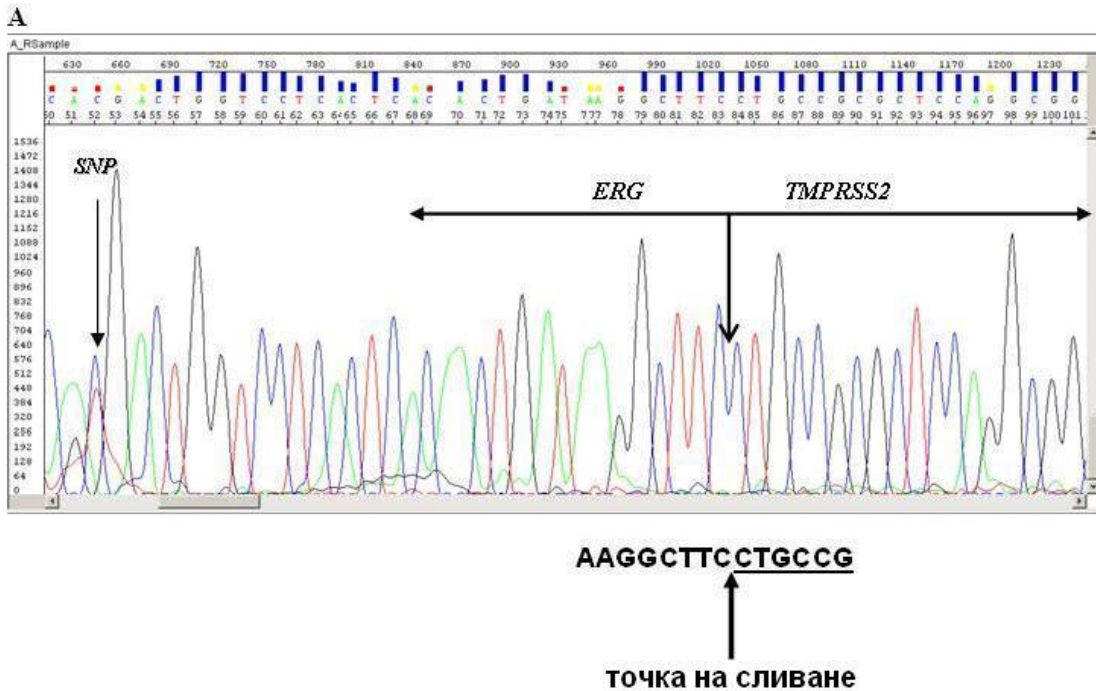
Фигура 33. Костна сцинтиграфия. Радиофармацевтик ^{99m}Tc -MDP Въведена активност 700 MBq. Фокуси на повишена фиксация: илиачни кости, десен ацетабулум, големи трохантери, главички на раменни кости, ребра-двустранно, гръбначен стълб –на почти всички нива; черепни кости – теменна кост в ляво.

По-голяма част от пациентите (1-13, Таблица 21) в агресивната подгрупа имат кастрация резистентен простатен карцином (КРПК) със строго хормонално-резистентно поведение през периода на лечение, базирано на индивидуалния отговор след прилагането на андроген потискаща терапия (АПТ). Пет пациента се характеризират с андроген-податлив ПК, неблагоприятна прогноза и висок риск за биохимичен рецидив (Таблица 21, #14-18).

PCAZ експресия: Всички с изключение на двама пациента от тази група (# 9 и # 10 от които липсват тъканни проби за анализ) показаха PCA3 свръхекспресия, оценена с помощта на real time qPCR метод. Пациенти # 9 и # 10 бяха включени в проучването на по-късен етап, след провеждане на АПТ, поради което тъканните проби при първично диагностициране на ПК, не бяха налични за молекулярен анализ. Изследваните уринни проби след АПТ при пациенти # 9 и # 10 бяха PCA3 негативни. Завишени PCA3 експресионни нива бяха детектирани и в 4 кръвни проби (Таблица 16 #1, 2, 3 и 16).

Експресионен анализ на *TMPRSS2:ERG* гени сливания: Около 18,2% от пациентите с простатен карцином в изследваната извадка показаха *T2-ERG* позитивен фузионен статус. Беше детектиран само един тип фузионен транскрипт: *TMPRSS2* екзон 1 фузира към *ERG* екзон 4 (Фигура 34А). В един от пациентите с позитивен *T2-ERG* фузионен статус, секвенционният анализ детектира и синонимна замяна, полиморфизъм с.51G>А, р.Ser17Ser (Фигура 34А). *T2ex1-ERGe4* позитивен фузионен статус беше намерен във всички тъканни проби от агресивната ПК група. Позитивен *T2ex1-ERGe4* фузионен статус беше наблюдаван в пациентите, изследвани преди АПТ, но пациенти # 9 и # 10, тествани след АПТ, показаха негативен фузионен статус в урина. Наличие на *T2ex1-ERGe4* фузия в кръвни проби беше наблюдавано само при трима пациенти (Таблица 21 #1, 7 и 16).

Хиперметиране на *GSTP1* генен промотор: Тази епигенетична мутация беше детектирана при всички пациенти във всички изследвани проби, включително в кръв (Фигура 34Б).



Фигура 34А. Секвенционен профил на *TMPRSS2ex1-ERGex4* фузия детектирана в “tru-cut” биопсия с GS /7/ простатен тумор; наличие на полиморфизъм с.51G>A, р.Ser17Ser.

Б. Промоторно хиперметиране на *GSTP1* гена. Проби (1-3): ДПХ -свежа тъкан. Проба 4 ПК пациент в начален стадий -“tru-cut” биопсия. Проби 5=4 ПК пациент в начален стадий- венозна кръв. Проби (6-7) ДПХ – урина.

U – неметилян *GSTP1* алел-норма; M – метилиран *GSTP1* алел-неопластичен.

В една кръвна проба (Таблица 21 # 1) беше детектиран тройно позитивен молекулен профил за *PCA3*, *GSTP1* и *T2ex1-ERGe4*.

AR и IVS1-27G>A профил: В цялата група от 18 пациента с агресивен ПК не бяха открити соматични мутации в *AR* гена и всички анализирани пациенти показаха нормален генотип по отношение на *IVS1-27G>A* полиморфния вариант в *KLF6* гена. Наблюдаваният нормален генотип по отношение на *IVS1-27G>A* полиморфния вариант във всичките 16 пациента с агресивен ПК противоречи на публикуваните данни в други популации за висока честота на мутантния алел при ПК пациенти [89]. По отношение на негативния резултат относно соматични мутации в *AR* гена, нашите резултати потвърждават хипотезата, че *AR* мутациите са сравнително редки събития при ПК и КРПК пациенти [105], въпреки очаквания индуциран мутационен ефект от АПТ (Taxotere (Docetaxel), Xgeva (Denosumab), Zytiga (Abiraterone Acetate) + Deltasone (Prednisone), Zometa (Zoledronic acid), и др.). Използваният от нас метод на директно секвениране покрива до голяма степен мутационния спектър на *AR* гена, но въпреки това остават генетични изменения, като например copy number мутации или микроделеции, които изискват друг метод за анализ.

AR (CAG) n дължината на повтора беше проучена в 56 пациента с ПК, (във всичките 18 КРПК пробанда и в 38 с индолентен ПК) от които разполагахме с кръвни проби. При 41% от ПК пациентите установихме дължина на (CAG)n повтора в *AR* гена ≤ 22 , която се приема за критична точка. По-къси алели се асоциират с повишен риск от развитие на ПК.

До момента няма строги препоръки от световната общност по онкологична медицина за скрининг на *AR*(CAG) n дължината, но все по-често се обсъжда подобна възможност. На база получените резултати, екипът ни подкрепя идеята за въвеждането на *AR* (CAG) n към високоинформативните маркери за вроден повишен риск от развитие на ПК, както и за молекулярно профилиране на болестта.

В таблица 20 са представени таблично резултатите по отношение дължината на AR (CAG) n повтора.

Таблица 20. Дължина на AR(CAG)n повтора в извадка от 56 пациента с ПК.

	≤ 22 AR(CAG)n критична точка (41%)						> 22 AR(CAG)n критична точка						
AR(CAG)n repeat	<u>16</u>	<u>17</u>	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	31
Брой пациенти	<u>2</u>	<u>2</u>	1	4	11	3	11	6	10	2	2	1	1

Всички пробанди в тази група, изследвани преди АПТ бяха позитивни за *PCA3* свръхекспресия, *T2ex1-ERGex4* фузия и *GSTP1* промоторно хиперметиране. *T2-F1/ERG-R4* фузионен транскрипт беше преимуществено детектиран при пациенти с по-висока хистологична степен по Gleason GS /7/, /8/ и /9/, респективно умерено и слабо диференцирани тумори. Такива данни са докладвани и в литературата [101-104]. *T2ex1-ERGex4* фузия беше открита само в един пациент с наличие на тумор, хистологично определен, като GS 6 степен, която се асоциира принципно с по-добра прогноза. Беше установена позитивна асоциация между *T2-F1/ERG-R4* фузионен статус в извадката и по-висок туморен стадий (оценен по TNM, като T3 и T4), докато в T2 стадий, подобна асоциация не беше открита.

Детектираният единичен нуклеотиден полиморфизъм **51G>A, p.Ser17Ser** (Фигура 30A) при пациент с позитивен фузионен статус е с неясна значимост и отношение към ПК и клиничната прогноза. По литературни данни този полиморфизъм не се смята за асоцииран с ПК. Все пак, предвид хипотезата за комбинирания ефект на многобройни полиморфни варианти върху патогенезата на ПК и безспорната хетерогенност на тази неоплазма, не изключваме възможността за връзка.

Най-вероятно *GSTP1* промоторното хиперметиране представлява най-ранната епигенетична промяна, индикираща злокачествени простатни изменения и най-дълго персистиращият маркер в периферна кръв. Появата на *GSTP1* промоторното

хиперметиране в кръвта го прави подходящ маркер за проследяване на ефекта от лечението.

Появата на *GSTP1* хиперметиран неопластичен алел в кръвта подсказва процес на формиране на микрометастази и последващото им разпространение. При двама от пациентите (#1 и 16, Таблица 21) установихме тройно позитивен резултат за *GSTP1* промоторно хиперметиране, *TMPRSS2-ERG* фузия и *PCA3* свръхекспресия в кръв. Такъв резултат би могъл да се интерпретира, като индикация за изразена миграция и разпространение на простатни туморни клетки в кръвната циркулация. Пациент #1 беше подложен на АПТ с Docetaxel и след едногодишна терапия резултатите от молекулярно-генетичните изследвания показаха наличие единствено на *GSTP1* промоторно хиперметиране в кръвта. Контролният молекулен профил се приема, като доказателство за добър индивидуален отговор към назначената терапевтична схема, което съвпада с резултатите от клиничните наблюдения. При пациент #16, тройно позитивната кръвна проба за молекулните маркери в комбинация с лоша клинично-хистологична прогноза персистираха до ПК-асоцииран летален изход. Появата на молекулните маркери в кръвта беше разглеждана като предпоставка за микрометастатичен ПК.

Циркулиращите микрометастази биха могли да се развият в метастази с последващо разпространение в близко и далечно разположени тъкани и често заемат неслучайни локализации, предимно в кости и централна нервна система (ЦНС) [102], както беше демонстрирано в 5 от представените ПК случаи (# 2, 3, 9, 14, 16, Таблица 21).

II. Индолентен (първичен) ПК (83 пациента):

Повечето от пациентите, попадащи в тази група бяха с първичен нискорисков ПК, преимуществено органно-ограничен в съвсем начална фаза на болестта (преканцерогенен стадий). Пет пациента бяха диагностицирани с първичен ПК само на база молекулярен профил, въпреки негативния резултат от хистологично изследване на биопсичен материал. Няколко месеца по-късно при повторно провеждане на “tru-cut” биопсия, диагнозата първичен ПК беше потвърдена хистологично.

***PCA3* експресия:** *PCA3* свръхекспресия беше детектирана при 75 пациента от тази група (75/83=90.4%). Останалите *PCA3* негативни пациенти показаха ПСА серумни нива между 3,0-10,0 нг/мл и тумори с GS 4-6. Детектираните *PCA3* завишени експресионни

нива в 90,36% от пациентите в индолентната ПК група потвърждава високата специфичност на маркера, както и предикативната му стойност. Липсата на *PCA3* експресия в 8 пациента с диагноза първичен ПК (ПСА стойности в сива зона 3,0-10нг/мл; Gl.score /4-6/) се обяснява с данните за наличие на 3-5% *PCA3* негативни ПК пациенти, дължащо се на разлики в пробовземането, качеството на биологичния материал и др.

Експресионен анализ на *TMPRSS2:ERG* гени сливания: Във всички изследвани пациенти с изключение на един липсваше *TMPRSS2ex1-ERGex4* фузионен транскрипт. Пациентът с позитивен фузионен статус имаше наличие на GS 2+2=4 тумор. Тази находка провокира хипотезата, че хистологичното степенуване не бива да се разглежда, като най-важен прогностичен параметър, тъй като подобен резултат от молекулярно-генетичните изследвания подсказва наличие на метастатичен потенциал и по-агресивен ПК профил. Необходимо е хистологичното степенуване да се интерпретира едновременно с допълнителни хистологични, клинични и молекулни находки.

Хиперметиране на *GSTP1* генен промотор: 100% от неагресивните пробанди с диагноза ПК бяха позитивни за епигенетичната мутация промоторно *GSTP1* хиперметиране. Този резултат потвърждава високата специфичност на маркера да индикира най-ранните малигнени промени в простатната жлеза.

III. ДПХ (25 пациента):

Всички изследвани пробанди, обединени в тази група бяха диагностицирани с аденофибролейомиоматозна хиперплазия. Беше установена типична повишена пролиферация на стромалната простатна тъкан в нашата извадка, патофизиологично изразена с нодуларна пролиферация, обструкция на урината, дисфункция на детрузора (мускулатура на пикочния мехур) и др. Симптомите от страна на долните пикочни пътища (ДПП) бяха умерено и тежко изразени (често, спешно, нощно уриниране, слаба струя, прекъсване, както и неудовлетвореност и чувство за остатъчна урина (инконтиненция). В групата бяха включени пациенти, при които установената патология ДПХ се свързва с типични възрастови изменения на жлезата, като липсват данни за абактериален хроничен простатит или уринарни инфекции. Разполагаме с данни за придружаващи заболявания в част от пациентите с ДПХ, като неконтролиран диабет и неврологични смущения, които

също се спрягат за възможна причина, провокираща състоянието. Несъмнено, описаните усложнения в извадката от пациенти с диагноза ДПХ се свързват с нарушено качество на живот.

PCA3 експресия: Всички изследвани пробанди с аденофибролейомиоматозна хиперплазия бяха негативни по отношение на *PCA3* маркера.

Експресионен анализ на *TMPRSS2-ERG* генни сливания: Цялата ДПХ група показва негативен *TMPRSS2ex1-ERGe4* фузионен статус.

Хиперметиране на *GSTP1* генен промотор: В 9 от 25 пациента с ДПХ (36%) беше детектирано *GSTP1* промоторно хиперметиране. Вероятно наблюдаваният резултат се дължи на наличието на допълнителни патологични промени при тези пациенти, като простатни интраепителни неопластични (ПИН) лезии и кистозни промени на простатната жлеза, установени хистологично.

Повечето от изследваните молекулни маркери в ДПХ групата бяха негативни, което съвпада с публикуваните данни [49, 58]. Единствено *GSTP1* промоторно хиперметиране беше детектирано в 36% от ДПХ пробандите. Пациентите с положителна *GSTP1* епигенетична мутация показаха и присъствие на ПИН III-та степен, както и кистозни промени в простатната жлеза. Подобни открития бяха докладвани и преди за >70% от случаите с ПИН и ПИА, които се разглеждат понастоящем, като преканцерозни лезии [72,74].

Нерядко наличието на подобни преканцерозни лезии в пациенти с ДПХ, (като посочените за 36% от нашата извадка) персистират към отключване на първичен ПК и косъществуване на двете патологични състояния ДПХ и ПК едновременно. Поради тази причина беше предприето стриктно наблюдение на тези 36% от извадката, с цел мониторинг и навременно установяване на евентуален процес на малигнизация.

IV. Хронично възпалително заболяване на простатната жлеза-простатит (24 пациента):

В групата на пациенти с диагноза простатит имаше само трима с остър бактериален простатит (резултат от бактериална инвазия на *E. coli* и *Pseudomonas*). При останалите пациенти се наблюдаваше наличие на състоянието хроничен небактериален простатит. В пациентите бяха на лице разнообразни характеристични симптоми като фебрилитет (3 с

остър бактериален простатит), перинеална болка, дизурия, инициална и терминална хематурия, ретенция на урината.

PCAZ експресия и анализ на *TMPRSS2-ERG* гени сливания: Цялата група беше негативна по отношение на *PCAZ* експресия и *TMPRSS2-ERG* фузионен статус.

Хиперметиране на *GSTP1* генен промотор: В 11 от 24 пациента (45.8%) беше детектирано *GSTP1* промоторно хиперметиране. В същите пациенти беше демонстрирано наличие на простатно интраепителни атрофични клетки ПИА. В останалите 13 *GSTP1* негативни пациента липсваха ПИА хистологични находки. Поради разглеждането на простатните интраепителни атрофични клетки, като кофактор за отключване на ПК, тези 45,8% в извадката бяха подложени на стриктно наблюдение.

4.1.7. Извършване на сравнителен анализ на базата на получените молекулни профили и наблюдаваните клинични и хистологични характеристики при изследваните пациенти с ПК, ДПХ и простатит.

Клиничните, хистологични и молекулни данни за подгрупите с агресивен и неагресивен ПК са представени в Таблица 21 и Таблица 22. Резултатите от различни аспекти на болестта в групата с агресивен ПК (Таблица 21) бяха подробно дискутирани по-горе, но тук са изложени най-важните акценти.

Забелязват се изключително високи стойности на ПСА в тази подгрупа (57-130 нг/мл), в хода на АПТ. Тези данни са неоспоримо доказателство за процес на AR реактивация и преход към КРПК профил.

Периневрална и/или периваскуларна инфилтрация и по-висок GS 7, 8, 9 на умерено и/или ниско диференцирани тумори бяха открити във всички тъканни проби. Капсулно и/или екстрапростатно разпространение се наблюдава при почти всички пациенти в агресивната подгрупа.

В ¼ от групата бяха открити допълнителни клинично-патологични характеристики на агресивност: семенно-везикуларна, ангио-лимфна и лимфонодална инвазия, както и наличие на дуктален инвазивен ПК. Именно в група пациенти са „концентрирани” предимно случаите с по-висок туморен стадий Т3-Т4, наличие на многобройни черепни и костни метастази и/или ПК-свързан летален изход.

Цялостната клинично-патологична картина безспорно обединява пациенти с профил на ПК с висока степен на агресивност. Този профил беше категорично потвърден чрез изследваните молекулно-генетични характеристики, които корелират с останалите аспекти на болестта – клинична картина и хистология. Клиничните и хистологични данни, заключения и маркери бяха включени и използвани в разработката с цел формиране на интердисциплинарен подход при диагностициране и лечение на ПК и като референтни методи за оценка на точността и специфичността на молекулната диагностика.

Появата на ПК специфични маркери в тъканни, неинвазивни проби и най-вече в кръвотока (Таблица 21) при пациенти с наличие на многобройни метастази, авансирал стадий и неблагоприятна прогноза, доказаха високата им диагностична стойност и ефективност.

В групата на индолентния ПК (таблица 22) най-много пациенти попадат в сивата зона на ПСА (3.0-10.0) с високо-диференцирани тумори с GS 4-6 и ~ 80% от пациентите се характеризират с първичен, локален и органно-ограничен простатен карцином. Малкото изключения (Таблица 17) с регионален ПК и екстракапсулно разпространение бяха строго мониторирани чрез чести контролни изследвания и показаха индолентен клиничен ход на болестта и много добър терапевтичен отговор.

Откритият *TMPRSS2ex1-ERGex4* фузионен транскрипт в 1 от изследвани 83 пациента (0,83%) беше разглеждан, като изключение в тази клинична група. Въпреки това, пациентът беше подложен на по-строг контрол, предвид асоциацията на маркера с висок метастатичен потенциал, както и склонността на ПК-подтиповете да се видоизменят в хода на продължителна терапия.

Високите проценти на *PCAZ* свръхекспресия (90,361%) и *GSTP1* промоторно хиперметиране (100%) в проби с първичен индолентен ПК, доказаха високата специфичност и информативност на подобрите маркери в панела за ранна диагностика.

Таблица 21. Молекулен профил и клиникопатологични параметри при 18 от 101 български пациента, формиращи агресивна ПК подгрупа.

Пациент	ПСА нг/мл	Хистологична оценка по Gleason	Допълнителни клиникопатологични параметри	<i>TMPRSS2-EGR</i> фузионни транскрипти*	Туморен стадий (TNM)	<i>PCA3</i> експресия	<i>GSTP1</i> промоторно хиперметилиране	<i>AR</i>	<i>IVS1-27G>A</i>	Излив на ПК специфични маркери в кръвотока
1	126	4+3=7	периневрална инфилтрация	1 → 4	pT2a NxMxG2	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>PCA3</i> свръхекспресия, <i>T2ex.1-ERGeX.4</i> , <i>GSTP1</i> промоторно хиперметилиране
2	111	/2+3/=5 ляв лоб /4+3/=7 десен лоб	периневрална инфилтрация, екстрапростатно разпространение	1 → 4	многобройни костни метастази	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>PCA3</i> свръхекспресия <i>GSTP1</i> промоторно хиперметилиране
3	99	/4+3/=7 ляв лоб /2+3/=5 десен лоб	периневрална инфилтрация, екстрапростатно разпространение	1 → 4	многобройни костни метастази	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>PCA3</i> свръхекспресия <i>GSTP1</i> промоторно хиперметилиране
4	115	/2+3/=5 ляв лоб /4+3/=7 десен лоб	периневрална и периваскуларна инфилтрация капсулна инвазия	1 → 4	---	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хиперметилиране
5	130	/4+5/=9	периневрална и периваскуларна инфилтрация екстрапростатно разпространение	1 → 4	pT3bNxMx	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хиперметилиране
6	80	/4+4/=8	периневрална и периваскуларна инфилтрация екстрапростатно разпространение	1 → 4	pT4 NxMx	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хиперметилиране

7	106	/4+5/=9	ангио- лимфна инвазия екстрапростатно разпространение	1 → 4	---	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>T2ex.1-ERGen.4,</i> <i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране
8	110	/4+4/=8	периневрална инфилтрация, екстрапростатно разпространение; лимфонодална инвазия ПК-асоцирана смърт	1 → 4	pT4	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране
9	110	/4+4/=8	дуктален инвазивен ПК, екстрапростатно разпространение; лимфонодална инвазия ПК-асоцирана смърт	Липсва**	многоброини костни метастази	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране
10	57	/4+5/=9	периневрална инфилтрация	Липсва **	---	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране
11	67	/2+4/=6	периневрална инфилтрация	1 → 4	G1pT2bN0(0/6) MxVn.	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране
12	80	/4+4/=8	периневрална и периваскуларна инфилтрация капсулна инвазия	1 → 4	---	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране
13	77	/5+4/=9	периневрална и периваскуларна инфилтрация капсулна инвазия	1 → 4	---	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране
14	117	/4+4/=8	семенно-везикуларна инвазия; периневрална инфилтрация, екстрапростатно разпространение	1 → 4	многоброини костни метастази	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране

15	96	/4+4/=8	периневрална инфилтрация, екстрапростатно разпространение	1 → 4	---	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране
16	80	/5+4/=9	периневрална и периваскуларна инфилтрация екстрапростатно ПК- асоцийрана смърт	1 → 4	pT4 многобройни костни метастази	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране <i>PCA3</i> свръхекспресия, <i>T2ex.1-ERGex.4</i>
17	73	/2+2/=4	периневрална инфилтрация	1 → 4	---	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране
18	99	/4+5/=9	периневрална инфилтрация, екстрапростатно разпространение	1 → 4	pT4	Свръхекспресия	позитивен статус	Липсват соматични мутации	Нормален генотип	<i>GSTP1</i> промоторно хипер- метиране

* Само един тип *TMPRSS2-ERG* генно сливане беше детектирано в нашта група: *TMPRSS2-ex1/ERG-ex4* (1 → 4).

** Уринните седименти бяха изследвани след АПТ терапия и тъканни проби не бяха налични за молекулярен анализ.

Таблица 22. Молекулни и клиникопатологични характеристики при пациенти с първичен индолентен ПК.

Клиникопатологични параметри	Брой случаи	<i>TMPRSS2ex1-ERGex4</i> фузия	<i>PCA3</i> свръхекспресия	<i>GSTPI</i> промоторно хиперметиране
PSA нг/мл				
0.0-3.0	0(83)	----	----	----
3.0-10.0	43(83)	липсва	35 (83) *	43(83)
10.1-20	13(83)	липсва	13(83)	13(83)
20.1-85.0	27(83)	липсва	27(83)	27(83)
Хистологична степен по Gleason		липсва		
/4-6/	51	1(51)**	43(51) *	51(51)
/7/	21	липсва	21(21)	21(21)
/8-9/	11	липсва	11(11)	11(11)
Патологичен стадий	66		19(19)	19(19)
Локален/ Органно ограничен	(pT2a)19 (pT2b)8	липсва	8(8)	8(8)
Регионален/ Екстракапсулно разпространение	14 (pT3a)5 (pT3b)3	липсва	5(5) 3(3)	5(5) 3(3)
Авансирал/разпространение към семенни везикули	3	липсва	3(3)	3(3)
Бележки	-----	<i>TMPRSS2ex1-ERGex4</i> фузионен транскрипт беше открит в 1(83) проби. 0.83%	<i>PCA3</i> завишени нива бяха детектирани в 75(83) ПК проби. 90,361%	<i>GSTPI</i> промоторно хиперметиране беше детектирано в 83(83) ПК проби. 100%

* 8 проби с *PCA3* стойности в областта 3.0-10.0 нг/мл и Gl. score /4-6/ не показаха *PCA3* експресия.

** *TMPRSS2ex1-ERGex4* фузия, детектирана в “tru-cut” биопсия от пациент с Gl. score /2+2=4/, която е единственото изключение в представената група.

4.1.8. Разработване на системен подход за молекулно-генетичен анализ при пациенти с ПК; интердисциплинарен подход за индивидуализирана терапия.

На базата на проведеното проучване на някои молекулно-генетични характеристики на ПК в комбинация с клинични и хистологични данни, разработихме системен подход за диагностика и мониторинг на ПК при български пациенти. Системният подход е представен схематично на Фигура 35.



Фигура 35. Системен подход за диагностика и мониторинг на ПК при български пробанди.

4.1.8.1. Първична диагностика:

За първична диагностика на заболяването е резонно да се изследва панел от следните молекулни маркери: *PCA3* експресионни нива, *T2-ERG* фузионен статус, *GSTP1* промоторно хиперметиране. В зависимост от клиничния случай, молекулярно-генетичното изследване може да се проведе върху неинвазивна проба (урина или простатен секрет, след ДРИ) или върху стандартна “tru-cut” биопсия. За първична диагностика не се препоръчва изследване на кръвна проба, тъй като молекулните маркери, включени в панела са строго специфични за простатен карцином и се появяват в кръвта в по-напреднал стадий на заболяването.

Резултатите от молекулярно-генетичния анализ се интерпретират в комбинация с клинични и хистологични (ако има налични) данни: ПСА нива, симптоматика, сцинтиграфски и ехографски находки, хистологични параметри.

4.1.8.2. При наличие на агресивен КРПК подтип карцином:

При пациенти с потвърдена диагноза агресивен ПК и КРПК профил се включва изследване на *T2-ERG* фузионен статус, *IVS1-27G>A* в *KLF6* и *AR* мутационен статус за определяне степента на агресивност. Целта е да се потвърди прехода от андроген рецепторна *AR* инактивация към *AR* реактивация на молекулярно ниво. Определянето на молекулен и клиничен КРПК профил е изключително важно при избора на алтернативна терапевтична схема и повишава шанса на пациента за адекватно лечение.

Молекулният анализ може да се проведе върху “tru-cut” биопсия или неинвазивна проба (урина, простатен секрет, след ДРИ). В тези случаи е препоръчително да се изследва и кръвна проба за всички простатно-специфични туморни молекулни маркери (тези за първична диагностика и в допълнение тези за определяне на метастатичен потенциал и висока степен на агресивност). Целта е да се постигне контрол върху ефекта на терапията при пациенти с КРПК и проследяване на микрометастатичното разпространение на ПК в кръвната циркулация. На този етап се включват сцинтиграфски изследвания и специализирани изследвания за проследяване появата на далечни метастази.

4.1.8.3. При наличие на агресивен андроген-податлив подтип карцином:

Обикновено този тип ПК тумори имат добър отговор към АПТ, но често след дълъг период на лечение по тази схема преминават към групата на КРПК, придобивайки резистентност. Поради това е нужно да бъдат мониторирани чрез предклинични, клинични, хистологични и молекулярно-генетични тестове.

В периода на лечение с добър терапевтичен отговор към АПТ и наличие на пълна *AR* инактивация (*AR* блокада) не се препоръчва анализ на проби от всякакъв характер за *T2-ERG* фузионен статус. Причината е, че тези строго специфични по отношение на простатен карцином мутации са *AR* – медиирани. Следователно при изключена *AR* активност, *T2-ERG* мутации не се индуцират. В такива случаи е важно да се изследва фузионен статус при първичната молекулярна диагностика преди АПТ, предвид асоциацията на този маркер с висок метастатичен потенциал и по-агресивно поведение на ПК. След определяне на клиничния профил на заболяването, като андроген-податлив ПК, *T2-ERG* фузиите не могат вече да се ползват като контролни маркери поради *AR* заглушаването (до момента на добро терапевтично повлияване).

В случай, че след продължителна терапия в ПК профила настъпи промяна към КРПК е наложително да се изследват всички маркери, включително *T2-ERG* в комбинацията, описана по-горе в 4.1.8.2.

4.1.8.4. Интердисциплинарен подход за индивидуализирана терапия на ПК.

Едновременната интерпретация на клинични, патологични и молекулни данни формира цялостен профил на пациент с ПК. Предвид заключенията на световната онкологична и урологична общност за изключителната хетерогенност и поликлонална природа на ПК, препоръките са за интердисциплинарен подход при първична диагностика, мониторинг и лечение на заболяването. На тази база се гради персоналният скрининг за всеки отделен пациент. Мястото на молекулярната биология в онкологията (в частност ПК) допринася именно за доизясняване на специфичния ПК профил и дава възможност за адекватно приложение на индивидуализирана медицина в борбата с болестта.

4.1.9. Обобщение на получените резултати.

PCA3 експресията се доказва, като високоспецифичен и надежден маркер за първична диагностика на ПК на молекулно ниво при български пациенти. Високата му информативна стойност може успешно да се използва в предклиничната практика за мониториране на ПК.

Информацията от комбинирания молекулярно-генетичен профил, включващ маркери *PCA3* експресия, *T2ex1-ERGe4* фузионен статус и *GSTP1* промоторно хиперметиране може да се използва успешно за по-добра диагностика и мониторинг на български пациенти с ПК.

Получените резултати от настоящето проучване показват, че *T2-ERG* фузии се откриват при 18,18% от пациентите с диагноза ПК в изследваната извадка български пациенти. Този % е значително по-нисък от докладваните ~60% за други популации [58-59]. Разликата би могла да се дължи на дизайна на анализа, при който сме подбрали да анализираме най-често срещаните фузии с клинична значимост върху ПК.

Наличието на позитивен промоторен *GSTP1* неопластичен алел се доказва, като най-ранната и високо специфична епигенетична промяна в простатната жлеза, която индикира началото на патологичния процес.

Появата на позитивни молекулярни маркери в кръвта (*PCA3* експресия, *T2-F1/ERG-R4* гена фузия и *GSTP1* промоторно хиперметиране) (без използване на техники за набогатяване на проби) могат да се разглеждат, като предпоставка за разпространение на ПК, което корелира с клинично-хистологичните находки. Молекулярно-генетичните резултати могат да се интерпретират едновременно с данните от клинично-хистологичната анамнеза. При позитивен статус от молекулярно-генетичните изследвания би могло да се улесни разграничаването на инвазивен от индолентен подтип ПК.

Молекулният аспект на простатната неоплазма е много важен за стриктното мониториране, избор на адекватно лечение и проследяване на индивидуалния терапевтичен отговор на пациентите.

5. ИЗВОДИ:

1. Разработените методики за молекулярно-генетичен анализ на панел от ПК специфични молекулни маркери позволяват осъществяване на първична диагностика на ПК, разграничаване на индолентен от агресивен (метастатичен) молекулярен профил на заболяването и мониторинг.
2. *PCAZ* свръхекспресия, установена при 90.4% от пробандите с неагресивен ПК и 100% с агресивен ПК (общо 95,2%) и липса на свръхекспресия в останалите клинични групи го определят, като високо специфичен маркер за ранна диагностика и контрол на ПК.
3. Детекцията на *T2/ERG* фузия изключително в групата с агресивен КРПК в комбинация с по-висока хистологична степен *GS* /7,8,9/ и допълнителни неблагоприятни хистологични характеристики, по-висок туморен стадий определят позитивната асоциация на маркера с агресивността на заболяването.
4. *T2/ERG* позитивен фузионен статус е установен при 18,2% от пациентите с ПК, процент съществено по-нисък от докладвания в литературата.
5. *T2/ERG* фузионен статус не може да се използва за контрол на терапията при пациенти с андроген-податлив ПК, поради андроген-медираната им експресия.
6. Хиперметирането на *GSTP1* промотора се приема за най-ранната епигенетична промяна, индикираща злокачествени изменения в простатата и най-дълго персистиращия маркер в кръвта.
7. Появата на простатно тумор-специфични молекулни маркери в кръвта се интерпретира, като индикатор за микрометастатично разпространение и предпоставка за образуване на метастази.
8. Полиморфният маркер *IVS1-27G/A* в *KLF6* гена не беше информативен за отдиференциране на ПК с прогресивно метастатично поведение в изследваната извадка.
9. Не бяха открити соматични мутации в *AR* гена.
10. Изследването на $(CAG)_n$ повтора в *AR* ген, показва наличие на рисков алел за предразположение към развитие на ПК при 41% от пациентите с ПК.
11. Разработеният системен подход за молекулярно-генетична диагностика позволи охарактеризиране на 101 пациента с ПК и допринесе за прецизиране на схема за индивидуализирана терапия и молекулен мониторинг на заболяването.

6. БИБЛИОГРАФИЯ :

- 1). Foster, C.S., et al., The cellular and molecular basis of prostate cancer. *VJU Int*, 1999. 83(2): p. 171-94.
- 2). Валерианова З., Димитрова Н., Тонев С. и др., Заболяемост от рак в България, 2012. Том XXIII 2014, стр.47-49
- 3). Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press: Lyon 2004; 162-208
- 4). Rosai J. Prostate and seminal vesicles in Rosai and Akerman's Surgical Pathology, 9th ed., IRAC Press, 2011
- 5). NICE clinical guideline 175, 2014 Prostate cancer: diagnosis and treatment. NICE 2014
- 6). Arlen PM, et al. Prostate Specific Antigen Working Group. Prostate Specific Antigen Working Group guidelines on prostate specific antigen doubling time. *J Urol* 2008; 179 (6): 2181-2185
- 7). Heidenreich A. Identification of high-risk prostate cancer: role of prostate-specific antigen, PSA doubling time, and PSA velocity. *Eur Urol* 2008; 54 (5): 976-977
- 8). Jan-Erik Damber, Gunnar Aus Prostate cancer(book) (2008)
- 9). Shah R, Zhou M. Prostate biopsy interpretation: An illustrated guide. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012
- 10). Rosai J. Prostate and seminal vesicles in Rosai and Akerman's Surgical Pathology, 9th ed., IRAC Press, 2011
- 11). O'Dowd GJ, et al. The Gleason score: A significant biologic manifestation of prostate cancer aggressiveness on biopsy. *PCRI Insights* 2001; 4.1
- 12). Tabesh A, et al. Multifeature prostate cancer diagnosis and Gleason grading of histological images. *IEEE transactions on medical imaging* 2007; 26: 1366-1378
- 13). Thomas, G., et al., Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet*, 2008. 40(3): p. 310-5.
- 14). Eeles, R.A., et al., Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet*, 2008. 40(3): p. 316-21.

-
- 15). Edwards, S.M. and R.A. Eeles, Unravelling the genetics of prostate cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2004. 129C(1): p. 65-73.
- 16). Freedman, M.L., et al., Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(38): p. 14068-73.
- 17). Schumacher, F.R., et al., A common 8q24 variant in prostate and breast cancer from a large nested case-control study. *Cancer Res*, 2007. 67(7): p. 2951-6.
- 18). Yeager, M., et al., Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nat Genet*, 2007. 39(5): p. 645-649.
- 19). Gudmundsson, J., et al., Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nat Genet*, 2007. 39(5): p. 631-7.
- 20). Gudmundsson, J., et al., Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Genet*, 2007. 39(8): p. 977-83.
- 21). Thomas, G., et al., Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet*, 2008. 40(3): p. 310-5.
- 22). Long-Cheng Li 1,2, Rajvir Dahiya 1 1 Department of Urology, University of California San Francisco and Veterans Affairs Medical Center San Francisco, San Francisco, CA 94121, USA, 2 Department of Urology, Tongji Hospital/Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China Epigenetics of prostate cancer 2003
- 23). William G. Nelson, Angelo M. De Marzo, and Srinivasan Yegnasubramanian Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center and Brady Urological Institute, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21231 Minireview: Epigenetic Alterations in Human Prostate Cancers 2009
- 24). Long-Cheng Li, Rajvir Dahiya Epigenetics of prostate cancer. *Frontiers in Bioscience* 12, 3377-3397, May 1, 2007.
- 25). Li, L. C., R. Chui, K. Nakajima, B. R. Oh, H. C. Au & R. Dahiya: Frequent methylation of estrogen receptor in prostate cancer: correlation with tumor progression. *Cancer Res*, 60, 702-6 (2000)
- 26). Sasaki, M., Y. Tanaka, G. Perinchery, A. Dharia, I. Kotcherguina, S. Fujimoto & R. Dahiya: Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 94, 384-90 (2002)

-
- 27). Jarrard, D. F., H. Kinoshita, Y. Shi, C. Sandefur, D. Hoff, L. F. Meisner, C. Chang, J. G. Herman, W. B. Isaacs & N. Nassif: Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 58, 5310-4 (1998)
- 28). Nojima, D., L. C. Li, A. Dharia, G. Perinchery, L. Ribeiro-Filho, T. S. Yen & R. Dahiya: CpG hypermethylation of the promoter region inactivates the estrogen receptor-beta gene in patients with prostate carcinoma. *Cancer*, 92, 2076-83 (2001)
- 29). Yegnasubramanian, S., J. Kowalski, M. L. Gonzalgo, M. Zahurak, S. Piantadosi, P. C. Walsh, G. S. Bova, A. M. De Marzo, W. B. Isaacs & W. G. Nelson: Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res*, 64, 1975-86 (2004)
- 30). Bott, S. R., M. Arya, R. S. Kirby & M. Williamson: p21(WAF1/CIP1) gene is inactivated in metastatic prostatic cancer cell lines by promoter methylation. *Prostate Cancer Prostatic Dis* (2005)
- 31). Nguyen, T. T., C. T. Nguyen, F. A. Gonzales, P. W. Nichols, M. C. Yu & P. A. Jones: Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor expression and methylation patterns in human prostate cancers. *Prostate*, 43, 233-42 (2000)
- 32). Verkaik, N. S., J. Trapman, J. C. Romijn, T. H. Van der Kwast & G. J. Van Steenbrugge: Down-regulation of CD44 expression in human prostatic carcinoma cell lines is correlated with DNA hypermethylation. *Int J Cancer*, 80, 439-43 (1999)
- 33). Verkaik, N. S., G. J. van Steenbrugge, W. M. van Weerden, M. J. Bussemakers & T. H. van der Kwast: Silencing of CD44 expression in prostate cancer by hypermethylation of the CD44 promoter region. *Lab Invest*, 80, 1291-8 (2000)
- 34). Vis, A. N., M. Oomen, F. H. Schroder & T. H. van der Kwast: Feasibility of assessment of promoter methylation of the CD44 gene in serum of prostate cancer patients. *Mol Urol*, 5, 199-203 (2001)
- 35). Kito, H., H. Suzuki, T. Ichikawa, N. Sekita, N. Kamiya, K. Akakura, T. Igarashi, T. Nakayama, M. Watanabe, K. Harigaya & H. Ito: Hypermethylation of the CD44 gene is associated with progression and metastasis of human prostate cancer. *Prostate*, 49, 110-5. (2001)
- 36). Enokida, H., H. Shiina, S. Urakami, M. Igawa, T. Ogishima, L. C. Li, M. Kawahara, M. Nakagawa, C. J. Kane, P. R. Carroll & R. Dahiya: Multigene methylation analysis for detection and staging of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 11, 6582-8 (2005)

- 37). Zhou, M., Y. Tokumaru, D. Sidransky & J. I. Epstein: Quantitative GSTP1 methylation levels correlate with Gleason grade and tumor volume in prostate needle biopsies. *J Urol*, 171, 2195-8 (2004)
- 38). Jeronimo, C., R. Henrique, P. F. Campos, J. Oliveira, O. L. Caballero, C. Lopes & D. Sidransky: Endothelin B receptor gene hypermethylation in prostate adenocarcinoma. *J Clin Pathol*, 56, 52-5 (2003)
- 39). Nelson, J. B., W. H. Lee, S. H. Nguyen, D. F. Jarrard, J. D. Brooks, S. R. Magnuson, T. J. Opgenorth, W. G. Nelson & G. S. Bova: Methylation of the 5' CpG island of the endothelin B receptor gene is common in human prostate cancer. *Cancer Res*, 57, 35-7 (1997)
- 40). Wu, M. & S. M. Ho: PMP24, a gene identified by MSRF, undergoes DNA hypermethylation-associated gene silencing during cancer progression in an LNCaP model. *Oncogene*, 23, 250-9 (2004)
- 41). Enokida, H., H. Shiina, M. Igawa, T. Ogishima, T. Kawakami, W. W. Bassett, J. W. Anast, L. C. Li, S. Urakami, M. Terashima, M. Verma, M. Kawahara, M. Nakagawa, C. J. Kane, P. R. Carroll & R. Dahiya: CpG hypermethylation of MDR1 gene contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer. *Cancer Res*, 64, 5956-62 (2004)
- 42). Kim, H., J. Lapointe, G. Kaygusuz, D. E. Ong, C. Li, M. van de Rijn, J. D. Brooks & J. R. Pollack: The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res*, 65, 8118-24 (2005)
- 43). Laner, T., W. A. Schulz, R. Engers, M. Muller & A. R. Florl: Hypomethylation of the XIST gene promoter in prostate cancer. *Oncol Res*, 15, 257-64 (2005)
- 44). Cho, B., H. Lee, S. Jeong, Y. J. Bang, H. J. Lee, K. S. Hwang, H. Y. Kim, Y. S. Lee, G. H. Kang & D. I. Jeoung: Promoter hypomethylation of a novel cancer/testis antigen gene CAGE is correlated with its aberrant expression and is seen in premalignant stage of gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 307, 52-63 (2003)
- 45). Pong, R. C., Y. J. Lai, H. Chen, T. Okegawa, E. Frenkel, A. Sagalowsky & J. T. Hsieh: Epigenetic regulation of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) gene promoter in urogenital cancer cells. *Cancer Res*, 63, 8680-6 (2003)
- 46). Goldsmith, M. E., M. Kitazono, P. Fok, T. Aikou, S. Bates & T. Fojo: The histone deacetylase inhibitor FK228 preferentially enhances adenovirus transgene expression in malignant cells. *Clin Cancer Res*, 9, 5394-401 (2003)

-
- 47). Stirzaker, C., J. Z. Song, B. Davidson & S. J. Clark: Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells. *Cancer Res*, 64, 3871-7 (2004)
- 48). Metzger, E., M. Wissmann, N. Yin, J. M. Muller, R. Schneider, A. H. Peters, T. Gunther, R. Buettner & R. Schule: LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, 437, 436-9 (2005)
- 49). Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999 Dec 1;59 (23):5975-9.
- 50). Hessels D, Rittenhouse H.G, Schalken J.A, *Molecular Diagnostics in Prostate Cancer. Molecular Biology for the Urologist* 2005
- 51). de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeney LA, Aalders TW, et al. DD3PCA3, a Very Sensitive and Specific Marker to Detect Prostate Tumors. *Cancer Res*. 2002;62:2695-2698.
- 52). Schalken J.A, Hessels D, Verhaegh G New targets for therapy in prostate cancer : Differential display code 3 (DD3PCA3), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology*. 2003 62(5 Suppl 1):34-43.
- 53). Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Mostafa E, Trudel C u PM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer . *Urology*. 2004 Aug;64(2):311-5
- 54). Groskopf J, Aubin SMJ, Deras IL, Blasé A, Bodrug S, Clark C APTIMA PCA3 molecular urine test : development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*. 2006 Jun;52(6)
- 55). Hessels D, Klein Gunnewiek J, van Oort I, Karthaus H, van Leenders G, van Balken B DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*. 2003 Jul;44(1):8-15
- 56). Parekh DJ, Ankerst DP, Troyer D, Srivastava S, Thompson IM. Biomarkers for prostate cancer detection. *J of Urology* 2007
- 57). Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C DD3PCA3 analysis in urine – a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur Urol*. 2004 Aug;46(2):182-6
- 58). Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8347-51.

- 59). Perner S, Demichelis F, Beroukhir R, Schmidt FH, Mosquera JM, Setlur S et.al. TMPRSS2:ERG fusion associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8337-41
- 60). Nam R. K, Sugar L, Wang Z et.al., Expression of TMPRSS2 ERG Gene Fusion in Prostate Cancer Cells is an Important Prognostic Factor for Cancer Progression. *Cancer Biology & Therapy* 6:1, 40-45, January 2007
- 61). Wang J, Cai Yi, Ren C, and Ittmann M Expression of Variant TMPRSS2/ERG Fusion Messenger RNAs Is Associated with Aggressive Prostate Cancer. *Cancer research*, 2006
- 62). Hessels D, Smit F. P, Verhaegh G.W, et.al., Detection of TMPRSS2-ERGFusion Transcripts and Prostate CancerAntigen 3 in Urinary Sediments May Improve Diagnosis of Prostate Cancer *Clin Cancer Res.* 2007
- 63). Jones, P. A., and Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* 3, 415-428 (June 2002)
- 64). Merlo, A., Herman, J. G., Mao, L., Lee, D. J., Gabrielson, E., Burger. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1995
- 65). Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R., Vertino, P. M., and Issa J. P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998
- 66). Jones, P. A., and Laird, P. W. Nat. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999
- 67). Zimniak P, Nanduri B, Piłkuła S et.al., Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymatic properties. *Eur J Biochem.* 1994 Sep 15;224(3):893-9.
- 68). Henderson, C. J., McLaren, A. W., Moffat, G. J., Bacon, E. J., and Wolf, C. R. Pi-Class glutathione S-transferase: regulation and function. 1998
- 69). Ryberg, D., Skaug, V., Høwer, A., et.al, Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis.* 1997
- 70). Lee WH, Morton RA, Epstein JI ,et.al., Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994

-
- 71) Lee, W-H., Isaacs, W. B., Bova, G. S., et.al., CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997
- 72). Brooks, J. D., Weinstein, M., Lin, X., et.al., CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* June 1998 7; 531
- 73). Bastian PJ, Yegnasubramanian S, Palapattu GS, et.al., Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation. *European Urology* Volume 46, Issue 6, 2004, Pages 698–708
- 74). Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, et.al., Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol.* Sep 2003; 163(3): 923–933
- 75). Cairns, P., Esteller, M., Herman, J. G., et.al., Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res* September 2001 7; 2727
- 76). Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et.al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2001)
- 77). Harden SN J SV, Sanderson H, Goodman et.al., Quantitative GSTP1 methylation and the detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Nov 5;95(21):1634-7.
- 78). Yutaka Tokumaru, Susan V. Harden, Dong-Il Sun, et.al., Optimal Use of a Panel of Methylation Markers with GSTP1. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5518-22.
- 79). Mark L. Gonzalgo, Christian P. Pavlovich et.al., Prostate Cancer Detection by GSTP1 Methylation Analysis of Postbiopsy Urine Specimens. *Clin Cancer Res.* 2003 Jul;9(7):2673-7
- 80). Catalona, W. J., Beiser, J. A., and Smith, D. S Serum free prostate specific antigen and prostate specific antigen density measurements for predicting cancer in men with prior negative prostatic biopsies. *J Urol.* 1997
- 81) Chon, C. H., Lai, F. C., McNeal, J. E., and Presti, J. C. Use of extended systematic sampling in patients with a prior negative prostate needle biopsy. *J Urol.* 2002 Jun;167(6):2457-60.

-
- 82). Borboroglu, P. G., Comer, S. W., Riffenburgh, R. H. Extensive repeat transrectal ultrasound guided prostate biopsy in patients with previous benign sextant biopsies. *J Urol.* 2000 Jan;163(1):158-62.
- 83) Stewart, C. S., Leibovich, B. C., Weaver, A. L., and Lieber, M. M. Prostate cancer diagnosis using a saturation needle biopsy technique after previous negative sextant biopsies. *J Urol.* 2001 Jul;166(1):86-91
- 84). Goessl, C., Krause, H., Muller, M., et.al., Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res November 1, 2000*
- 85) Goessl, C., Muller, M., Heicappell, R., et.al., DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Sep;945:51-8
- 86). Goessl, C., Muller, M., Heicappell, R., et.al. Methylation-specific PCR for detection of neoplastic DNA in biopsy washings. *J Pathol.* 2002 Mar;196(3):331-4
- 87). Narla G, Heath KE, Reeves HL, et al. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 2001;294:2563–6
- 88). Chen C, Hyytinen ER, Sun X, et al. Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer. *Am J Pathol* 2003;162:1349–54.
- 89).Goutham N, Analisa D, Fernandez Y , KLF6-SV1 overexpression accelerates human and mouse prostate cancer progression and metastasis. 2008.
- 90). Goutham Narla, Analisa DiFeo, Helen L. Reeves, et al. A Germline DNA Polymorphism Enhances Alternative Splicing of the *KLF6* Tumor Suppressor Gene and Is Associated with Increased Prostate Cancer Risk. *Cancer Res* 2005
- 91). Narla, G., et al. 2005. Targeted inhibition of the KLF6 splice variant, KLF6 SV1, suppresses prostate cancer cell growth and spread. *Cancer Res.* 65:5761–5768.
- 92). Benzeno, S., et al. 2004. Cyclin-dependent kinase inhibition by the KLF6 tumor suppressor protein through interaction with cyclin D1. *Cancer Res.* 64:3885–3891
- 93). Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development.* 2004;131:459–67.
- 94). Trapman J, Klaassen P, Kuiper GG, et al. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153:241–8.

-
- 95). Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, et al. Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol* 1993;7:1541-1550
- 96). Suzuki H, Sato N, Watabe Y, Masai M, Seino S, Shimazaki J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;46:759-765
- 97). Gaddipati JP, McLeod DG, Heidenberg HB, et al. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res* 1994;54:2861-2864
- 98). Nelson KA, Witte JS., Androgen Receptor CAG Repeats and Prostate Cancer. *American Journal of Epidemiology* 2002 155 (10): 883-890.
- 99). Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, et al. Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res* 1998;58:4497-4504.
- 100). Irving RA, Yu MC, Ross RK, et al. The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res* 1995;55:1937-40.
- 101). Yoshimoto M, Joshua AM, Cunha IW, Coudry RA, Fonseca FP, Ludkovski O et al (2008) Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Modern Pathology* 21(12):1451-60
- 102). Shen MM, Abate-Shen C (2010) Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges *Genes*. *Genes Dev* 24(18):1967-2000
- 103). Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS et al (2007) Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 448(7153): 595-9
- 104). Rajput AB, Miller MA, De Luca A, Boyd N, Leung S, Hurtado-Coll A, et al (2007) Frequency of the TMPRSS2:ERG gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers. *J Clin Pathol* 60(11):1238-1243
- 105). Eisermann K, Wang D, Jing Y, Pascal LE, Wang Z (2013) Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. *Transl Androl Urol*; 2(3):137-147.

7. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

• Публикации във връзка с дисертационния труд

1. **Tsvetkova A**, Todorova A, Todorov T, Georgiev G , Drandarska I, Mitev V. (2015) Molecular and clinico-histological data in aggressive prostate cancer patients from Bulgaria. JBUON IN PRESS (vol.20,no.2) (**Impact Factor 0,761**).
2. **Tsvetkova A**, Todorova A, Todorov T, Georgiev G , Drandarska I, Mitev V. (2015) Molecular and clinicopathological aspects of prostate cancer in Bulgarian probands. J POR DOI: 10.1007/s12253-015-9915-x (**Impact Factor 1,806**).
3. **А. Цветкова**, А. Тодорова, Т. Тодоров, Г. Георгиев, И. Дръндарска, В. Митев. (2014) Молекулярен профил и клиничко-патологични аспекти на простатен карцином при български пациенти. Списание на Българско Онкологично Дружество, БОД 4:18-26.
4. **А. Цветкова**, Т. Кадийска, Г. Георгиев, И. Дръндарска, А. Тодорова, В. Митев.(2013) Молекулярно-генетичен подход в комбинация с клинични и хистологични данни за диагностика на простатен карцином. сп. Онкология 3:50-55.

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 2,567

• Научни прояви във връзка с дисертационния труд

1. Tsvetkova A, Todorova A, Georgiev G, Kirov A, Mitev V. (Hungary 2012) *TMPRSS2-ERG* (Pathological) Gene Fusions in Patients with Prostate Cancer (PCa). Symbiose " The 16th Symposium of Biology Students in Europe 27July-6 August 2012 in Szeged and Gödollo.
2. Tsvetkova A. (Hungary 2012) Overexpression of DD3 genetic marker for early diagnosis of patients with prostate cancer (PCa). P.24 Symbiose " The 16th Symposium of Biology Students in Europe 27July-6 August 2012 in Szeged and Gödollo.
3. Tsvetkova A, Todorova A, Georgiev G, Mitev V. (2013) Simultaneous interpretation of combinative molecular analysis with histological and clinical data in prostate cancer patients.

Eur J Hum Genet, 2013 (P11.218) ESHG Conference, June 8-11, 2013, Paris, France.

4. Tsvetkova A, Todorova A, Georgiev G, Drandarska I, Mitev V. (2013) Molecular combinative analysis in diagnosis, treatment and prognosis of prostate cancer (PCa) in correlation with histological results. Book of abstracts: 99, P6.3 10th Balkan Congress of Human Genetics, October 10-12, 2013, Bled, Slovenia.

5. Tsvetkova A, Todorova A, Georgiev G, Drandarska I, Mitev V. (2014) 'Molecular subtyping of three aggressive PCa patients from Bulgaria in correlation with clinic-histological data' Eur J Hum Genet, 2014 (Control No. 2014-A-1960-ESHG Conference, May-31-June-3 2014, Milano, Italy.

6. Проект № 8-Д 2012г; Договор № 26-Д от конкурса „Млад изследовател”. Тема: Промоторно хиперметиране на GSTP1 гена при пациенти с рак на простатата - маркер за ранна диагностика и остатъчно заболяване. - (водещ изследовател Анита Огнянова Цветкова, докторант катедра Медицинска химия и Биохимия- МУ София)

7. Проект № 17-Д 2013г. от конкурса „Млад изследовател”. Тема: Проучване прогностичната и диагностична стойност на IVS1 -27:G/A полиморфизма в KLF6 гена за предсказване състояния на простатен карцином с бърза прогресия и метастазиране. -(водещ изследовател Анита Огнянова Цветкова, докторант катедра Медицинска химия и Биохимия- МУ София)

8. ПРИНОСИ

1. Беше въведена специфична молекулно-генетична диагностика на заболяването простатен карцином.

2. Проведените анализи бяха използвани за диагностични цели.

3. Предложен е алгоритъм за интердисциплинарен подход при диагностика и мониториране на простатен карцином.