



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ**

---

**ДАРИНА ЛЮДМИЛОВА КАЧАКОВА**

**МОЛЕКУЛНО ПРОФИЛИРАНЕ ПРИ РАКА НА ПРОСТАТАТА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

На дисертационен труд за присъждане на  
Образователна и научна степен „ДОКТОР“

Научна специалност: „Молекулярна генетика”

Професионално направление 4.3. Биологически науки

Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика

**Научни ръководители:**

Акад. проф. д-р Ваньо Митев, дм, дбн,

Доц. д-р Радка Кънева, дб

**Научен консултант:**

Гл. ас. д-р Атанаска Миткова, дб

---

София, 2015

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ**

---

**ДАРИНА ЛЮДМИЛОВА КАЧАКОВА**

**МОЛЕКУЛНО ПРОФИЛИРАНЕ ПРИ РАКА НА ПРОСТАТАТА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

На дисертационен труд за присъждане на  
Образователна и научна степен „ДОКТОР“

Научна специалност: „Молекулярна генетика”  
Професионално направление 4.3. Биологически науки  
Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика

**Научни ръководители:**

Чл. кор. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн,  
Доц. д-р Радка Петрова Кънева, дб

**Научен консултант:**

Гл. ас. д-р Атанаска Величкова Миткова, дб

**Научно жури в състав:**

*Председател:*

проф. д-р Иво Маринов Кременски (рецензия)

*Членове:*

чл. кор. проф. д-р Ваньо Иванов Митев (становище)

проф. д-р Маргарита Любенова Генова (рецензия)

доц. д-р Веселин Петров Баев (становище)

проф. Татяна Иванова Влайкова (становище)

---

София, 2015

Дисертационният труд съдържа 325 страници,  
176 фигури, 143 таблици.

Цитирани са 795 литературни източника и 20 интернет сайта.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедра Медицинска Химия и Биохимия към Медицински факултет на Медицински университет – София съгласно правилника за условията и реда на придобиване на придобиване на научни степени в МУ - София на 05.03.2015.

Публичната защита на дисертационният труд ще се проведе на 01.06.2015, в III-та Аудитория, на 4 етаж в Предклиничен Университетски Център (ПУЦ), Медицински Университет – София, ул. „Здраве 2”, от 14 часа.

Всички изследвания по дисертационния труд са извършени в Центъра по Молекулна Медицина, Катедра Медицинска Химия и Биохимия, МФ, МУ – София.

Изследванията по дисертационния труд са финансирани от:

1. 2009-2012г. - Проучване на генетични варианти свързани с повишен риск и търсене на диагностични, прогностични и експресионни маркери при рака на простатата, МОН
2. 2010-2011г. - Изследване на промоторно хиперметиране на биомаркери в урина, асоциирани с рака на простатата и оценяване на тяхната диагностична стойност при български пациенти, МУ-София
3. 2011-2012г. - Асоциативно проучване на полиморфни варианти, разположени в хромозомен локус 11p15 и оценяване на тяхната значимост за развитието на рака на простатата, МУ-София (докторантски проект)
4. 2012-2013г. - Експресионно профилиране на miRNAs в простатни тъкани и плазма при български пациенти, МУ-София (докторантски проект)
5. 2013-2014г. - miRNAs експресионно профилиране в плазма и урина от пациенти с рак на простатата, МУ-София (докторантски проект)
6. 2012-2014г. - Експресионно профилиране на miRNAs при рак на простатата и подбор на диагностични и прогностични биомаркери, МОН

**Автор:** Дарина Людмила Качакова

**Заглавие:** Молекулно профилиране при рака на простатата

Материалите по защитата са на разположение в Центъра по Молекулна Медицина, сградата на СБАЛАГ “Майчин дом“ на ул. Здраве №2, ет. 14

# СЪДЪРЖАНИЕ

<b>1. ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	<b>2</b>
2.1. Цел .....	2
2.2. Задачи .....	2
<b>3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	<b>3</b>
3.1. Клиничен и биологичен материал .....	3
3.2. Преданалитична обработка на биологичните материали .....	4
3.3. Аналитична обработка .....	5
3.4. Статистически методи за анализ.....	7
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>9</b>
4.1. Резултати от асоциативен анализ на полиморфни варианти открити при GWAS .....	9
4.2. Резултати от асоциативен анализ на полиморфни варианти разположени в гените <i>CYP1B1</i> , <i>AR</i> и <i>AMACR</i> .....	12
4.3. Резултати от анализа на промоторно хиперметиране на гените <i>GSTP1</i> , <i>HIST1H4K</i> и <i>RASSF2</i> ....	13
4.4. Резултати от експресионния анализ на <i>GSTP1</i> , <i>PSA</i> , <i>PCA3</i> , <i>AMACR</i> и <i>GOLPH2 (GOLM1)</i> в урина.....	17
4.5. Резултати от експресионния анализ на <i>let-7c</i> , <i>miR-30c</i> , <i>miR-141</i> и <i>miR-375</i> в плазма .....	20
4.6. Резултати от микроРНК микрочиповия анализ.....	26
<b>5. ОБСЪЖДАНЕ</b> .....	<b>36</b>
5.1. Обсъждане на получените резултати от асоциативен анализ на полиморфни варианти открити при GWAS.....	36
5.2. Обсъждане на получените резултати от асоциативен анализ на полиморфни варианти разположени в гените <i>CYP1B1</i> , <i>AR</i> и <i>AMACR</i> .....	37
5.3. Обсъждане на получените резултати от анализа на промоторно хиперметиране на гените <i>GSTP1</i> , <i>HIST1H4K</i> и <i>RASSF2</i> .....	38
5.4. Обсъждане на получените резултати от експресионния анализ на <i>GSTP1</i> , <i>PSA</i> , <i>PCA3</i> , <i>AMACR</i> и <i>GOLPH2 (GOLM1)</i> в урина.....	40
5.5. Обсъждане на получените резултати от експресионния анализ на <i>let-7c</i> , <i>miR-30c</i> , <i>miR-141</i> и <i>miR-375</i> в плазма .....	42
5.6. Обсъждане на получените резултати от микроРНК микрочиповия анализ .....	43
<b>6. ИЗВОДИ</b> .....	<b>50</b>
<b>7. ПРИНОСИ</b> .....	<b>51</b>
<b>8. БИБЛИОГРАФИЯ</b> .....	<b>52</b>
<b>9. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ</b> .....	<b>59</b>
<b>10. SUMMARY</b> .....	<b>61</b>

## Списък на най-често използваните съкращения:

### Кирилица

**ДНК**- дезоксирибонуклеинова киселина (DNA)

**ДПХ** – доброкачествена простатна хиперплазия

**иРНК** – информационна РНК (mRNA)

**кДНК** – копи ДНК (cDNA)

**МАМ** - млади асимптоматични мъже

**микроРНК/ микроРНК-и** - miRNA/miRNAs

**мКРРП** – метастатичен кастрационно резистентен рак на простатата

**РНК** – рибонуклеинова киселина (RNA)

**РП** - рак на простатата

### Латинца

**AUC** – area under the curve

**DRE**- дигитален ректален преглед

**FDR** – false discovery rate

**GWAS** - Genome Wide Association Studies (Големи геномни асоциативни проучвания)

**HRMA** – High resolution melting analysis – анализ чрез високорезолютивно топене на ДНК

**kb** – килобази

**MS-HRMA** – метил специфичен анализ чрез високо резолютивно топене на ДНК

**PCA** – principle component analysis – анализ на основните компоненти

**PCR** – Polymerase Chain Reaction – Полимеразна Верижна Реакция

**PRACTICAL** – Prostate Cancer Association Group to Investigate Cancer Associated Alterations in the Genome

**PSA** – простатно специфичен антиген

**RT-PCR** – Reverse Transcription PCR

**ROC curve analysis**– receiver operating characteristics curve – анализ на ROC кривите

**SNP/SNPs** – single nucleotide polymorphism/polymorphisms (еднонуклеотиден полиморфизъм/ еднонуклеотидни полиморфизми)

## ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът на простатата (РП) представлява основен здравен проблем в развитите страни тъй като има висока честота на заболяемост и смъртност, и засяга най-често възрастните мъже. По тази причина е необходимо намирането на биомаркери, които да са по-надежни от серумните нива на PSA, да спомагат за ранно и неинвазивно диагностициране, ограничавайки броя на ненужните биопсии, да могат да се използват за разграничаване на пациентите с агресивни от неагресивни тумори и за прогнозиране на изхода от проведено лечение.

Въпреки напредъка в науката етиологията на РП не е напълно изяснена. Единствените установени рискови фактори са възрастта, етноса и фамилната история. На генетичните фактори се дължат 42% от риска за развитие на това заболяване, но също е установено че и други фактори като възпаленията и имунната система, диетата, начина на живот оказват влияние. Все още не е изяснено взаимодействието между тях.

Предполага се, че андрогените играят важна роля не само за нормалното развитие на простатната жлеза, но също така участват и в простатната карциногенеза. Доказателство за това са установените различни нива на андрогените при афро американците в сравнение с останалите популации и наблюдаваната различна честота на заболяемост от РП. Открити са и полиморфни варианти в гени, участващи в андрогеновия метаболизъм като *AR* и *CYP17A1*, които модифицират риска за развитие на това заболяване. Резултатите за някои от тях обаче са противоречиви и по тази причина е необходимо тяхното изследване в различни популации.

Епидемиологичните изследвания показват, че повишената консумация на червено месо и млечни продукти, които са главни източници на разклонени мастни киселини, са асоциирани с риска за развитие на РП. В подкрепа на това е открито, че един от ензимите наречен АМАСР, участващ в метаболизма на мастни киселини, е с повишена експресия в простатни тумори и полиморфизми в него модифицират риска за развитие на РП. Повишената активност на АМАСР води до генериране на свободни радикали, за които е известно че предизвикват оксидативен стрес и ДНК повреди. Установено е, че оксидативният стрес е основен фактор в карциногенезата на простатната жлеза.

Благодарение на големите асоциативни проучвания (GWAS) са открити над 70 хромозомни локуса асоциирани с РП като те обясняват около 30% от риска за развитие на това заболяване и имат нисък до среден ефект. Необходимо е тяхното многократно валидиране в различни популации. По-голяма част от асоциираните полиморфни варианти се намират в извънгенни области на генома и по тази причина, за да се разберат точните механизми, водещи до възникване на РП трябва да се намерят гените отговорни за получените сигнали от GWAS. Това би спомогнало за по-точно определяне на индивидуалния риск за развитие на РП.

Простатната карциногенеза се съпътства от множество генетични, геномни и епигенетични промени. Някои от тези промени се изследват като потенциални диагностични и прогностични биомаркери. Тяхното валидиране е много трудно тъй като РП е хетерогенен и мултифокален (мултилокусен), и също така съществуват вариации в дизайна и използваните методи в отделните проучвания. Особен интерес обаче представляват неинвазивните биомаркери, които могат да се открият в телесни течности като урина и кръв (плазма/серум). Те дават възможност за изследване на пациенти с мултифокални и хетерогенни простатни тумори. Биомаркери изследвани в телесни течности при РП са например промоторното хиперметиране, промяната в нивата на микроРНК-ите (miRNAs) и иРНК-ите (mRNAs). микроРНК-ите и CpG промоторното метилиране са част от епигенетичния механизъм за контрол на експресията на гените, за който се предполага че е засегнат още в най-ранните етапи на простатната туморогенеза. Един от промоторно хиперметираните биоамаркери интензивно изследван при РП е *GSTP1*. CpG промоторната област на този ген е метилирана във висок процент от изследваните биологични материали от пациентите с РП, но също така метилиране е открито и в проби на контроли без рак в някои проучвания. По тази причина ролята му в клиничната практика не е напълно изяснена. Промоторно хиперметиране при РП е открито и при други гени като нови потенциални диагностични

биоамаркери са *HIST1H4K* и *RASSF2*. Интензивно се изследват и нивата на експресия на иРНК-ите. Биомаркерите *AMACR*, *PCA3*, *PSA*, *GOLPH2* е установено, че имат променена експресия в урина от пациенти с РП в редица проучвания, но е необходимо тяхното валидиране.

Обещаващи биомаркери са микроРНК-ите тъй като те функционират като туморсупресори и онкогени и са особено стабилни в сравнение с другите биомаркери. Редица проучвания показват, че нивата на експресия на *let-7c*, *miR-30c*, *miR-141* и *miR-375* са променени в плазма/серум на пациенти с РП спрямо контроли.

В настоящия дисертационен труд е посветен на валидиране и търсене на нови генетични, епигенетични и експресионни биомаркери с по-добра диагностична и предиктивна стойност в сравнение с утвърдените към момента с цел подобряване на скрининга и ранното откриване на РП в България. Проведохме асоциативни проучвания на подбрани от литературата (в гените *AR*, *CYP1B1*, *AMACR* и такива открити от GWAS), и неизследвани до този момент полиморфни варианти (в хромозомния локус 11p15). Бяха изследвани нивата на експресия на иРНК и промоторно хиперметилирани биомаркери в урина, нивата на експресия на микроРНК-и в плазма, с цел определяне на тяхната диагностична и прогностична стойност и сравнихме получените резултати с тези докладвани от други изследователи. Проведохме и микроРНК експресионно профилиране в туморни и нормални простатни тъкани чрез микрочипове, за да открием нови потенциални биоамаркери при РП.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### 2.1. ЦЕЛ

**Изследване на генетични фактори асоциирани с рака на простатата при български пациенти и анализ на промоторното хиперметилиране, нивата на експресия на иРНК и микроРНК в различни биологични материали за определяне на тяхната роля като диагностични и прогностични биомаркери.**

### 2.2. ЗАДАЧИ

**За изпълнението на поставената цел си възложихме следните задачи:**

2.2.1. Подбор на пациенти с РП и контроли с български етнически произход (пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия - ДПХ, популационни контроли съответстващи по пол, възраст и етническа принадлежност на пациентите, млади асимптоматични мъже - МАМ) и събиране на различни биологични материали.

2.2.2. Оптимизиране на протоколите за изолиране на ДНК/РНК от изследваните биологични материали, където е необходимо.

2.2.3. Провеждане на асоциативно проучване с подбрани от GWAS показали асоциация с РП еднонуклеотидни полиморфни варианти разположени в различни хромозомни локуси (7q21, 8q24, 10q11, 11p15, 12q13, 19q13) и финно картиране на хромозомен локус 11p15 за прецизиране на асоциацията с РП получена за този локус.

2.2.4. Провеждане на асоциативно проучване с подбрани от литературата полиморфизми в *AMACR* и в гени, свързани с метаболизма на андроген (*CYP1B1*, *AR*).

2.2.5 Провеждане на генно експресионен анализ на *PCA3* (*DD3*), *PSA* (*KLK3*), *AMACR*, *GSTP1*, *COLPH2* (*GOLM1*) в урина на пациенти с РП и контроли с ДПХ чрез PCR в реално време, TaqMan технология.

2.2.6. Изследване на промоторното хиперметилиране на *GSTP1*, *HIST1H4K* и *RASSF2* в урина на пациенти с РП и контроли (ДПХ и МАМ) чрез HRM, MethyLight.

2.2.7. Изследване на нивата на експресия на *let-7c*, *miR-30c*, *miR-141* и *miR-375* в плазма от пациенти с РП и контроли (ДПХ и МАМ) чрез PCR в реално време, SybrGreen технологията.

2.2.8. микроРНК експресионно профилиране в туморни и нормални простатни тъкани чрез микрочипов анализ.

2.2.9. Анализ на получените резултати.

### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 3.1. Клиничен и биологичен материал

Участниците бяха набирани при рутинен скрининг на пациентите, насочени към Клиниката по Урология, Университетска болница “Александровска”, МУ - София за заболяване от простатен аденокарцином както и насочени от специалисти и общопрактикуващи лекари. Биологични проби като кръв и урина бяха взимани и от млади мъже, доброволци след подписване на информирано съгласие. Броят на включените пациенти с РП, контролите с ДПХ, популационните контроли и МАМ, както и вида използван биологичен материал за отделните проведени проучвания са представени в Таблица 1. Общо са изследвани 318 пациенти с РП, 182 контроли с ДПХ, 107 популационни контроли и 50 МАМ.

**Таблица 1. Проведени проучвания, вида използван биологичен материал и броя включени пациенти с РП, контроли с ДПХ и МАМ**

Проучване	Използван биологичен материал	Брой пациенти с РП	Брой контроли с ДПХ	Брой популационни контроли	Брой МАМ
Асоциативни проучвания на еднонуклеотидни замени в различни хромозомни локуси открити при GWAS*	Венозна кръв	318	182	75	-
Асоциативни проучвания на полиморфизми в AR, CYP1B1 и AMACR гените**	Венозна кръв	246	150	107	-
Анализ на експресионни биомаркери PSA, PCA3, AMACR, GSTP1, GOLPH2	Урина	54	13	-	-
Промоторно хиперметиране на GSTP1 чрез HRM анализ	Урина	64	26	-	20
Промоторно хиперметиране на HIST1H4K и RASSF2 чрез MethyLight	Урина	57	29	-	50
Експресионен анализ на let-7c, miR-30c, miR-141, miR-375	Плазма	59	16	-	11
микроРНК експресионно профилиране чрез микрочипове	Тъкан от радикална простатектомия и биопсия	19	14	-	-

\* - Всички еднонуклеотидни полиморфизми освен rs55930300 бяха изследвани в 190 пациенти с РП и 169 контроли, от които 90 са с ДПХ, а останалите 79 са здрави популационни контроли съответстващи на болните по пол, възраст и етническа принадлежност. Популационните контроли бяха избрани от съществуващата ДНК биобанка в Центъра по Молекулярна медицина. Полиморфизмът rs55930300 бе изследван в 381 пациенти с РП и 257 контроли, от които 182 са с ДПХ, а останалите 75 са популационни контроли. Генотипирането на всички еднонуклеотидни замени бе осъществено с помощта на TaqMap метода.

\*\* - Тринуклеотидният повторен полиморфизъм в AR бе изследван чрез фрагментен анализ в 246 пациенти с РП и 261 контроли, от които 150 са с ДПХ и 107 са популационни контроли. Полиморфизмът rs2567206 в CYP1B1 бе генотипиран в 181 пациенти с РП и 168 контроли, от които 88 са с ДПХ, а останалите 80 са популационни контроли. Полиморфизмът в AMACR- rs3195676 бе генотипиран в 188

пациенти с РП и 163 контроли, от които 83 са с ДПХ, а останалите 80 са популационни контроли. Полиморфизмите в AMACR и CYP1B1 бяха изследвани чрез TaqMan метода.

### **3.2. Преданалитична обработка на биологичните материали**

#### **3.2.1. Изолиране на ДНК**

##### 3.2.1.1. Изолиране на ДНК от венозна кръв

За изолиране на ДНК от венозна кръв бе използвана полуавтоматизираната система Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen) и специален кит, включващ набор от реактиви, както и магнитни частици (M-PVA Magnetic Beads). Следваха се инструкциите на фирмата производител.

##### 3.2.1.2. Изолиране на ДНК от урина

Изолирането на ДНК от урина бе осъществено с помощта на ZR Urine DNA Isolation Kit (Zymo Research). Този кит осигурява лесно и бързо изолиране на тотална ДНК от клетки и биологични седименти в проби от урина. Клетките от урината се изолират с помощта на спринцовка и специален филтър. След това се осъществява лизиране на клетките и събиране на лизата, който може да бъде обработен веднага или може да се съхрани до една седмица на стайна температура. Лизатът се прехвърля в колонки със специална мембрана. ДНК се закача за нея и се промива няколко пъти с Wash буфери (промивачи). Накрая ДНК се разтваря в Elution (Елуиращ) буфер и се прехвърля в 1.5 мл епруветки. Така изолираната ДНК може да бъде съхранена на -20 °C или -80°C, или може да бъде използвана веднага. При изолирането бяха следвани инструкциите на производителя, но първата стъпка бе модифицирана.

#### **3.2.2. Изолиране на РНК**

##### 3.2.2.1. Изолиране на РНК от урина

Изолирането на РНК от урина бе осъществено с помощта на ZR Urine RNA Isolation kit (Zymo Research), но също така бе използван Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit (Fisher Scientific, но се предлага и от Norgen). И двата кита предлагат бързо с помощта на колонки изолиране на тотална РНК, включваща и малки РНК молекули от урина. Не използват фенол или хлороформ. Изолира се РНК с добро качество. По време на изолирането се осъществява и пречистване от ДНК с помощта на Dnase I ензим. Оптимизирана е първата стъпка от изолирането.

##### 3.2.2.2. Изолиране на РНК, съдържаща и микроРНК-и от плазма

Изолирането на тотална РНК, включваща и микроРНК-и от плазма бе осъществено с помощта на специфичен кит: miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen). Този кит комбинира фенол/гуанидин базираното лизиране на пробите и пречистване на тотална РНК с помощта на силициевите мембрани.

##### 3.2.2.3. Изолиране на РНК, съдържаща и микроРНК от тъкан

Изолирането на тотална РНК, включваща и микроРНК-и от радикални простатектомии и биопсиите бе осъществено с помощта съответно на miRneasy Mini kit (Qiagen) и miRNeasy Micro kit (Qiagen). Бе оптимизирана стъпката на лизиране.

#### 3.2.3. Оценка на качеството и концентрацията на изолираната ДНК/РНК

3.2.3.1. Измерване на концентрацията и определяне на качеството на изолираната ДНК/РНК чрез спектрофотометричен метод. Това бе осъществено с помощта на NanoDrop (Thermo Scientific)

3.2.3.2. Измерване на концентрацията на изолираната ДНК/РНК с флуориметричен метод с помощта на Qubit (Life Technologies)

3.2.3.3. Определяне на концентрацията и RIN<sup>с</sup> на изолираната РНК от тъкан чрез Agilent 2200 TapeStation Systems

3.2.3.4. Определяне на качеството на изолираната ДНК посредством агарозна гел електрофореза

#### **3.2.4. Бисулфитно третиране на ДНК изолирана от урина**

Бисулфитното третиране бе осъществено с помощта на EZ DNA Methylation-Gold™ kit като се следваха инструкциите на фирмата производител.

**3.2.5. Изготвяне на 100% метилирани контроли необходими за анализа на промоторното хиперметиране с помощта на MSss I**

**3.2.6. Обратна транскрипция на изолираната РНК за синтез на кДНК**

Обратната транскрипция на изолираната РНК от урина за синтез на кДНК бе осъществено с помощта на следните китове High-Capacity cDNA Reverse Transcription kits, Super Script III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR.

Обратната транскрипция на изолираната РНК от плазма за синтез на кДНК от микроРНК бе осъществено с помощта на miScript II RT Kit.

**3.3. Аналитична обработка**

Използвана апаратура за аналитичните анализи:

- Хладилна центрофуга Centrifuge 5810R (Eppendorf);
- Устройство за разбъркване – Vortex - Press-to-mix (Snijders);
- Сух стерилизатор МММ (Ecocell).
- Системата Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen)
- NanoDrop (Thermo Scientific)
- Qubit (Life Technologies)
- Agilent 2200 TapeStation Systems
- PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Микроцентрофуга Micro CL 21 (Thermo Scientific)
- Апарат за PCR-амплификация Veriti 96-well (ABI) или Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Микровълнова фурна за разтапяне на агарозата (Daewoo KOR 6C27);
- Нивелирана маса за изливане на гела;
- Вана за хоризонтална гел електрофореза (Science-Plus-UK);
- Стартови гребени с размер на зъбите 5 x 1mm;
- Токоизправител (Science-Plus-UK);
- Фото-документационна система и UV–трансилюминатор с дължина на вълната 315nm (MiniBisPro - Bio Imaging Systems)
- 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)
- Beckman BIOMEK®FXp
- Автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems).
- Апарат за PCR-амплификация в реално време RotorGene 6000 (Qiagen).
- Вакуумна центрофуга
- Микрочипов скенер G2565CA (Agilent Technology)
- Хибридизационна камера с въртящ ротор (Agilent Technology)
- Магнитна бъркалка (x1 or x3) (Thermo Scientific)
- Магнитна бъркалка с възможност за нагряване
- Ледогенератор модел B20A (Fiochetti)
- Таймер
- Десикаторна кутия

**3.3.1. Полимеразна верижна реакция**

**3.3.2. Генотипиране на еднуклеотидни полиморфизми (Single Nucleotide Polymorphisms – SNP) чрез TaqMan технологията, PCR в реално време (Real Time PCR).**

Еднуклеотидни полиморфизми генотипирани чрез TaqMan технологията са rs2567206 (*CYP1B1*), rs3195676 (*AMACR*), rs6465657 (7q21.3, *LMTK2*), rs1016343 (8q24), rs4871008 (8q24), rs7841060 (8q24), rs620861 (8q24), rs10993994 (10q11.23, *MSMB*), rs7920517 (10q11.23), rs11603378 (11p15.5, *IGF2*), rs2239681 (11p15.5, *IGF2*), rs10770125 (11p15.5, *IGF2*), rs3842756 (11p15.5, *INS-IGF2*), rs2070762 (11p15.5, *TH*), rs11564710 (11p15.5), rs7127900 (11p15.5), rs55930300 (11p15.5, *ASCL2*), rs902774 (12q13.13), rs266849 (19q13.33, *KLK3*), rs2659056 (19q13.33, *KLK15*).

### **3.3.3. Изследване на (CAG)<sub>n</sub> микросателитен полиморфизъм в AR гена чрез фрагментен анализ и капилярна електрофореза**

Всяка една изследвана проба (PCR продукт) се смесва с вътрешен стандарт преди електрофореза. В текущото проучване бе използван молекулярния стандарт GeneScan™ ROX 500, при който дължината на фрагментите е от 35 до 500 bp. Капилярната електрофореза бе проведена на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl.

### **3.3.4. Анализ на промоторното хиперметиране на *GSTP1* чрез топене с висока резолюция на ДНК (High Resolution Melting Analysis- HRMA)**

При анализът чрез топене с висока резолюция прицелният участък от геномната секвенция се генерира чрез амплификация и след това се подлага на топене при условия на постепенно повишаване на температурата в малки интервали от време. Едно от приложенията на HRM технологията е за анализ на метилиране чрез сравняване на профилите на топене на неизвестни проби с профилите на напълно метилирани и неметирирани контроли амплифицирани след бисулфитна модификация (MS-HRM). PCR продуктите на метилираните проби имат различен GC състав от PCR продуктите на неметирираните проби, в които цитозините ще са се превърнали в урацилови остатъци след бисулфитната модификация. По тази причина продуктите ще имат различен профил на топене.

### **3.3.5. Анализ на промоторното хиперметиране на *HIST1H4K* и *RASSF2* чрез MethyLight анализ**

MethyLight е бисулфитно зависим, количествен, флуоресцентно базиран (TaqMan) PCR в реално време метод, който открива и количествено определя ДНК метилирането в геномна ДНК. Представява много чувствителен метод, който може да открие метилирани алели в присъствието на 10 000 пъти излишество на неметирирани алели. MethyLight методът се базира на специфична хибридизация на праймери и проби към метилирани матрици.

При този тип анализ се използват два типа реакции: 1) MethyLight реакции: бисулфитно превърнатата ДНК е матрица. Праймерите и пробата са специфични за метилирана ДНК и също така са специфични за бисулфитно третирана ДНК; 2) Бисулфитно специфична контролна реакция (ALU-C4): измерва количеството бисулфитно третирана ДНК в реакцията и служи за нормализация.

Количеството метилирана ДНК бе определено с помощта на PMR. Формулата за изчисляване на PMR е следната:

$$[\frac{((\text{GENE-X mean value})_{\text{sample}} / (\text{ALU mean value})_{\text{sample}})}{((\text{GENE-X mean value})_{\text{M.Sssl}} / (\text{ALU mean value})_{\text{M.Sssl}})] * 100$$

Дизайнът на използваните праймери и проби в MethyLight анализа са е осъществен с помощта на софтуера Beacon Designer 7

### **3.3.6. Експресионен анализ на *PCAZ (DD3)*, *PSA (KLK3)*, *GSTP1*, *AMACR* и *GOLPH2 (GOLM1)* в урина на пациенти и контроли чрез TaqMan технологията, PCR в реално време (Real Time PCR)**

TaqMan методът позволява осъществяването на мултиплексни PCR реакции тъй като пробите за отделните реакции могат да бъдат белязани с различни флуоресцентни багрила. Пробите за изследваните гени бяха белязани с FAM, а пробата за ендогенната контрола (референтна контрола) беше белязана с VIC. Това ни позволи провеждането на дуплексни PCR реакции, съдържащи праймерите и пробите за амплификация на един от изследваните гени и ендогенната контрола. За ендогенна контрола бе избран B2M гена, кодиращ β-2 микроглобулин.

В текущото проучване ние използвахме относително количествено определяне на генната експресия с използването на  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  метода.

### **3.3.7. Експресионен анализ на *let-7c*, *miR-30c*, *miR-141* и *miR-375* в плазма на пациенти и контроли**

Относителната генна експресия на изследваните микроРНК-и в плазма бе определена с помощта на  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  метода. За разлика от анализа на биомаркери в урина за анализ на микроРНК-и в плазма използвахме SybrGreen технологията.

### **3.3.8. микроРНК експресионно профилиране чрез микрочипове на туморна и нормална простатна тъкан**

За осъществяването на микрочиповия анализ следвахме протокола “miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb kit”, version 2.4, September 2011 на фирмата производител. Използвахме чиповете: Agilent G4870A, miRBase release 16, 8x60k формат и с AMADID №31181. На всяко от 8-те полета на чипа са включени 1205 човешки miRNAs и 144 човешки вирусни miRNAs. Всяка miRNA е представена поне от 2 различни проби, за да може да дават информация за специфичността.

Използвахме незадължителния за микрочиповия анализ Agilent microRNA Spike-In кит, състоящ се от два microRNA Spike-In разтвора, които служат като технологични контроли на белязането и хибридизацията. Използвахме този кит тъй като той подпомага разграничаването на значимите биологични данни от вариации и грешки при процесирането (обработването).

#### **3.3.9. Директно секвениране (Секвениране по Sanger)**

Директното секвениране бе използвано за потвърждаване на резултатите получени от фрагментния анализ на (CAG)*n* повтора в *AR* и резултатите получени от HRM анализа на промоторното хиперметиране на *GSTP1*.

### **3.4. Статистически методи за анализ**

Статистическите анализи бяха извършени с помощта на няколко статистически програми като: SPSS v.20 (Windows), Plink, Vassar stats (<http://faculty.vassar.edu/>), HaploView, MedCalc. Резултатите от асоциативните проучвания бяха проверени за отклоняване от закона на Харди-Вайнберг чрез интернет програма на Helmholtz-muenchen. (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Биоинформатичния и статистически анализ на получените резултати от микроРНК микрочиповия анализ бе осъществен с помощта на Gene Spring.

#### **3.4.1. Изчисляване на аделните и генотипни честоти. Изчисляване на хетерозиготност. Закон на Харди-Вайнберг**

##### **3.4.2. Неравновесна скаченост**

##### **3.4.3. Статистическа проверка на хипотеза**

###### **3.4.3.1. Нулева хипотеза**

###### **3.4.3.2. Метод $\chi^2$**

###### **3.4.3.3. Тест на Фишер (Fishers's test)**

###### **3.4.3.4. Student's T тест анализ**

##### **3.4.4. Съотношения на шансовете, относителен риск (Odds ratio – OR)**

##### **3.4.5. Тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney) за променливи с множество измервания**

##### **3.4.6. Оценка на процента на фалшиво позитивни резултати (асоциации) при множествени сравнения: тест на Benjamini-Hochberg FDR**

##### **3.4.7. Корелационни анализи**

##### **3.4.8. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностична точност на изследваните биомаркери**

##### **3.4.9. Обработка на резултатите от микроРНК микрочиповия анализ**

След хибридизация микрочиповете бяха процесирани според инструкциите на фирмата производител. Анализът на резултатите бе извършен с помощта на Gene Spring 12.6 GX-PA като бе избран 90th percentile алгоритъма за нормализация и без корекция на baseline.

###### **3.4.9.1. Нормализация на данните**

###### **3.4.9.2. Анализ на основните компоненти – PCA (Principle Component Analysis)**

###### **3.4.9.3. Volcano plot**

###### **3.4.9.4. Интерпретация на получените резултати**

След определянето на диференциално експресираните микроРНК-и в простатни тумори бяха открити и гените, които статистически значимо се повлияват от тях. След това се потърсиха пътищата, в които участват гените регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия и гените регулирани от микроРНК-те с понижена експресия поотделно. Venn диаграмите бяха използвани за

представяне на гените регулирани от микроРНК-ите с повишена и понижена експресия, а така също и за представяне на клетъчните пътища, които са повлиявани едновременно от гените с предполагаема повишена и понижена експресия. Проведохме онтологичен анализ за класифициране на гените регулирани от микроРНК-ите с диференциална експресия според тяхното участие в клетъчни процеси и пътища най-силно засегнати в раковите клетки. За да определим дали микроРНК-ите показали диференциална експресия разграничават добре туморните от нормалните простатни тъкани, осъществихме йерархично клъстериране.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Резултати от асоциативен анализ на полиморфни варианти открити при GWAS

Генотипните и алелните честоти при пациентите и контролите на следните анализирани полиморфни варианти: **rs6465657 (7q21.3)**, **rs620861 (8q24)**, **rs1016343 (8q24)**, **rs7841060 (8q24)**, **rs10993994 (10q11.33)**, **rs902774 (12q13.13)**, **rs266849 (19q13.33)** и **rs2659056 (19q13.33)** не се различават статистически значимо. В Таблица 2 са представени полиморфизмите, които показват тенденция или са статистически значимо асоциирани с риска за развитие на РП при български пациенти. Честотата на генотипът Т/Т на **rs4871008 (8q24)** се среща по-често при контролите в сравнение с пациентите като се свързва с понижаване на риска за развитие на РП (OR-0.52, p=0.03). Генотипът А/А на **rs7920517 (10q11)** също има протективна роля (OR-0.54, p=0.014).

Фино картиране на хромозомен локус 11p15.5 бе проведен за прецизиране на асоциацията получена от предходно проучване на консорциума PRACTICAL, в което участват и български пациенти. Бе анализиран първоначално показалия асоциация полиморфизъм **rs7127900** в разширена извадка и бяха подбрани 7 неизследвани до този момент варианти (**rs11603378** - в интрон на IGF2, **rs2239681** - в интрон на IGF2, **rs10770125** - Leu144Pro замяна в гена INS-IGF2, **rs3842756** - в интрон на гена INS-IGF2, **rs2070762** - в интрон на TH, **rs11564710** - близо до TH гена, **rs55930300** - в ASCL2 гена). Потвърди се генотипната асоциация на **rs7127900** с риска за развитие на РП (Таблица 2). От неизследваните до този момент полиморфизми асоциация с риска за развитие на РП не показаха **rs11603378**, **rs10770125**, **rs3842756** и **rs55930300**. Генотипът G/A на **rs2239681** се среща по-често при контролите в сравнение с пациентите като резултатът е близо до статистическа значимост. Вероятно този генотип се свързва с редукция на риска за развитие на РП. Хомозиготното носителство на G алела на полиморфизма **rs2070762** статистически значимо се свързва с повишаване на риска за развитие на заболяването (OR-1.685, p=0.04). Най-силна асоциация с РП в хромозомен локус 11p15.5 се получи за **rs11564710** (Таблица 2, Фигура 1). Хомозиготното носителство на алел C (OR-0.46, p=0.001) на този полиморфизъм има протективна роля тъй като се среща по-често при контролите в сравнение с пациентите. Генотипът C/A води до над 2 пъти повишаване на риска за развитие на простатни карциноми (OR-2.21, p=3x10<sup>-4</sup>).

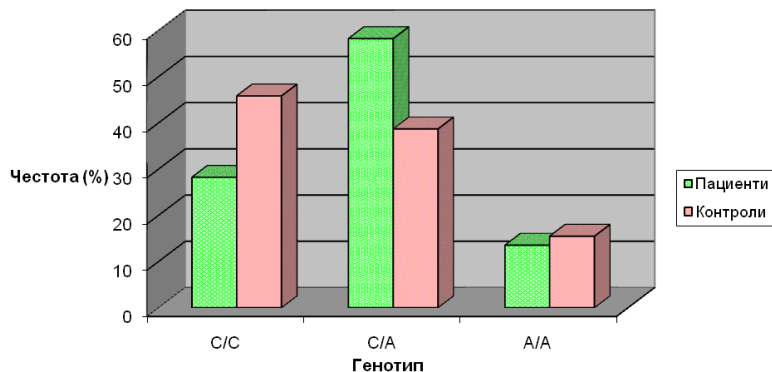
Някои от изследваните полиморфни варианти показаха асоциация с риска за развитие на агресивни простатни тумори. В Таблице 3 и 4 са представени резултатите за полиморфизмите показали асоциация с риска за развитие на висок Gleason score и метастази.

Хаплотипен анализ с полиморфните варианти в хромозомните локуси 8q24, 10q11 и 11p15 бе проведен. **Хаплотипните комбинации** с полиморфизмите в **10q11** не показаха статистически значима асоциация с риска за развитие на РП и с клиникопатологичните характеристики. **Хаплотипните комбинации**, включващи полиморфизми в **8q24** са статистически значимо асоциирани с риска за развитие на тумори с висок Gleason score (Таблица 5). **Хаплотипни комбинации**, включващи изследваните полиморфни варианти в **11p15** показаха статистически значима асоциация с предразположеността за развитие на РП (Таблица 6). Хаплотипът А-С-G (**rs2070762**- **rs11564710**- **rs7127900**) се среща по-често при контроли в сравнение с пациентите и вероятно той има протективна роля (p=0.039). Други хаплотипни комбинации с полиморфизми на 11p15 показаха асоциация с риска за развитие на далечни метастази (Таблица 7).

Таблица 2. Резултати от статистическия анализ за асоциация на полиморфизми с предразположеността за развитие на РП

Хромозомен локус	Полиморфизъм	Генотип/ алел	Пациенти	Контроли	OR, 95% CI	P
8q24	rs4871008	C/C	49 (32.02%)	49 (32.24%)	0.99 (0.61-1.6)	1
		C/T	82 (53.59%)	66 (43.42%)	1.5 (0.96-2.36)	0.09
		T/T	22 (14.38%)	37 (24.34%)	0.52 (0.29-0.94)	<b>0.03</b>
		C	180 (58.82%)	164 (53.95%)	1.22 (0.89-1.69)	0.25
		T	126 (41.18%)	140 (46.05%)	0.82 (0.6-1.13)	0.25
10q11.23	rs7920517	G/G	37 (19.79%)	38 (23.31%)	0.81 (0.48-1.35)	0.43
		G/A	113 (60.43%)	74 (45.4%)	1.84 (1.2-2.8)	<b>0.0053</b>
		A/A	37 (19.79%)	51 (31.3%)	0.54 (0.33-0.88)	<b>0.014</b>
		G	187 (50%)	150 (46.01%)	1.17 (0.87-1.58)	0.32
		A	187(50%)	176 (53.99%)	0.85 (0.63-1.15)	0.32
11p15.5	rs7127900	G/G	116 (62.7%)	116 (71.6%)	0.67 (0.42-1.05)	0.088
		G/A	64 (34.6%)	38 (23.5%)	1.73 (1.08-2.77)	<b>0.034</b>
		A/A	5 (2.7%)	8 (4.9%)	0.53 (0.17-1.67)	0.4
		G	296 (80%)	270 (83.33%)	0.8 (0.54-1.12)	0.28
		A	74 (20%)	55 (16.67%)	1.25 (0.85-1.84)	0.28
	rs2239681	G/G	99 (55.62%)	84 (50%)	1.2 (0.82-1.91)	0.33
		G/A	60 (33.71%)	74 (44.05%)	0.65 (0.41-1)	<b>0.06</b>
		A/A	19 (10.67%)	10 (5.95%)	1.89 (0.85-4.19)	0.12
		G	258 (72.47%)	242 (72.02%)	1.02 (0.73-1.43)	0.93
		A	98 (27.53%)	91 (27.98%)	0.98 (0.7-1.36)	0.93
	rs2070762	G/G	59 (34.1%)	39 (23.49%)	1.685 (1.05-2.71)	<b>0.04</b>
		G/A	72 (41.61%)	87 (52.41%)	0.65 (0.42-0.99)	<b>0.05</b>
		A/A	42 (24.28%)	40 (24.1%)	1 (0.61-1.66)	1
		G	190 (54.91%)	165 (49.7%)	1.23 (0.91-1.67)	0.19
		A	156 (45.09%)	167 (50.3%)	0.8 (0.6-1.1)	0.19
	rs11564710	C/C	48 (28.23%)	77 (45.83%)	0.46 (0.296-0.73)	<b>0.001</b>
		C/A	99 (58.24%)	65 (38.69%)	2.21 (1.43-3.41)	<b>3x10<sup>-4</sup></b>
		A/A	23 (13.53%)	26 (15.48%)	0.85 (0.47-1.57)	0.65
		C	195 (57.35%)	219 (65.18%)	0.72 (0.53-0.98)	<b>0.04</b>
		A	145 (42.65%)	117 (34.82%)	1.39 (1.02-1.9)	<b>0.04</b>

Генотипни честоти на полиморфизма rs11564710 при пациенти и контроли



Фигура 1.

**Таблица 3. Резултати от статистическия анализ за асоциация с риска за развитие на ниско диференцирани простатни тумори (тумори с Gleason score над 7)**

Хромозомен локус	Полиморфизъм	Генотип/ алел	Пациенти	Контроли	OR, 95% CI	P
8q24	rs1016343	C/C	21 (47.73%)	106 (65.03%)	0.49 (0.25-0.96)	<b>0.054</b>
		C/T	19 (43.18%)	49 (30.06%)	1.77 (0.89-3.5)	0.11
		T/T	4 (9.09%)	8 (4.91%)	1.94 (0.53-6.76)	0.47
		C	61 (69.32%)	261 (80.06%)	0.56 (0.33-0.95)	<b>0.04</b>
		T	27 (30.68%)	65 (19.94%)	1.77 (1.05-3)	<b>0.04</b>
	rs4871008	C/C	17 (44.74%)	49 (32.24%)	1.7 (0.82-3.51)	0.18
		C/T	18 (47.37%)	66 (43.42%)	1.17 (0.57-2.39)	0.72
		T/T	3 (7.89%)	37 (24.34%)	0.27 (0.08-0.92)	<b>0.04</b>
		C	52 (68.42%)	164 (53.95%)	1.85 (1.1-3.15)	<b>0.027</b>
		T	24 (31.58%)	140 (46.05%)	0.54 (0.32-0.92)	<b>0.027</b>
	rs7841060	T/T	21 (47.73%)	107 (64.85%)	0.49 (0.25-0.97)	<b>0.05</b>
		T/G	20 (45.45%)	50 (30.30%)	1.92 (0.97-3.78)	0.07
		G/G	3 (6.82%)	8 (4.85%)	1.44 (0.36-5.65)	0.7
		T	62 (70.45%)	264 (80%)	0.596 (0.35-1.01)	0.06
G		26 (29.55%)	71 (20%)	1.68 (0.98-2.85)	0.06	
10q11.33	rs7920517	G/G	8 (18.60%)	38 (23.31%)	0.75 (0.32 -1.76)	0.54
		G/A	28 (65.12%)	74 (45.4%)	2.25 (1.12-4.52)	<b>0.026</b>
		A/A	7 (16.28%)	51 (31.3%)	0.43 (0.18-1.02)	<b>0.06</b>
		G	44 (51.16%)	150 (46.01%)	1.23 (0.76-1.98)	0.40
		A	42 (48.84%)	176 (53.99%)	0.81 (0.51-1.31)	0.40

**Таблица 4. Резултати от статистическия анализ за асоциация с риска за развитие на метастази**

Хромозомен локус	Полиморфизъм	Генотип/ алел	Пациенти	Контроли	OR, 95% CI	P
8q24	rs1016343	C/C	13 (44.83%)	106 (65.03%)	0.44 (0.196-0.97)	<b>0.06</b>
		C/T	15 (51.72%)	49 (30.06%)	2.49 (1.11-5.56)	<b>0.03</b>
		T/T	1 (3.45%)	8 (4.91%)	0.69 (0.08-5.75)	1
		C	41 (70.69%)	261 (80.06%)	0.6 (0.32-1.12)	0.12
		T	17 (29.31%)	65 (19.94%)	1.66 (0.89-3.12)	0.12
	rs7841060	T/T	11 (39.29%)	107 (64.85%)	0.35 (0.15-0.8)	<b>0.01</b>
		T/G	16 (57.14%)	50 (30.30%)	3.07 (1.35-6.95)	<b>0.009</b>
		G/G	1 (3.57%)	8 (4.85%)	0.73 (0.087-6.04)	1
		T	38 (67.86%)	264 (80%)	0.53 (0.28-0.98)	<b>0.05</b>
		G	18 (32.14%)	71 (20%)	1.89 (1.02-3.53)	<b>0.05</b>
10q11.33	rs7920517	G/G	7 (24.14%)	38 (23.31%)	0.96 (0.38 -2.41)	1
		G/A	19 (65.52%)	74 (45.4%)	2.29 (1-5.22)	0.07
		A/A	3 (10.31%)	51 (31.3%)	0.25 (0.07-0.87)	<b>0.024</b>
		G	33 (56.90%)	150 (46.01%)	1.55 (0.88-2.72)	0.15
		A	25 (43.10%)	176 (53.99%)	0.65 (0.37-1.13)	0.15

**Таблица 5. Статистически анализ на хаплотипите на маркерите в 8q24:** 1) rs1016343, 2) rs4871008, 3) rs7841060, 4) rs620861, 5) rs10505477, 6) rs6983267 и 7) rs1447295 за асоциация с висок Gleason score

Хаплотип							Честота	Пациенти, Контроли съотношения	$\chi^2$	p
1	2	3	4	5	6	7				
T	C	G	A	A	G	C	0.029	0.061, 0.021	3.847	<b>0.0498</b>
C	T	T					0.425	0.318, 0.453	5.072	<b>0.0243</b>
T	C	G					0.218	0.302, 0.196	4.479	<b>0.0343</b>
	T	T					0.426	0.325, 0.453	4.603	<b>0.0319</b>
	C	G					0.218	0.302, 0.196	4.479	<b>0.0343</b>
	C			A			0.271	0.372, 0.244	5.522	<b>0.0188</b>

**Таблица 6. Статистически анализ на хаплотипите на полиморфизмите в 11p15:** 1) rs11603378; 2) rs2239681; 3) rs10770125; 4) rs3842756; 5) rs2070762; 6) rs11564710; 7) rs7127900; 8) rs55930300 за асоциация с риска за развитие на РП

Хаплотип								Честота	Пациенти, Контроли съотношения	$\chi^2$	p
1	2	3	4	5	6	7	8				
				A	C	G		0.308	0.272, 0.345	4.255	<b>0.0391</b>
					C	G		0.591	0.551, 0.632	4.731	<b>0.029</b>
			T	A	C			0.067	0.049, 0.085	3.514	0.0609
			T	A	C	G		0.062	0.045, 0.079	3.483	0.062
G	G	A	T	A	C	G	G	0.044	0.038, 0.050	0.588	0.4433

**Таблица 7. Статистически анализ на хаплотипите на полиморфизмите в 11p15:** 1) rs11603378; 2) rs2239681; 3) rs10770125; 4) rs3842756; 5) rs2070762; 6) rs11564710; 7) rs7127900; 8) rs55930300 за асоциация с риска за развитие на метастази при РП

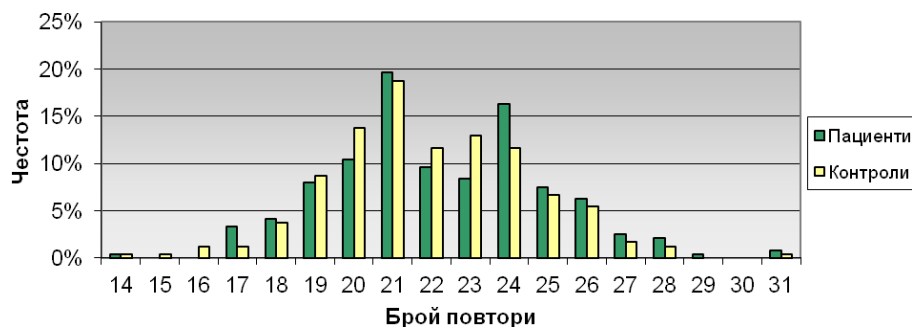
Хаплотип								Честота	Пациенти, Контроли съотношения	$\chi^2$	p
1	2	3	4	5	6	7	8				
G	G	G	C					0.011	0.036, 0.006	4.163	<b>0.0413</b>
G		G	C					0.010	0.038, 0.006	4.905	<b>0.0268</b>
G		G						0.011	0.039, 0.006	4.822	<b>0.0281</b>
G	G	G	C	G	C	G	G	0.011	0.036, 0.007	3.838	0.0501

#### **4.2. Резултати от асоциативен анализ на полиморфни варианти разположени в гените CYP1B1, AR и AMACR**

В *CYP1B1* бе изследван полиморфизма **rs2567206**, намиращ се в промоторната област. При анализа на получените резултати от генотипирането на този полиморфен вариант не се откриха статистически значими разлики в генотипните и алелните честоти при пациентите и контролите. Полиморфизмът не показва корелация с риска за развитие на агресивно заболяване.

**Микросателитът (CAG)<sub>n</sub>** в екзон 1 на *AR* с открити 17 алела при пациентите и контролите също не показва асоциация с РП. Дължината на повторите варира между 14-29 и 31 като се наблюдава пик при алел 21 и още един при алел 24 (Фигура 2). Не открихме алел 30 сред пациентите и контролите. Разлика в честотата на късите алели (14-19 CAG повтори) между

пациентите и контролите не бе открита. Не бе намерена и корелация на изследвания микросателит с агресивен РП.



**Фигура 2. (CAG)n полиморфизъм в AR при пациенти и контроли.**

При сравнението на генотипните и алелните честоти на полиморфизма **rs3195676**, намиращ се в **AMACR** на всички пациенти спрямо контролите не се получиха статистически значими резултати. Полиморфизмът беше проверен дали е асоцииран с риска за развитие на простатни тумори с висок Gleason score, с развитие на метастази, а така също и с двата фактора едновременно (Gleason score над 7 и наличие на метастази). Алелът Т се среща по-често при пациентите с висок Gleason score или с метастази, а така също при пациентите с висок Gleason score и метастази едновременно, но резултатите не достигат статистическа значимост. Най-високо OR за алел Т се наблюдава при пациентите с висок Gleason score и метастази. Носителите на този алел имат 2 пъти повишен риск за развитие на агресивен РП с метастази. Алелът С и в трите групи пациенти вероятно е протективен. Генотипът С/С се среща само в 5% от пациентите с Gleason score над 7 и с метастази и в 22.7% от контролите (Таблица 8). Този резултат също е близко до статистическа значимост ( $p=0.08$ ) и има много нисък относителен риск ( $OR=0.18$ ).

**Таблица 8. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs3195676 с развитие на РП с висок Gleason score и метастази**

Генотип/ алел	Пациенти (n=20)	Контроли (n=163)	OR (95% CI)	P Fisher, two- tailed
<b>C/C</b>	1 (5%)	37 (22.7%)	0.18 (0.02-1.38)	0.08
<b>C/T</b>	12 (60%)	88 (53.99%)	1.28 (0.5-3.29)	0.64
<b>T/T</b>	7 (35%)	38 (23.31%)	1.77 (0.66-4.76)	0.27
<b>C</b>	14 (35%)	162 (49.7%)	0.55 (0.27-1.08)	0.09
<b>T</b>	26 (65%)	164 (50.3%)	1.83 (0.92-3.64)	0.09

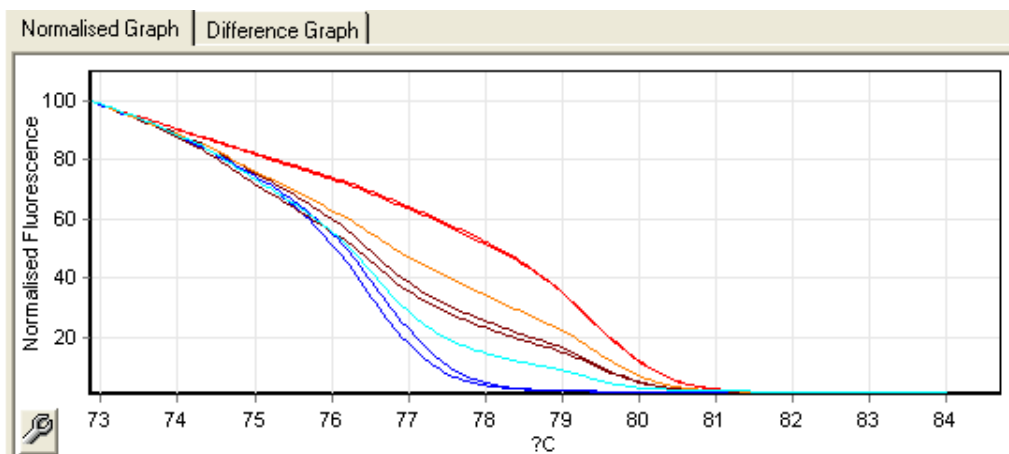
#### **4.3. Резултати от анализа на промоторно хиперметиране на гените GSTP1, HIST1H4K и RASSF2**

Определянето на диагностичната точност на изследваните биомаркери бе осъществено с помощта на анализа на ROC кривите. Диагностичната точност на всеки от биомаркерите бе сравнявана с тази получена за серумните стойности на PSA в съответната анализирана група от

пациенти и контроли с ДПХ. За статистически значими резултати от всички проведени анализи се считаха стойности на two tailed p под 0.05.

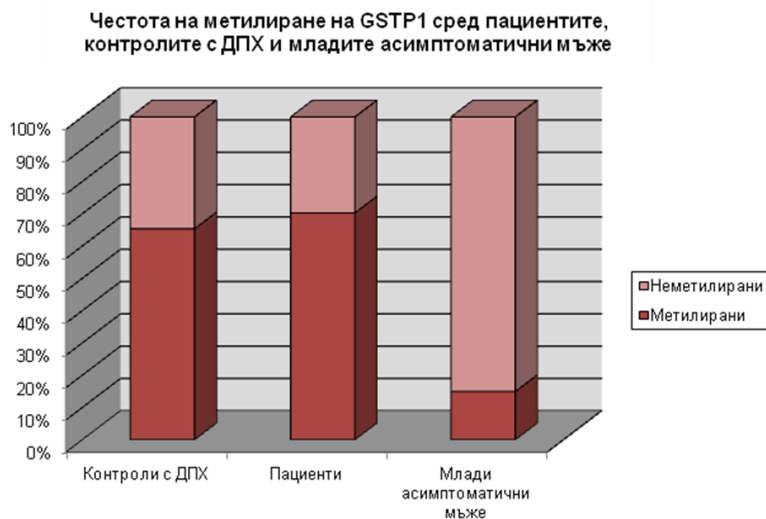
#### 4.3.1. Резултати от анализа на промоторното хиперметиране на *GSTP1* в урина на пациенти с рак на простатата и контроли с помощта на MS-HRMA

В резултат на оптимизирането на условията за протичане на PCR и на анализа чрез топене с висока резолюция бе възможно разграничаването на различния процент метилиране на CpG динуклеотидите в промоторната област на *GSTP1* в изследваните проби (Фигура 3).



**Фигура 3.** Нормализирана графика на топенето с висока резолюция. В червено- 100% метилирани проби; в оранжево- 75% метилирани проби; в кафяво- 50% метилиране; синьо-зелено- 25% метилиране и синьо- 0% метилиране

Резултатите от анализа на промоторното хиперметиране на *GSTP1* в урина са представени в Таблица 9, Фигура 4.



**Фигура 4.**

**Таблица 9. Резултати от анализа на промоторното хиперметиране на *GSTP1*.**

Пациенти/Контроли (брой)	Метилирани (брой, %)	Неметилирани (брой, %)
<b>МММ (n=20)</b>	3 (15%)	17 (85%)
<b>Контроли с ДПХ (n=26)</b>	17 (65.38%)	9 (34.62%)
Серумни PSA нива под 10	9 от 17 (52.94%)	7 от 9 (77.77%)
Серумни PSA нива над 10	6 от 17 (35.29%)	1 от 9 (11.11%)
Неизвестни PSA нива	1 от 17 (5.88%)	2 от 9 (22.22%)
<b>Пациенти с РП (n=64)</b>	45 (70.31%)	19 (29.69%)
T1	6 от 45 (13.33%)	3 от 19 (15.79%)
T2	24 от 45 (53.33%)	8 от 19 (42.1%)
T3	13 от 45 (28.89%)	5 от 19 (26.32%)
T3	0 от 45 (0%)	1 от 19 (5.26%)
Неизвестни	2 от 45 (4.44%)	2 от 19 (10.53%)
Gleason score 4-7	31 от 45 (68.89%)	12 от 19 (63.16%)
Gleason score 8-10	14 от 45 (31.11%)	7 от 19 (36.84%)
Серумни PSA нива под 10	17 от 45 (37.78%)	3 от 19 (15.79%)
Серумни PSA нива над 10	26 от 45 (57.78%)	14 от 19 (73.68%)
Неизвестни PSA нива	2 от 45 (4.44%)	2 от 19 (10.53%)

За определяне на надежността, чувствителността и специфичността на промоторното хиперметиране на *GSTP1* в урина (изследвано чрез MS-HRMA) като неинвазивен диагностичен маркер ние проведохме анализ на ROC кривите. Контролите с ДПХ показват висок процент метилиране (65.38%) и по тази причина специфичността на теста за наличие на промоторно хиперметиране определено в урина чрез HRM анализ е ниска- 0.35 (35%). Тъй като откриваме висок процент метилиране и сред пациентите (70.31%) чувствителността на метода е сравнително висока- 0.7 (70%).

Когато в анализа на ROC кривите включихме пациентите и контролите с ДПХ, не получихме статистически значими резултати и площта на кривата (AUC) бе 0.525. Серумните нива на PSA в изследваната група от пациенти и контроли с по-голяма точност разграничават двете групи в сравнение с ДНК метилирането на *GSTP1* в урина, с AUC 0.745 ( $p=0.001$ ) и чувствителност 73.3%, и специфичност 60.9% при гранична стойност от 9 ng/ml.

Статистически значима разлика в метилирането има между пациентите и младите асимптоматични мъже и по тази причина, когато включихме в анализа на ROC кривите тези две групи, то получихме голяма площ за AUC: 0.777 и резултатът бе статистически значим ( $p<0.05$ ) със специфичност 85% (95% CI: 62.08 % - 96.62 %) и чувствителност 70.31% (95% CI: 57.58 % - 81.08 %).

За да проверим дали и в нашата изследвана група от пациенти и контроли ДНК метилирането на *GSTP1* е зависимо от възрастта, ние проведохме корелационен анализ. За коефициента  $r$  на Pearson получихме стойността 0.225 и резултатът бе статистически значим ( $p=0.018$ , two tailed), което показва че в нашето проучване ДНК метилирането на *GSTP1* корелира с възрастта.

### 4.3.2. Получени резултати за промоторното хиперметиране на *HIST1H4K*

Промоторното хиперметиране на *HIST1H4K* бе анализирано с помощта на MethyLight анализа. Резултати са представени в Таблица 10.

Нивото на промоторното хиперметиране на *HIST1H4K* не показва различия между пациентите с РП и контролите с ДПХ ( $p=1$ , two tailed, Fisher exact test). Метилиране бе наблюдавано в 52.63% от пациентите и 55.17% от контролите с ДПХ. Не отримаме метилиране в урината на младите асимптоматични мъже и при сравнение с пациентите с РП се получи статистически значими резултати ( $p=5.63 \times 10^{-11}$  two tailed, Fisher exact test). Дванадесет от пациентите с висок Gleason score показаха метилиране, а при 7 от тях не се открива такова. При пациентите с нисък Gleason score разпределението е почти по равно (17 метилирани и 19 неметилирани). Наблюдава се по-висок процент метилиране при пациентите с висок Gleason score в сравнение с тези с нисък, но разликите не са статистически значими ( $p=0.2$ , OR=1.92 (95% CI-0.61-5.98)). Промоторното хиперметиране не показва корелация с туморния стадий, нивата на PSA и Gleason score. Не бе възможно осъществяването на корелационен анализ за асоциация на метилирането с наличие на метастази тъй като само един пациент с метастази бе включен в изследването.

При сравнението на статуса на метилиране на *HIST1H4K* при пациенти с РП и МАМ се получи статистически значими резултати ( $p=6.41 \times 10^{-9}$ ).

Тъй като нивата на свободния тотален PSA широко се използват за предсказване на диагнозата при биопсия, ние проверихме надеждността на този маркер в изследваните пациенти и контроли. Установихме, че PSA (с граница 4 ng/ml) има чувствителност от 98.04% и ниска специфичност 14.29% за РП (AUC=0.785, 95%CI: 0.679-0.870,  $p<0.0001$ ) при нашите пациенти. Статистическият анализ показва, че критерият свързан с най-високия индекс на Youden (максималната потенциална ефективност на биомаркер) е PSA стойността от 11.38 (чувствителност от 74.51% и специфичност от 78.57%).

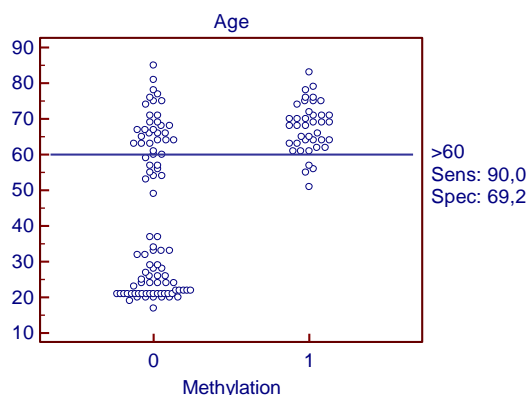
Проведохме анализ на ROC кривите, за да оценим чувствителността и специфичността на ДНК метилирането на *HIST1H4K* като биомаркер в урина като сравнихме пациентите с РП и контролите с ДПХ и МАМ.

**Таблица 10. Резултати от анализа на промоторното хиперметиране на *HIST1H4K*.**

Пациенти/Контроли (брой)	Метилирани (брой, %)	Неметилирани (брой, %)
<b>МАМ (n=43)</b>	0 (0%)	43 (100%)
<b>Контроли с ДПХ (n=29)</b>	16 (55.17%)	13 (44.83%)
Серумни PSA нива под 10	8 от 15 (53.33%)	9 от 13 (69.23%)
Серумни PSA нива над 10	7 от 15 (46.67%)	4 от 13 (30.77%)
<b>Пациенти с РП (n=57)</b>	30 (52.63%)	27 (47.37%)
T1	12 от 29 (41.38%)	7 от 26 (26.92%)
T2	12 от 29 (41.38%)	11 от 26 (42.31%)
T3	5 от 29 (17.24%)	8 от 26 (30.77%)
Gleason score 5-7	17 от 29 (58.62%)	19 от 26 (73.08%)
Gleason score 8-10	12 от 29 (41.38%)	7 от 26 (26.92%)
Серумни PSA нива под 10	5 от 26 (19.23%)	5 от 25 (20%)
Серумни PSA нива над 10	21 от 26 (80.77%)	20 от 25 (80%)

Анализът на статуса на метилиране в ДНК от урина успешно диагностицира 30 от 57 изследвани пациенти с РП и чувствителността е 0.526 (52.6%). От 29 контроли с ДПХ, без наличие на РП, 13 показват метилиране на *HIST1H4K* промотора (специфичност 0.45). AUC е 0.513 (95% CI, 0.402-0.622), но резултатите не са статистически значими ( $p=0.8255$ ). Когато обаче в анализа на ROC кривите се сравни метилирането при пациентите с РП и МАМ, се получават статистически значими резултати (AUC=0.763, 95% CI: 0.672-0.839,  $p<0.0001$ ). Достигат се 100% специфичност и 52.63% чувствителност.

За да проверим дали промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* е зависимо от възрастта, осъществихме корелационен анализ, в който включихме всички изследвани групи- пациенти с РП, контроли с ДПХ, МАМ (Фигура 5). Корелационният коефициент  $r$  на Pearson имаше стойност от 0.542 (95% CI, 0.408-0.653), което показва положителна статистическа значимост между възрастта и метилирането ( $p<0.0001$ ).



**Фигура 5. Интерактивна точкова диаграма, показваща корелацията между метилирането и възрастта, и чувствителността и специфичността, когато граничната възраст е 60 години. С 0 са означени неметилираните проби, а с 1- метилираните.**

#### 4.3.3. Получени резултати от анализа на промоторното хиперметилиране на *RASSF2*

В нашето изследване не се наблюдава промоторно хиперметилиране на *RASSF2* нито в пациентите с простатен аденокарцином, нито в двете групи контроли (контролите с ДПХ и МАМ). Наблюдавахме амплификация само в ALU-C4 контролните реакции, а така също и амплификация на гена в положителната (100% метилирана) контрола.

#### 4.4. Резултати от експресионния анализ на *GSTP1*, *PSA*, *PCA3*, *AMACR* и *GOLPH2 (GOLM1)* в урина

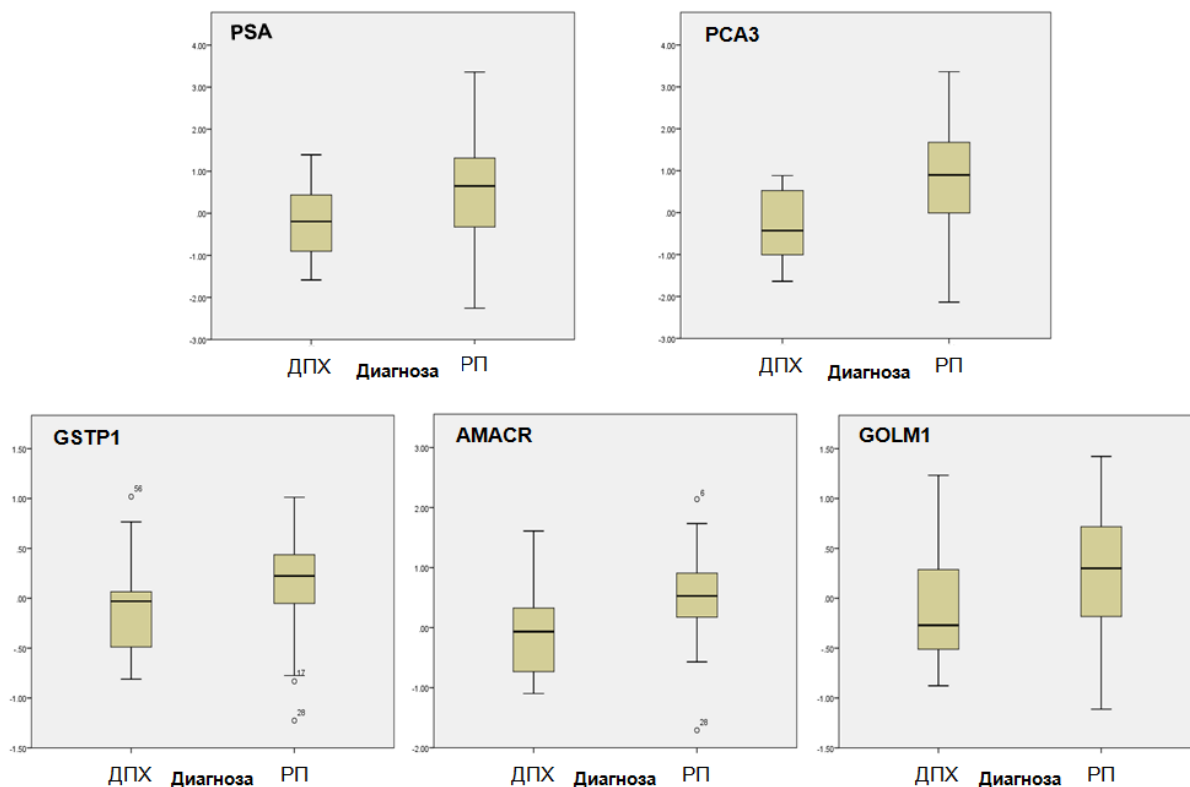
Диагностичната точност на всеки от изследваните експресионни биомаркери в урина сходно на промоторно хиперметилираните бе сравнявана с тази получена за серумните стойности на PSA в съответните анализирани групи от пациенти и контроли с ДПХ. За статистически значими резултати от всички проведени анализи се считаха стойности на two tailed  $p$  под 0.05. Нивата на експресия при пациентите са определени с помощта на  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  метода. За калибратори са използвани контролите с ДПХ, а ендогенна контрола бе *B2M*.

В Таблица 11 са представени резултатите за изследваните експресионни биомаркери в урина. На Фигура 6 са представени box plot графики, показващи нивата на експресия на биомаркерите при пациентите и контролите.

Таблица 11. Обобщение на резултатите получени от анализ на биомаркери в урина

Резултати: пациенти с РП спрямо контроли с ДПХ	PSA	PCA3	GSTP1	AMACR	GOLPH2
	Брой пациенти (%)				
Без значима разлика в експресията	7(12.96)	9 (16.67)	27 (50)	16 (29.63)	20 (37.04)
Понижена експресия	14 (25.93)	10 (18.52)	6 (11.11)	5 (9.23)	7 (12.96)
Повишена експресия	33 (61.11)	35 (64.81)	21 (38.89)	33 (61.11)	27 (50)
Резултати от анализа на ROC кривите					
AUC (95% CI)	0.694 (0.533-0.854)	0.778 (0.654-0.901)	0.670 (0.486-0.853)	0.728 (0.553-0.903)	0.678 (0.495-0.861)
P	0.044	0.003	0.059	0.011	0.047
Чувствителност (%)	61.11	85.2	11.11	61.11	50
Специфичност (%)	72.7	58.3	84.6	69.23	76.92

В анализа на ROC кривите серумните стойности на PSA разграничават пациентите от контролите с чувствителност 76.9% и специфичността е 60% (AUC=0.767, 95% CI: 0.597-0.938,  $p=0.008$ ) при гранична стойност от 8.9 ng/ml (подбрана според метода на Youden). Само една контрола има серумни PSA стойности под 4 ng/ml и ако тази стойност се вземе за гранична, то чувствителността е 100%, но специфичността е едва 10%. По-голяма площ под кривата при анализа на ROC кривите се получи при използването на експресионните нива на PCA3 в урина. Този биомаркер по-надеждно разграничава пациентите от контролите в сравнение със серумните нива на PSA. Нивата на AMACR в урина като биомаркер не превъзхождат тези на PSA в серум и PCA3 в урина, но разликата не е значителна. Най-малка площ под кривата и съответно не добро разграничение на пациентите от контролите се получи за GSTP1.



Фигура 6. Box plot графики, показващи нивата на експресия на PSA, PCA3, GSTP1, AMACR, GOLM1 в урина на пациенти с РП и контроли с ДПХ.

Изследваните експресионни биомаркери в урина не показаха корелация с клиничкопатологичните характеристики.

Проведохме мултимаркерен анализ на ROC кривите като включвахме различни комбинации от изследваните биомаркери, за да проверим дали диагностичната стойност би се подобрила в сравнение с тази на *PCA3*. При този анализ не включихме *GSTP1* тъй като той показва най-ниска диагностична точност и бе наблюдаван най-висок процент пациенти без промяна в експресията спрямо контролите.

Получените резултати са представени в Таблица 12.

**Таблица 12. Резултати за AUC, специфичност и чувствителност при комбинирането на биомаркери.**

Комбинация от биомаркери	AUC, (95% CI)	P	Чувствителност (%)	Специфичност (%)	Гранична стойност
<i>AMACR</i> и <i>GOLM1</i>	0.738 (0.565-0.911)	0.008	77.8	61.5	1.5
<i>PSA</i> и <i>PCA3</i>	0.764 (0.636-0.892)	0.006	74.1	54.5	1.33
<i>PCA3</i> и <i>AMACR</i>	0.832 (0.700-0.954)	$3.5 \times 10^{-4}$	77.8	75	2.47
<i>PCA3</i> и серумен <i>PSA</i>	0.831 (0.688-0.974)	0.002	71.2	77.8	13.08
<i>PSA</i> и <i>AMACR</i>	0.776 (0.624-0.928)	0.004	72.2	72.7	2.4
<i>PCA3</i> и <i>GOLM1</i>	0.821 (0.701-0.941)	0.001	70.4	83.3	3.46
<i>PSA</i> и <i>GOLM1</i>	0.731 (0.559-0.902)	0.017	90.7	54.5	0.68
<i>PSA</i> , <i>PCA3</i> и <i>AMACR</i>	0.823 (0.696-0.950)	0.001	75.9	91	2
<i>PSA</i> , <i>PCA3</i> и <i>GOLM1</i>	0.813 (0.686-0.940)	0.065	77.8	72.7	2.51
<i>PSA</i> , <i>AMACR</i> и <i>GOLM1</i>	0.781 (0.627-0.935)	0.078	75.9	72.7	1.65
<i>PCA3</i> , <i>AMACR</i> и <i>GOLM1</i>	0.836 (0.716-0.957)	0.061	75.9	83.3	3.03
<i>PSA</i> , <i>PCA3</i> , <i>AMACR</i> и <i>GOLM1</i>	0.795 (0.657-0.933)	0.002	70.4	81.8	5.46

При комбинирането на всички изследвани биомаркери (без *GSTP1*) получихме AUC=0.795 (95% CI: 0.657-0.933), чувствителност 70.4% и специфичност 81.8%. В сравнение с *PCA3* маркера самостоятелно, комбинирането на всички биомаркери доведе до получаването на малко по-висока стойност за AUC и по-добра специфичност, но по-ниска чувствителност. Най-добрите комбинации от два маркера са между *AMACR* и *PCA3*; *PCA3* и серумен *PSA* и между *PCA3* и *GOLM1* с AUC съответно 0.832, 0.831 и 0.821 и сходни чувствителност и специфичност. Тези комбинации подобряват надеждността при разграничаването на пациентите и контролите в сравнение с използването на *PCA3* маркера сам по себе си. Най-добрата комбинация от три биомаркера, даваща

най-високи стойности за AUC, специфичност и чувствителност, е между *PSA*, *PCA3* и *AMACR* и това води до подобряване на най-значимите резултати получени от комбинирането на два маркера (*AMACR* и *PCA3*, *PCA3* и серумен *PSA*, *PCA3* и *GOLM1*). При комбинирането на *PCA3*, *AMACR* и *GOLM1* в анализа на ROC кривите също се получи висока стойност за AUC- 0.836, но резултатът не достигна статистическа значимост ( $p=0.061$ ).

#### **4.5. Резултати от експресионния анализ на let-7c, miR-30c, miR-141 и miR-375 в плазма**

За определянето на относителните експресионни нива на изследваните микроРНК-и в плазмените проби на пациентите с РП бяха използвани: *RNU6B* като референтен ген за нормализация и ДПХ контроли или МАМ като калибраторни проби. Диагностичната точност на микроРНК-ите бе сравнена с тази на *PSA* получена при включването на изследваните пациенти и контроли.

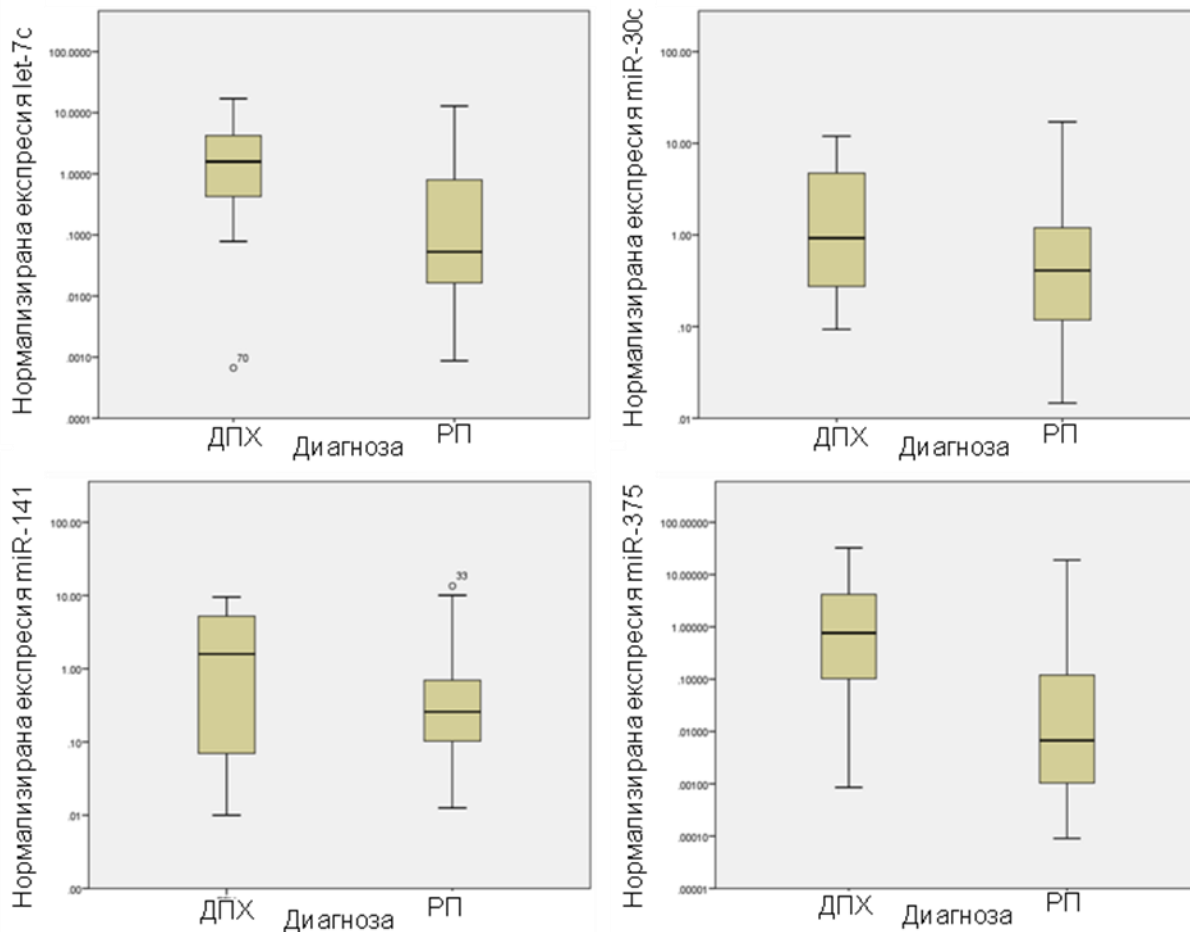
Всички изследвани микроРНК-и особено *miR-141* и *miR-375* показаха понижена експресия в голям процент от пациентите в сравнение с ДПХ контролите. Понижена експресия на *miR-141* и *miR-375* бе открита в 71.43% и 83.05% от пациентите съответно в сравнение с ДПХ групата (Таблица 13). Когато използвахме МАМ като калибратори, то експресионните нива на голяма част от пациентите не достигнаха статистически значими разлики вероятно поради малката група от млади мъже.

**Таблица 13. Резултати от микроРНК експресионния анализ в плазма на пациенти с РП и контроли с ДПХ, служещи за калибратори**

Резултати: пациенти с РП спрямо контроли с ДПХ	let-7c	miR-30c	miR-141	miR-375
	Брой пациенти с РП (%)			
<b>Без значима разлика в експресията</b>	10 (16.95)	13 (22.03)	11 (19.64)	1 (1.7)
<b>Понижена експресия</b>	40 (67.8)	35 (59.32)	40 (71.43)	49 (83.05)
<b>Повишена експресия</b>	9 (15.25)	11 (18.64)	5 (8.93)	9 (15.25)

Построихме ROC криви, за да установим потенциалната стойност на експресионните нива на анализирания микроРНК-и като диагностични биомаркери при РП (Фигура 8). *miR-375* позволява най-точната дискриминация ( $AUC=0.809$ , 95% CI: 0.697-0.922,  $p=0.00016$ ) на пациентите с рак от ДПХ контролите, когато последните са използвани като калибратори. При оптималната подбрана гранична стойност на  $RQ=2$  чувствителността бе 81.3%, а специфичността 72.9%. *miR-375* надминава серумените стойности на *PSA* ( $AUC=0.710$ , 95% CI: 0.559-0.861,  $p=0.013$  с 76.8% чувствителност и 53.3% специфичност при гранична стойност 9.15 ng/ml) като диагностичен биомаркер в изследваната група. Избрахме 9.15 ng/ml като гранична стойност (сходно на другите ни изследвания) за *PSA* тъй като в изследваната извадка от пациенти и ДПХ контроли само един човек има *PSA* стойност под 4 ng/ml и средните нива са високи дори и при ДПХ групата. При гранична стойност от 4 ng/ml чувствителността е 100%, но специфичността е едва 6.2%.

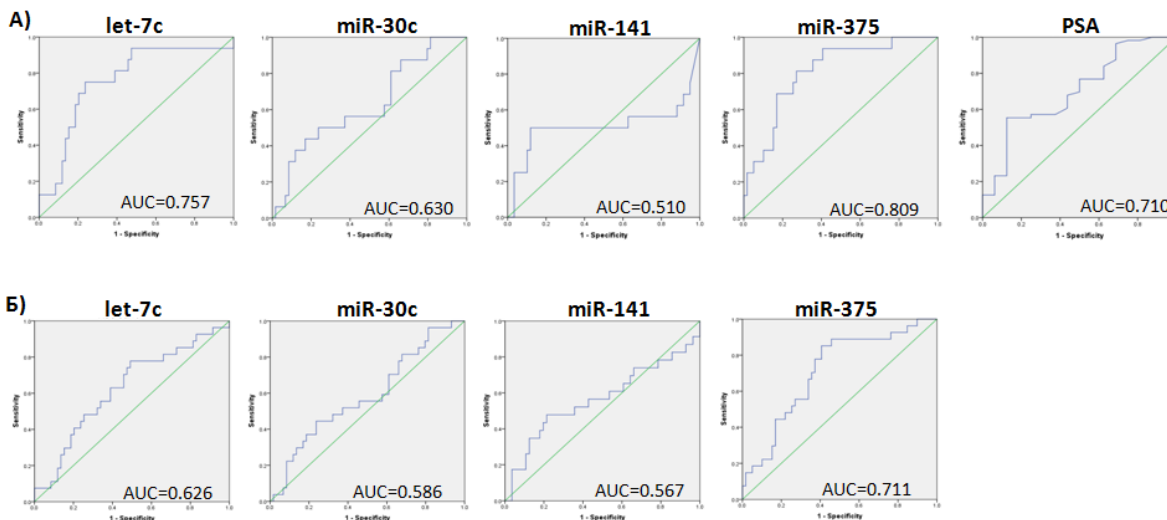
Експресионните нива на *let-7c* също могат да разграничат пациентите от контролите с ДПХ. Получихме следните резултати:  $AUC: 0.757$  (95% CI: 0.622-0.893,  $p=0.069$ ) и с 75% чувствителност и 61% специфичност, но не се достига статистическа значимост. Получихме следните площи под кривите при анализа на ROC кривите за *miR-30c* и *miR-141*: 0.630 (95% CI: 0.475-0.786,  $p=0.079$ ) и 0.510 (95% CI: 0.296-0.723,  $p=0.91$ ), съответно (Фигура 8). При оптималните гранични стойности чувствителността и специфичността на биомаркерите бяха: 62.5% и 42.4% за *miR-30c* и 50% и 71.2% за *miR-141*.



**Фигура 7. Box plot графики, показващи плазмените микроРНК експресионни нива при пациенти с РП и ДПХ контролите. Експресионните нива на микроРНК-ите (скала на у оста: log 10) са нормализирани към *RNU6B*. ДПХ контролите са използвани като калибратори**

Построените ROC криви за определяне на диагностичната точност на тези микроРНК-и в разграничаването на пациентите с РП от ДПХ контролите и МАМ, когато последната група служи за калибратор, показаха по-малки площи: let-7c, 0.626 (95% CI: 0.498-0.755,  $p=0.626$ ); miR-30c, 0.586 (95% CI: 0.455-0.717,  $p=0.204$ ); miR-141, 0.567 (95% CI: 0.412-0.722,  $p=0.353$ ); miR-375, 0.711 (95% CI: 0.595-0.826,  $p=0.02$ ) (Фигура 8). При оптималните гранични стойности чувствителността и специфичността бяха: let-7c, 63% и 61%; miR-30c, 55.6% и 54.2%; miR-141, 56.5% и 57.1%; miR-375, 77.8% и 62.7%.

miR-375 експресията в плазма в нашето изследване показа, че е надежден неинвазивен биомаркер за разграничаване на пациентите с РП от двете групи контроли.

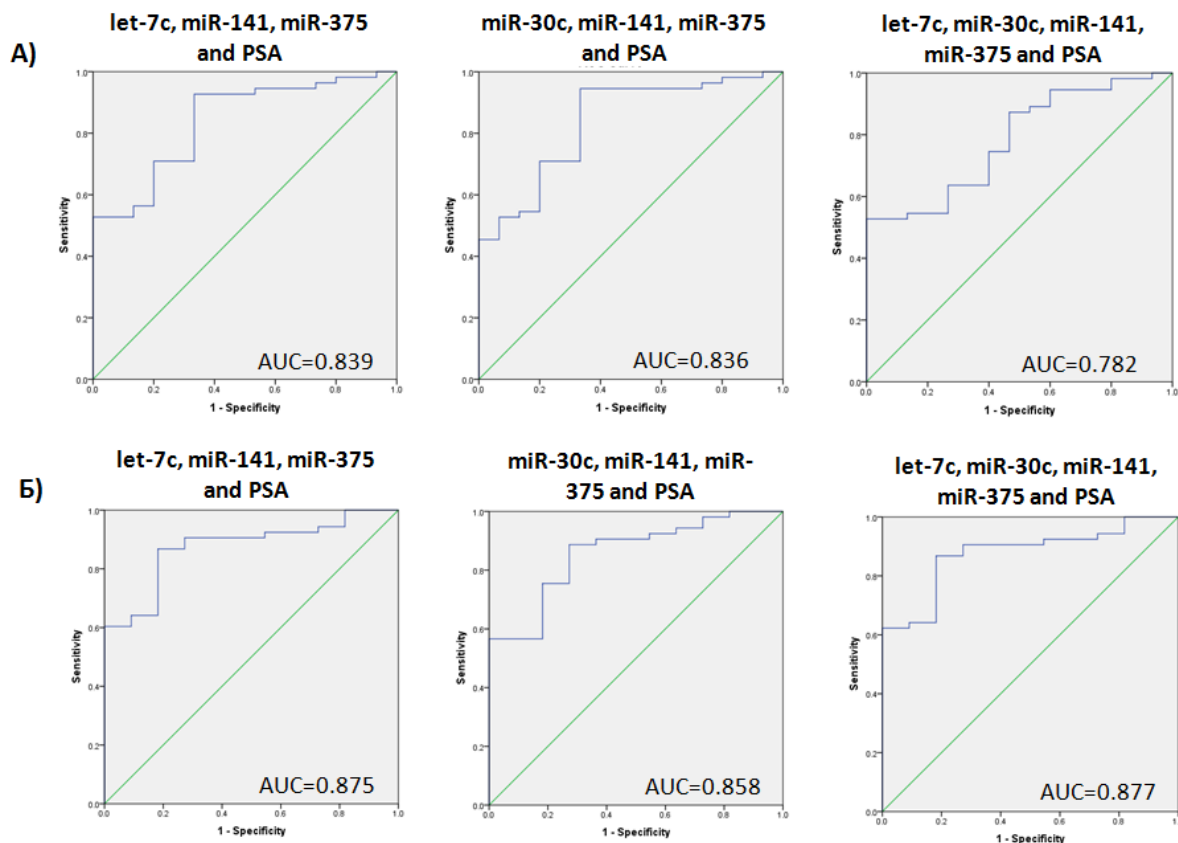


**Фигура 8. Анализ на ROC кривите при използването на изследваните микроРНК и серумните стойност на PSA за разграничаване на пациентите с РП от контролите без рак: А) когато ДПХ контролите (n=16) са използвани като калибратор; Б) когато МАМ (n=11) са използвани като калибратор**

Някои комбинации от изследваните микроРНК-и и PSA подобриха диагностичната точност в мултимаркерния анализ на ROC кривите (Фигура 9). При използване на ДПХ контролите като калибраторни проби, то най-добрата комбинация от биомаркери с най-висока чувствителност бе между miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA, но специфичността бе по-ниска от тази на miR-375 (Таблица 14, Фигура 9). Най-голямата площ под кривата (AUC) наблюдавахме при комбинирането на let -7c, miR-141, miR-375 и PSA. За съжаление комбинацията от всички пет биомаркера не надмина диагностичната точност на miR-375.

Сходни резултати получихме и когато в мултимаркерния анализ на ROC кривите използвахме МАМ като калибратори (Таблица 15). При този анализ комбинацията от 5 биомаркера значително надмина miR-375 и най-голямата площ под кривата бе наблюдавана: 0.877(Фигура 9).

В допълнение ние проверихме дали изследваните микроРНК-и корелират с клиникопатологичните характеристики като Gleason score, туморен стадий, развитие на лимфни метастази и след това сравнихме резултатите с тези получени за PSA. Не успяхме да проверим дали експресионните нива на изследваните микроРНК-и корелират с развитието на далечни метастази, тъй като са включени само двама пациента с метастази. Само PSA показва статистически значима корелация с Gleason score, туморния стадий и развитието на лимфни метастази със следните корелационните коефициенти на Spearman: 0.612 ( $p=5.31 \times 10^{-7}$ ); 0.576 ( $p=4.21 \times 10^{-6}$ ) и 0.458 ( $p=4.34 \times 10^{-4}$ ). Наблюдаваните корелации бяха потвърдени и с Mann-Whitney U теста. Осъществихме анализ на ROC кривите с цел да определим дали серумните нива на PSA могат да предсказват наличието на лимфни метастази при поставянето на диагноза. Следните резултати бяха получени: AUC- 0.960 (95% CI: 0.908-1.00,  $p=0.001$ ) и при гранична стойност от 27.1 ng/ml чувствителността бе 100%, а специфичността- 90%.



**Фигура 9.** Мултмаркерен анализ на ROC кривите: **А)** когато ДПХ контролите са използвани за калибратор; **Б)** когато МАМ са използвани за калибратор

За да определим дали експресионните нива на изследваните микроРНК-и корелират с възрастта, то проведохме Spearman тест, тъй като той беше подходящ за не нормално разпределение на данните. Не наблюдавахме статистически значима корелация между възрастта и експресионните нива на микроРНК-ите в плазма в трите групи (пациентите с РП, ДПХ и МАМ контролите) или като цяло.

Експресионните нива на let-7c показва статистически значима корелация с експресионните нива на miR-30c, miR-141 и miR-375 със следните корелационни коефициенти на Pearson: 0.650 ( $p=2.84 \times 10^{-10}$ ), 0.447 ( $p=5.7 \times 10^{-5}$ ) и 0.266 ( $p=0.021$ ). Сходна корелация бе наблюдаване и за miR-141 и miR-30c (корелационен коефициент на Pearson: 0.371,  $p=0.001$ ).

**Таблица 14. Резултати показали статистическа значимост при мултимаркерния анализ ROC кривите, когато ДПХ контролите са използвани като калибратори**

Комбинация от биомаркери	AUC (95% CI)	P стойност	Чувствителност (%)	Специфичност (%)
let-7c и miR-141	0.753 (0.598-0.908)	0.002	79.7	81.2
miR-141 и miR-375	0.695 (0.510-0.880)	0.017	74.6	75
let-7c и PSA	0.714 (0.560-0.868)	0.012	69.1	60
miR-30c и PSA	0.702 (0.546-0.858)	0.017	65.5	60
miR-141 и PSA	0.699 (0.551-0.846)	0.019	72.7	53.3
miR-375 и PSA	0.833 (0.727-0.938)	$8.5 \times 10^{-5}$	85.5	66.7
let-7c, miR-30c и miR-141	0.753 (0.598-0.908)	0.002	79.7	81.2
let-7c, miR-141 и miR-375	0.816 (0.688-0.943)	$1.2 \times 10^{-4}$	78	87.5
let-7c, miR-375 и PSA	0.838 (0.732-0.943)	$7 \times 10^{-5}$	70.9	80
let-7c, miR-30c и PSA	0.719 (0.567-0.870)	0.01	72.7	53.3
let-7c, miR-141 и PSA	0.705 (0.554-0.857)	0.015	65.5	60
miR-30c, miR-375 и PSA	0.833 (0.725-0.940)	$8.6 \times 10^{-5}$	70.9	80
miR-30c, miR-141 и PSA	0.699 (0.552-0.847)	0.019	65.5	60
miR-30c, miR-141 и miR-375	0.814 (0.686-0.941)	$1.3 \times 10^{-4}$	76.3	87.5
let-7c, miR-30c, miR-375	0.662 (0.487-0.837)	0.048	71.2	62.5
miR-141, miR-375, PSA	0.834 (0.724-0.944)	$8.0 \times 10^{-5}$	70.9	73.3
let-7c, miR-30c, miR-141 и miR-375	0.781 (0.635-0.927)	0.01	81.4	81.2
let-7c, miR-141, miR-375 и PSA	0.839 (0.733-0.944)	$6.3 \times 10^{-5}$	92.7	66.7
let-7c, miR-30c, miR-375 и PSA	0.839 (0.735-0.943)	$6.3 \times 10^{-5}$	92.7	66.7
let-7c, miR-30c, miR-141 и PSA	0.777 (0.657-0.897)	0.001	80	60
miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA	0.836 (0.726-0.947)	$7.1 \times 10^{-5}$	94.5	66.7
let-7c, miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA	0.782 (0.664-0.899)	0.001	63.6	73.3

**Таблица 15. Резултати показали статистическа значимост при мултимаркерния анализ ROC кривите, когато MAM са използвани за калибратори**

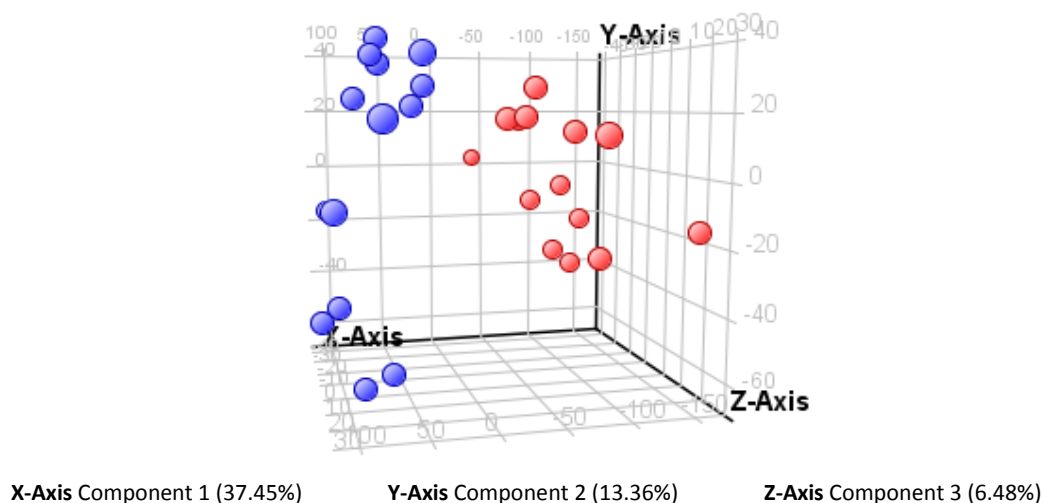
<b>Комбинация от биомаркери</b>	<b>AUC (95% CI)</b>	<b>P стойност</b>	<b>Чувствителност (%)</b>	<b>Специфичност (%)</b>
miR-375 и PSA	0.823 (0.709-0.936)	1.3 x 10 <sup>-4</sup>	85.7	73.3
let-7c и miR-375	0.701 (0.575-0.828)	0.003	76.3	66.7
let-7c и PSA	0.786 (0.669-0.903)	0.001	73.2	80
miR-30c и miR-375	0.693 (0.564-0.822)	0.004	74.6	70.4
miR-30c и PSA	0.714 (0.562-0.867)	0.011	76.8	53.3
miR-141 и miR-375	0.747 (0.636-0.858)	0.001	76.8	69.6
miR-141 и PSA	0.748 (0.585-0.911)	0.01	62.3	63.6
let-7c, miR-30c и miR-375	0.702 (0.574-0.830)	0.003	79.7	63
Let-7c, miR-30c и PSA	0.795 (0.680-0.910)	0.0005	78.6	80
let-7c, miR-141 и miR-375	0.714 (0.579-0.848)	0.003	73.2	73.9
let-7c, miR-375 и PSA	0.815 (0.696-0.935)	0.0002	78.6	80
let-7c, miR-141 и PSA	0.811 (0.676-0.947)	0.001	83	72.7
miR-30c, miR-375, PSA	0.824 (0.714-0.934)	0.0001	71.4	80
miR-30c, miR-141 и miR-375	0.688 (0.543-0.832)	0.009	82.1	60.9
miR-30c, miR-141 и PSA	0.768 (0.620-0.917)	0.005	69.8	63.6
let-7c, miR-30c, miR-141 и miR-375	0.769 (0.650-0.889)	0.0002	76.8	78.3
let-7c, miR-141, miR-375 и PSA	0.875 (0.779-0.971)	0.0001	86.8	81.8
let-7c, miR-30c, miR-375 и PSA	0.815 (0.690-0.940)	0.0002	82.1	80
let-7c, miR-30c, miR-141 и PSA	0.835 (0.726-0.945)	0.001	83	72.7
miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA	0.858 (0.750-0.965)	0.00021	88.7	72.7
let-7c, miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA	0.877 (0.782-0.971)	9 x 10 <sup>-5</sup>	86.8	81.8

#### 4.6. Резултати от микроРНК микрочиповия анализ

Получените данни от сканираните микрочипове бяха проверени дали отговарят на определено качество. Всички чипове отговаряха на добро качество и бе възможно използването им в последващите анализи. За да се отстрани варирането и за да се създаде възможност за тяхното сравнение бе избран метод за нормализация на данните (90th percentile shift). Данните бяха след това филтрирани по различни показатели.

##### 4.6.1. Резултати от анализа на основните компоненти (PCA)

В PCA анализа бяха включени данните от експресионния анализ на микроРНК-и (miRNAs) и данни за диагнозата- РП или ДПХ. Получиха се две основни групи. В едната група се намират всички контроли с ДПХ и петима от пациентите, а в другата всички останали пациенти с РП. За да се открият диференциално експресирани микроРНК-и между туморна и нормална простатна тъкан, изключихме пациентите, които не се разграничават от контролите в PCA. На Фигура 9 са показани резултатите от PCA след изключването на пациентите, които не се разграничават от контролите.

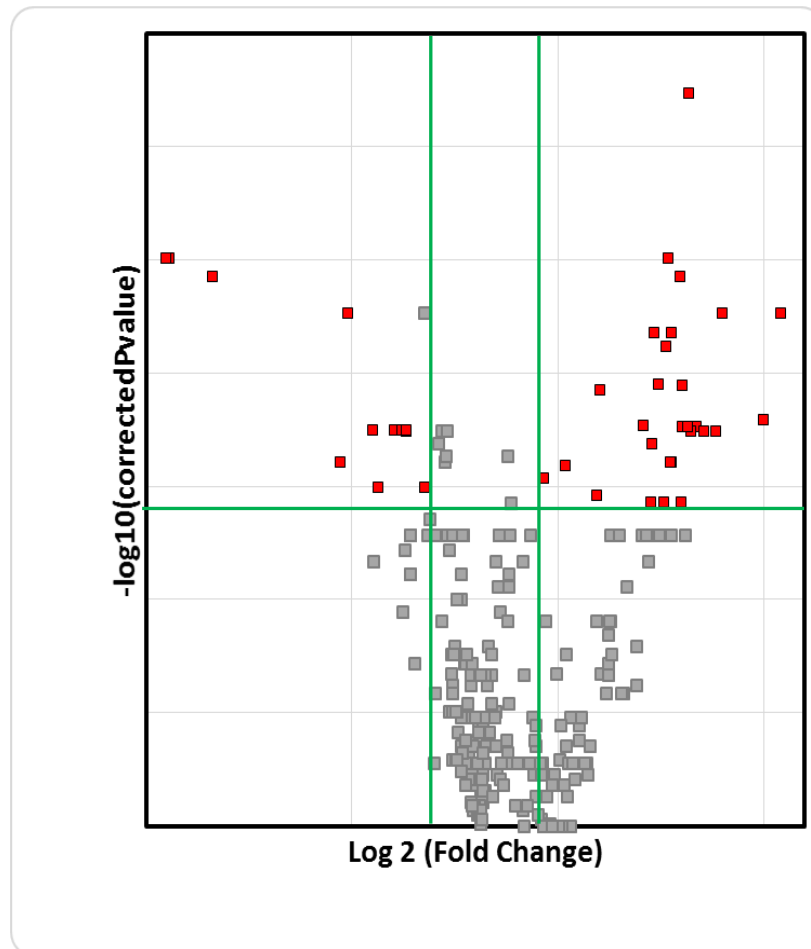


**Фигура 10. PCA, показващ разграничаването на пациентите и контролите на две групи въз основа на miRNA експресионните профили. Легенда: в червено са отбелязани контролите с ДПХ, а в синьо пациентите с РП.**

#### 4.6.2. Установяване на микроРНК-и с променена експресия в туморна простатна тъкан на пациенти с РП в сравнение с нормална тъкан на контроли с ДПХ

При сравнението между miRNA експресионните профили на пациентите и контролите бе използван Mann–Whitney unpaired тест и Benjamini–Hochberg FDR за множествени сравнения. За значими разлики приехме промяна в експресията  $\geq 2$  и p стойности  $< 0.05$ . На Фигура 11 е представен Volcano plot, визуализиращ нивата на експресия на микроРНК-ите и статистическата значимост на получените резултати.

Статистически значима повишена експресия показаха 28 микроРНК-и, а 14 показаха статистически значима понижена експресия представени в Таблицы 16 и 17.



Фигура 11. Volcano plot анализ на получените резултати

**Таблица 16. микроРНК-и показали статистически значима повишена експресия в туморна тъкан от радикална простатектомия на пациентите с РП спрямо нормална тъкан на контроли с ДПХ**

miRNA наименование	Промяна в експресията (FC)	logFC	p	p коригирана стойност	Номер на miRNA в miRBase
hsa-miR-4317	36.64	5.20	1.64 x 10 <sup>-6</sup>	5.86 x 10 <sup>-4</sup>	MIMAT0016872
hsa-miR-3679-3p	25.71	4.68	3.48 x 10 <sup>-5</sup>	3.11 x 10 <sup>-3</sup>	MIMAT0018105
hsa-miR-382	31.67	4.98	7.29 x 10 <sup>-5</sup>	3.77 x 10 <sup>-3</sup>	MIMAT0000737
hsa-miR-500a	20.43	4.35	1.67 x 10 <sup>-4</sup>	6.64 x 10 <sup>-3</sup>	MIMAT0004773
hsa-miR-99a*	27.27	4.77	1.54 x 10 <sup>-4</sup>	6.64 x 10 <sup>-3</sup>	MIMAT0004511
hsa-miR-17*	63.79	5.99	5.55 x 10 <sup>-5</sup>	7.54 x 10 <sup>-3</sup>	MIMAT0000071
hsa-miR-340	172.57	7.43	5.55 x 10 <sup>-5</sup>	7.54 x 10 <sup>-3</sup>	MIMAT0004692
hsa-miR-423-3p	24.78	4.63	2.14 x 10 <sup>-4</sup>	7.65 x 10 <sup>-3</sup>	MIMAT0001340
hsa-miR-29b-1*	22.06	4.46	3.48 x 10 <sup>-4</sup>	0.011	MIMAT0004514
hsa-miR-299-5p	33.07	5.05	3.83 x 10 <sup>-4</sup>	0.011	MIMAT0002890
hsa-miR-181c	8.26	3.05	1.98 x 10 <sup>-4</sup>	0.016	MIMAT0000258
hsa-miR-505*	17.02	4.09	6.19 x 10 <sup>-4</sup>	0.017	MIMAT0004776
hsa-miR-21*	128.76	7.01	3.22 x 10 <sup>-4</sup>	0.022	MIMAT0004494
hsa-miR-126*	41.47	5.37	5.15 x 10 <sup>-4</sup>	0.024	MIMAT0000444
hsa-miR-502-3p	32.76	5.04	4.08 x 10 <sup>-4</sup>	0.024	MIMAT0004775
hsa-miR-664	36.06	5.17	5.15 x 10 <sup>-4</sup>	0.024	MIMAT0005949
hsa-miR-24-1*	37.98	5.25	1.26 x 10 <sup>-3</sup>	0.025	MIMAT0000079
hsa-miR-362-3p	47.21	5.56	1.26 x 10 <sup>-3</sup>	0.025	MIMAT0004683
hsa-miR-590-5p	57.29	5.84	1.26 x 10 <sup>-3</sup>	0.025	MIMAT0003258
hsa-miR-150*	4.59	2.20	1.01 x 10 <sup>-3</sup>	0.025	MIMAT0004610
hsa-miR-362-5p	19.51	4.29	1.56 x 10 <sup>-3</sup>	0.028	MIMAT0000705
hsa-miR-381	27.27	4.77	2.37 x 10 <sup>-3</sup>	0.032	MIMAT0000736
hsa-miR-500a*	26.80	4.74	2.37 x 10 <sup>-3</sup>	0.032	MIMAT0002871
hsa-miR-186	3.19	1.67	2.91 x 10 <sup>-3</sup>	0.038	MIMAT0000456
hsa-miR-181d	7.74	2.95	3.56 x 10 <sup>-3</sup>	0.044	MIMAT0002821
hsa-miR-130b	32.01	5.00	4.33 x 10 <sup>-3</sup>	0.046	MIMAT0000691
hsa-miR-194	23.95	4.58	4.33 x 10 <sup>-3</sup>	0.046	MIMAT0000460
hsa-miR-582-5p	19.33	4.27	4.33 x 10 <sup>-3</sup>	0.046	MIMAT0003247

**Таблица 17. микроРНК-и показали статистически значима понижена експресия в туморна тъкан от радикална простатектомия на пациентите с РП спрямо нормална тъкан от tru-cut биопсия на контроли с ДПХ**

miRNA наименование	Промяна в експресията (FC)	logFC	p	p коригирана стойност	Номер на miRNA в miRBase
hsa-miR-196a	-172.17	-7.43	$3.08 \times 10^{-5}$	$3.11 \times 10^{-3}$	MIMAT0000226
hsa-miR-3180-5p	-181.39	-7.50	$2.96 \times 10^{-5}$	$3.11 \times 10^{-3}$	MIMAT0015057
hsa-miR-634	-83.97	-6.39	$5.59 \times 10^{-5}$	$3.77 \times 10^{-3}$	MIMAT0003304
hsa-miR-3147	-8.46	-3.08	$5.55 \times 10^{-5}$	$7.54 \times 10^{-3}$	MIMAT0015019
hsa-miR-1234	-3.57	-1.84	$1.01 \times 10^{-3}$	0.025	MIMAT0005589
hsa-miR-144	-3.31	-1.73	$1.01 \times 10^{-3}$	0.025	MIMAT0000436
hsa-miR-3682	-3.91	-1.97	0.001013	0.025	MIMAT0018110
hsa-miR-4253	-3.45	-1.79	$1.01 \times 10^{-3}$	0.025	MIMAT0016882
hsa-miR-483-3p	-3.18	-1.67	$1.01 \times 10^{-3}$	0.025	MIMAT0002173
hsa-miR-650	-5.63	-2.49	$8.11 \times 10^{-4}$	0.025	MIMAT0003320
hsa-miR-215	-3.21	-1.68	$1.26 \times 10^{-3}$	0.026	MIMAT0000272
hsa-miR-486-5p	-9.69	-3.28	$2.38 \times 10^{-3}$	0.032	MIMAT0002177
hsa-miR-484	-2.35	-1.23	$1.43 \times 10^{-3}$	0.032	MIMAT0002174
hsa-miR-494	-5.13	-2.36	$1.40 \times 10^{-3}$	0.032	MIMAT0002816

От микроРНК-ите с повишена експресия 4 показват промяна от 3-8 пъти, а при останалите микроРНК-и промяната е значителна и е над 17 пъти. От микроРНК-ите с понижена експресия три показват над 80 пъти променена експресия, а при останалите промяната е от 2 до 9 пъти.

Корелация на експресията на микроРНК-ите с клиникопатлогичните характеристики не бе установена вероятно поради малката група изследвани пациенти и котроли.

#### **4.6.3. Определяне на таргетните гени регулирани от микроРНК-ите показали статистически значима променена експресия. Установяване на повлияните клетъчни пътища**

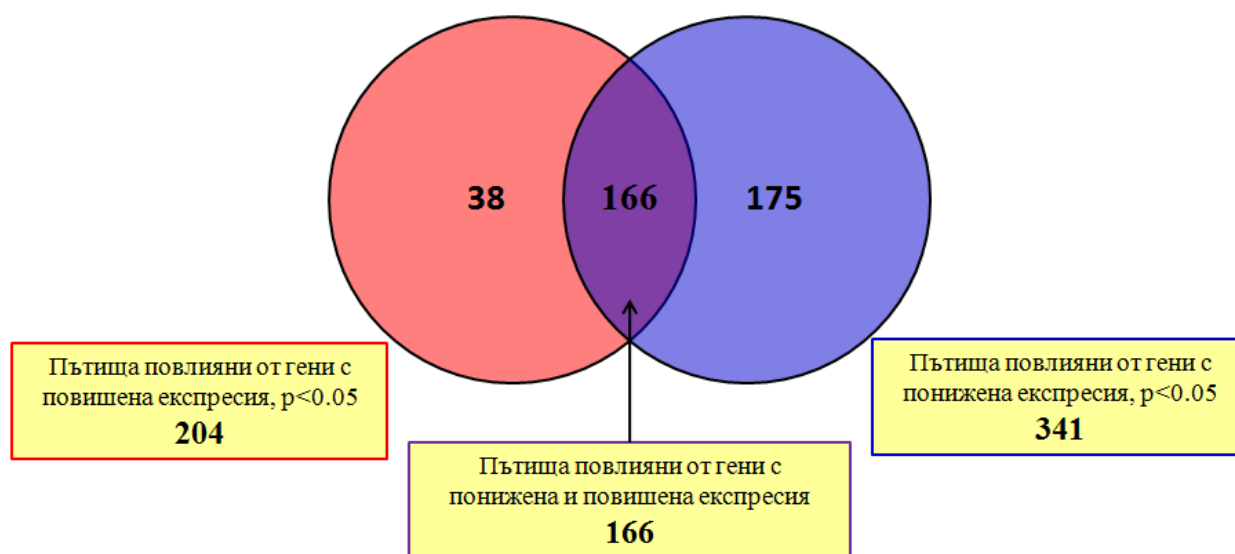
Установяването на таргетните гени регулирани от диференциално експресираните микроРНК-и, както и клетъчните пътища, в които участват бе осъществено с помощта на Gene Spring.

Бяха подбрани само тези гени, които статистически значимо се повлияват от диференциално експресираните микроРНК-и. Статистически значимо повлияни от микроРНК-и с понижена експресия са 525 гена, а от тези с повишена експресия са 1663 гена (Таблица 18). Част от гените (19) се повлияват едновременно от микроРНК-ите с повишена и понижена експресия.

Гените с предполагаема повишена експресия, регулирани съответно от микроРНК-ите с установена понижена експресия статистически значимо повлияват 204 клетъчни пътя. Гените с предполагаема понижена експресия, регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия статистически значимо повлияват 341 клетъчни пътя. Част от пътищата са повлияни едновременно от гени с предполагаема повишена и понижена експресия, съответно регулирани от микроРНК-и с понижена и повишена експресия (Фигура 12). Друга част от пътищата са повлияни само то гени с повишена или понижена експресия.

**Таблица 18. Брой установени диференциално експресирани miRNAs, брой статистически значимо повлияни таргетни гени и пътища.**

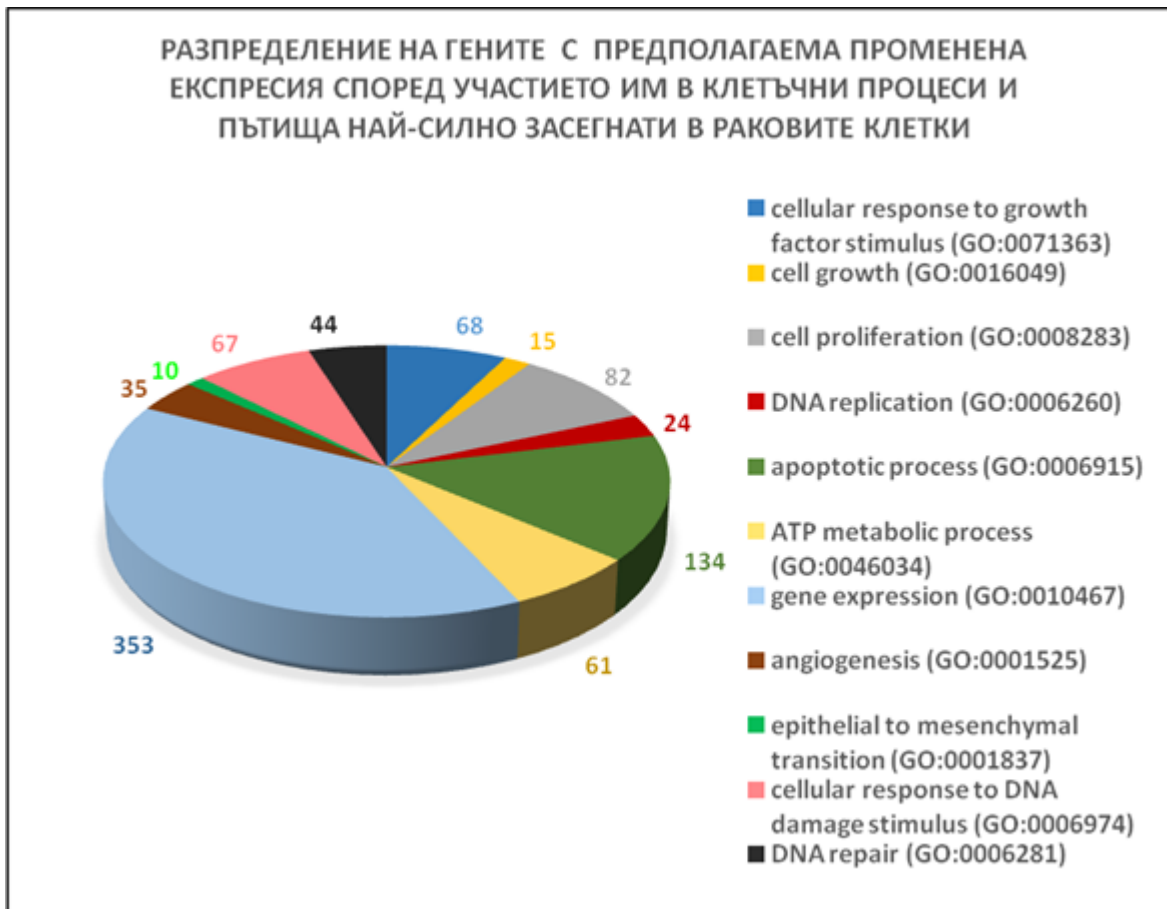
Брой диференциално експресирани miRNAs	Брой установени статистически значимо повлияни гени	Брой статистически значимо повлияни клетъчни пътища
28 miRNAs с повишена експресия	1663	204
14 miRNAs с понижена експресия	525	341



**Фигура 12. Venn диаграма, показваща засегнатите пътища от гени с предполагаема повишена и понижена експресия**

#### 4.6.4. Онтологичен анализ

Проведохме онтологичен анализ и избрахме основните клетъчни процеси и пътища променени в раковите клетки, за да определим разпределението на таргетните гени в тях (Фигура 11). Изборът на клетъчните пътища и процеси направихме, базирайки се на основните характеристики на раковите клетки - самодостатъчност по отношение на растежни фактори; нечувствителност към сигнали, потискащи клетъчния растеж; избягване на апоптоза; неограничен репликативен потенциал; активиране на ангиогенезата; тъканна инвазивност и метастазиране; репрограмизиране на клетъчния метаболизъм. Подбраните клетъчни процеси и пътища са следните: клетъчен растеж, пролиферация, ДНК репликация, апоптоза, клетъчен отговор към растежни стимули, генната експресия, АТФ метаболитни процеси, клетъчен отговор към ДНК повреди, ДНК поправка, ангиогенеза и епително мезенхимна транзиция. Най-много таргетни гени регулирани от установените в текущото изследване диференциално експресирани микроРНК-и участват в генната експресия, апоптозата, клетъчната пролиферация, клетъчния отговор към растежни стимули и ДНК повреди, и АТФ метаболитните процеси (Фигура 13).



Фигура 13.

#### 4.6.5. Най-силно засегнати и важни за раковите клетки пътища повлияни от показалите диференциална експресия микроРНК-и, регулиращи участници в тях

##### 4.6.5.1. MAPK сигнален път

В този път са засегнати общо 26 таргетни гена (от общо 168) като от тях 23 са регулирани от показалите увеличена експресия микроРНК-и и 3 са регулирани от микроРНК-ите с понижена експресия. Мишени на микроРНК-ите с понижена експресия са *MAP3K1 (MEKK1)*, *IL1A* и *MRAS*. Важни таргети на микроРНК-ите с повишена експресия са *NLK*, *TGFB1*, *TGFB2*, *FAS*, *FASLG*, *GADD45A*, *DUSP10*, *NF1*. Тези белтъчни продукти участват и в други сигнални пътища като например тези свързани с апоптозата, TGF- $\beta$  сигналния път, контрола на клетъчния цикъл и тн.

Най-много микроРНК-и с повишена експресия регулират *NF1* (23 бр.), *NLK* (19 бр.), *FAS* (16 бр.), а така също и *TGFB2* (17 бр.) и *TGFB1* (15 бр.).

##### 4.6.5.2. Сигнални пътища свързани с апоптоза

Сигналните пътища свързани с клетъчната смърт са по-силно повлияни от микроРНК-ите, показващи повишена експресия. Общо 16 участника са потенциално инхибирани, а 7 са активирани. Голяма част от инхибираните участници са гени, активиращи апоптозата и по тази причина тя най-вероятно е потисната.

Мишени на микроРНК-ите с повишена експресия са: *APAF1*, *FAS*, *FASL*, *DAXX*, *CASP11 (SFRS2IP; SIP1; SCAF11)*, *PTK2*, *ROCK1*, *BFL1 (BCL2A1)*, *HSPA1A*, *ARHGAP10*, *DCC*, *APPL1*, *MAP2K4*, *DSG1*, *SATB1*.

Мишени на микроРНК-ите с понижена експресия са: *DFFA*, *BBC3 (PUMA)*, *BIRC5 (Survivin)*, *UNC5A*, *TOLLIP*, *MAP3K1*, *IL1A*.

#### 4.6.5.3. Wnt сигнален път

Участници в този път, регулирани от микроРНК-ите с понижена експресия са: *WNT4*, *WNT6*, *WNT5B*, *FZD2* и *RACGAP1*. Участниците регулирани от микроРНК-ите с увеличена експресия са: *PAFAH1B1*, *PRKCE*, *PPP2R5E*, *PRKDI* и *NLK*. От тези таргетни гени *PRKCE* не се експресира нито в нормална, нито в туморна простатна тъкан и следователно е случайна мишена.

#### 4.6.5.4. Клетъчен цикъл

Част от гените като *GADD45A* и др, участващи в контрола на клетъчния цикъл, регулирани от показателите диференциална експресия микроРНК-и са участници и в други сигнални пътища.

Мишени на микроРНК-ите с повишена експресия са и гените: *HDAC8*, *PTTG1* (*securin*), *MAD2L1* (*MAD2*), *BUB3*, *FBXO5* (*Eml1*). Те най-вероятно са с понижена експресия.

Мишена на микроРНК-ите с понижена експресия е *MAD2L2* (*MAD2B*).

Най-силно повлияни са гените *HDAC8* и *BUB3*.

*MAD2B* и *MAD2* са хомоложни и изпълняват еднакви функции в клетката. И двата гена се експресират в простатната жлеза. По-силно е повлиян *MAD2*, тъй като той се регулира от 9, а неговия хомолог *MAD2B* от 4 микроРНК-и. В допълнение микроРНК-ите, регулиращи *MAD2* са с по-силно променена експресия в сравнение с микроРНК-ите, регулиращи *MAD2B*.

Друг не пряк регулатор на клетъчния цикъл, чиято експресия се регулира от диференциално експресирани микроРНК е *PTEN*. Шест микро РНК-и (*miR-340*, *miR-181c*, *miR-181d*, *miR-17\**, *miR-29b-1\** и *miR-186*) от показателите повишена експресия и 3 (*miR-144*, *miR-486*, *miR-494*) от показателите понижена експресия регулират този туморсупресорния ген, но в анализа не се достига статистическа значимост.

#### 4.6.5.5. TGF- $\beta$ сигнален път

Гени, участващи в TGF- $\beta$  сигналния път и регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия са: *TGFB2*, *TGFB1*, *TGFB3*, *ATF2*, *SMAD1*, *SMAD9*. Мишени на микроРНК-ите с понижена експресия са: *SNX4* и *SNX11*.

Най-много микроРНК-и регулират *TGFB2* (17 бр.), *TGFB1* (15 бр.) и *TGFB3* (14 бр.).

#### 4.6.5.6. NOTCH сигнален път

В NOTCH сигналния път гените *NOTCH4*, *FURIN* и *CIR* (*KCNJ5*, *GIRK4*; *KATP1*; *LQT13*; *KIR3.4*) са повлияни от микроРНК-ите показали понижена експресия, а *HEY1* и *NOTCH3* се регулират от микроРНК-ите с повишена експресия.

#### 4.6.5.7. Toll-like receptor сигнален път

От Toll-like рецепторния път експресията на *TLR4* е вероятно силно повлияна, тъй като той се регулира от 12 микроРНК-и показали повишена експресия.

#### 4.6.5.8. Поправка на ДНК повреди

Гените повлияни с диференциална експресия и участващи в ДНК поправката са: *MSH2* част от MMR и гените: *TDG*, *LIG3*, *NTHL1* (*NTH1*; *OCTS3*) част от BER. Най-силно повлиян е *MSH2*.

#### 4.6.5.9. P53 сигнален път

В този път са засегнати най-силно са *GADD45A* и *TP53*.

#### 4.6.5.10. Аспаргин- N- свързано гликозилиране

Участници в гликозилирането и мишени на микроРНК-ите с намалена експресия са *DOLPP1* и *MGAT3*.

#### 4.6.5.11. Поддържане на теломерите

Експресията на *TERT*, участващ в поддържането на теломерите е вероятно с повишена експресия в изследваните простатни тумори вследствие на понижени нива на микроРНК-и, които го регулират.

#### 4.6.5.12. EGF-EGFR сигнален път

Гени, участващи в EGF-EGFR сигналия път и които се регулират от микроРНК-ите показали диференциална експресия са следните: *AB11* (*SSH3BP1*), *BCAR1* и *MAP3K1*. Най-силно е повлияна експресията на *AB11*, тъй като е мишена на 13 микроРНК-и с повишена експресия.

#### 4.6.5.13. ID сигнален път

В нашето проучване диференциално експресиранияте микроРНК регулират следните гени, участващи в ID сигнализирането: *ID4*, *SREBF1* и *PAX5*. В този сигнален път най-много микроРНК-и регулират *ID4*.

#### 4.6.5.14. Енергиен метаболизъм

Някои от засегнатите гени участващи в енергийния метаболизъм са: *SLC25A4*, *ATP5J*, *ATP5G2*, *COX5A*, *COX7B*, *COX11*, регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия и гените *MDH2*, *PGAM2*, *SREBP1* регулирани от микроРНК-ите с намалена експресия. Най-много микроРНК-и регулират *SLC25A4* (14 на брой) и *COX11* (11 на брой). Вероятно по-слабо повлияни са гените регулирани от микроРНК-ите с понижена експресия.

#### 4.6.5.15. Отговор към оксидативен стрес

Гените, участващи в отговора към оксидативен стрес и регулирани от микроРНК-ите с променена експресия са *TXN2*, *MTIX*, *UGT1A6*. Най-много микроРНК-и регулират *UGT1A6*.

#### 4.6.9.16. Клетъчна адхезия

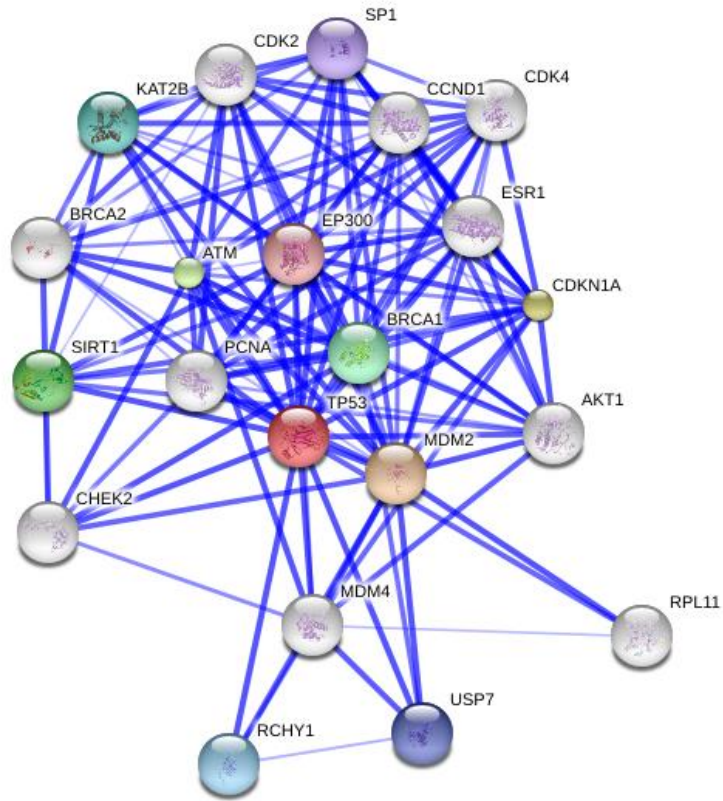
Клетъчната адхезия като цяло би следвало да е подтисната вследствие на действието на микроРНК-ите, тъй като са повлияни гените: *CAV2*, *MET*, *COL4A6*, *COL4A1*, *ITGA2*, *ITGA9*, *ITGB8*, *ITGAM*, *PIK3R*, *ARHGAP5*.

#### 4.6.5.17. Други важни гени регулирани от микроРНК-ите показали промяна в експресията

Някои от гените регулирани от микроРНК-ите с променена експресия и не попадащи в пътищата разгледани до този момент, но представляващи туморсупресори или онкогени са *KLF9*, *TOB1*, *DAZAP2*, *RUNX1*, *ITM2B* регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия и *GATA2*, *TLN1* и *RNMT* регулирани от микроРНК-ите с понижена експресия. Най-силно повлиян вероятно е *KLF9*, тъй като той се регулира от 17 микроРНК-и с повишена експресия. От гените регулирани от микроРНК-ите с понижена експресия най-силно вероятно е повлиян *RNMT*.

### **4.6.6. Определяне на белтък-белтъчните взаимодействия на важни туморсупресори и онкогени, регулирани от показалите диференциална експресия микроРНК-и в изследваните простатни тумори**

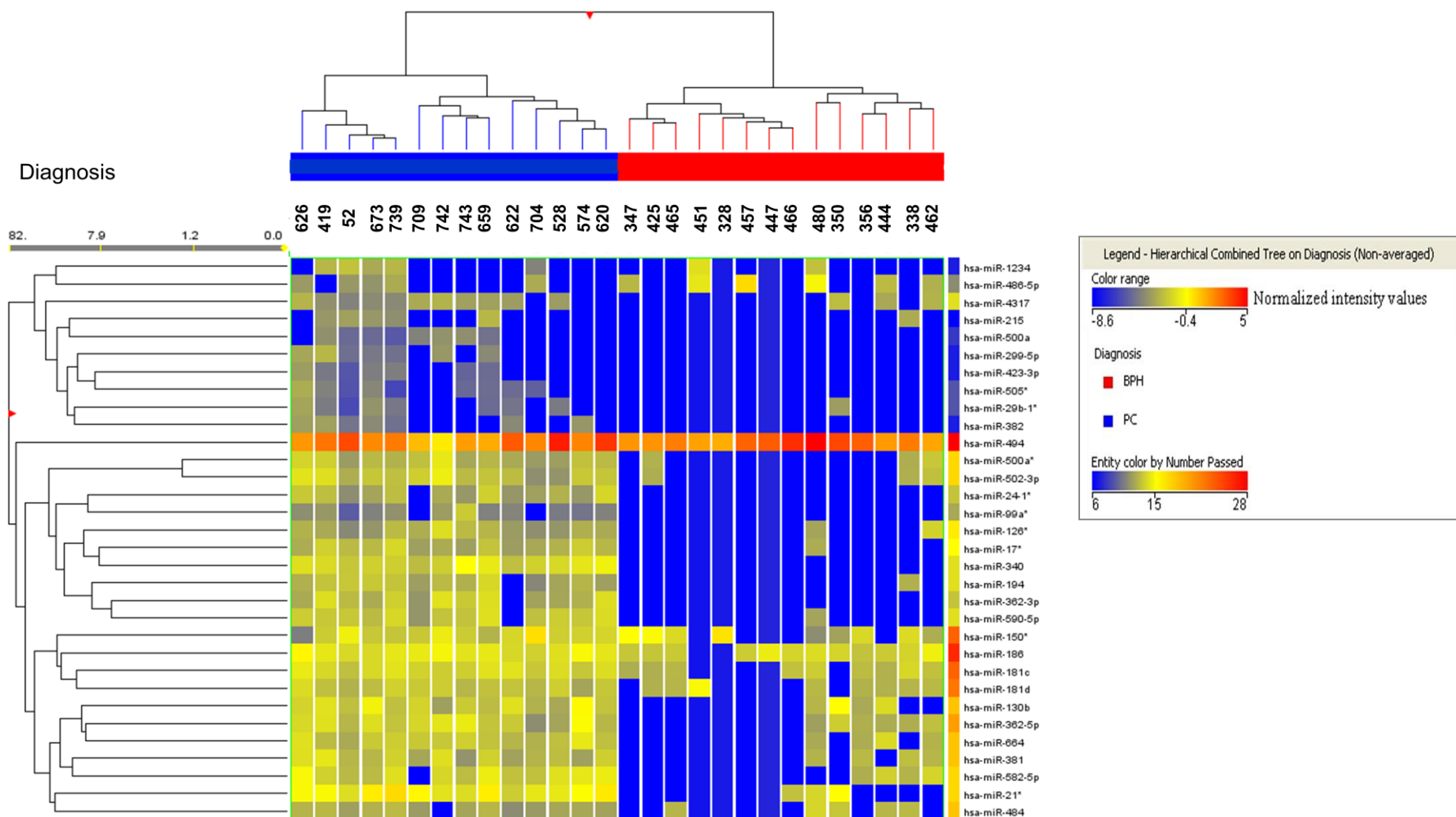
Определянето на белтък-белтъчните взаимодействия бяха определени с помощта на STING [1]. Бяха определени белтък-белтъчните взаимодействия на p53, TERT, ID4, KLF9, NLK, MAD2L1, DCC, ABI1L, NF1, FURIN, MSH2. Те показват, че промяната в нивата на подбраните гени повлиява активността или експресията на други важни гени.



**Фигура 14. Взаимодействие на p53 с други белтъци.** По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.

#### 4.6.7. Резултати от йерархичен клъстерен анализ

Йерархичният клъстерен анализ показва, че 27 от 28-те микроРНК-и с повишена експресия и 5 от микроРНК-ите с понижена експресия могат да разграничат надеждно туморните от нормалните простатни тъкани (Фигура 15).



**Фигура 15.** Йерархичен клъстерен анализ въз основа на диференциално експресираниите микроРНК-и и диагнозата без усредняване на стойностите на пациентите и контролите и след прилагане на допълнително филтриране на микроРНК-ите експресирани в под 5 проби. Обозначения: PC- пациенти с РП; BPH- контроли с ДПХ

## 5. ОБСЪЖДАНЕ

### 5.1. Обсъждане на резултатите от проведените асоциативни проучвания на полиморфни варианти открити при GWAS

В нашето проучване не се достигат статистически значими резултати за някои от изследваните полиморфни варианти. Вероятно това се дължи на малката статистическа сила на проучването и малкия ефект на полиморфизмите върху риска за развитие на РП, който може да се определи при изследването на голям брой пациенти и контроли. Друго възможно обяснение е, че някои от тези полиморфизми са асоциирани с риска за ранно развитие и фамилен РП, както и с увеличен риск за фатален изход от заболяването и с увеличен риск за развитие на метастази както при rs6465657 [2-6]. Трябва да се отбележи, че ролята на изследваните полиморфни варианти може да е различна за отделните популации.

В хромозомен локус **8q24** бяха изследвани 4 полиморфни варианта (rs1016346, rs4871008, rs7841060, rs620861). От тях полиморфен вариант **rs620861** не показва никаква асоциация с риска за развитие на РП, както и с клиникопатологични характеристики на туморите при български пациенти сходно на San Francisco и съавтори [7]. Полиморфизмите **rs1016343** и **rs7841060** не показваха асоциация с предразположеността за развитие на РП, но се намери статистически значима асоциация с риска за развитие на висок Gleason score и метастази, което ги прави потенциални прогностични биомаркери. До този момент не е докладвана асоциация на тези полиморфизми с агресивността на заболяването. Необходимо е валидирането на резултатите в по-голямо проучване. Резултатите за **rs4871008** са в съгласие с литературните данни [8], при който честотата на рисковия алел С е по-висока при пациентите в сравнение с контролите. Генотипът Т/Т се среща много често в контролите в сравнение с пациентите като значително понижава риска за развитие на РП ( $p=0.03$ , OR=0.52 95%CI: 0.29-0.94). Проведеният хаплотипен анализ допълва наблюдението, че изследваните полиморфизми в **8q24** са по-силно асоциирани с риска за развитие на агресивни тумори. Хаплотипът С-Т-Т (rs1016343-rs4871008-rs7841060) се асоциира с понижен риск за поява на тумори с висок Gleason score.

От изследваните полиморфни варианти в **10q11** (**rs10993994** и **rs7920517**) хромозомен локус асоциацията с риска за развитие на РП при български пациенти се потвърди за **rs7920517**. Резултатите за този полиморфизъм са в съгласие с публикуваните данни от геномно асоциативно изследване в два стадия, при които рискът за развитие на РП свързан с хетерозиготно носителство варира от 1.10 до 1.18, докато рискът от хомозиготно носителство на рисковия алел е в рамките на 1.47-1.99 [9]. Полиморфизмът **rs7920517** показва асоциация и с риска за развитие на агресивно заболяване.

Полиморфизмът **rs7127900** е изследван в едно проучване на PRACTICAL консорциума, където показва високо OR и асоциация с РП и при включените български пациенти [10]. За да потвърдим намерената асоциация изследвахме този полиморфизъм в разширена кохорта от пациенти и контроли.

Полиморфизмът **rs7127900** се намира в късото рамо на хромозома 11, в локус 11p15 и близко разположен гени са *IGF*, *IGF2*, *INS*, *TH*, за които има данни, че имат роля в молекулярната патология на РП [11, 12]. За да се разясни ролята на този регион за развитието на РП бяха подбрани шест полиморфизми разположени центромерно и един теломерно по отношение на полиморфизма rs7127900. Потвърди се генотипната асоциация на rs7127900 с риска за развитие на РП при български пациенти. Статистически значими разлики в генотипните и алелните честоти между пациентите и контролите не се получиха за пет от полиморфните варианти разположени центромерно (rs11603378, rs2239681, rs10770125, rs3842756) и теломерно (rs55930300) на първоначално показали асоциация полиморфизъм rs7127900. Това показва, че те не са отговорни за получените се сигнал от GWAS за 11p15 региона. Тенденция за асоциация бе наблюдавана за **rs2239681** в IGF2 тъй като G/G генотипът се среща по-често при пациенти с агресивни тумори

(висок Gleason score, T3 или T4 туморен стадий и с лимфни метастази) и резултатът бе близък до статистическа значимост ( $p=0.07$ ).

Статистически значима асоциация с РП бе наблюдавана за полиморфизмите **rs2070762** и **rs11564710**. Вероятно тези полиморфни варианти заедно с rs7127900 на 11p15 повлияват риска за развитие на заболяването. Най-голямата степен на значимост се получи за rs11564710. Алелът С се среща по-често при контроли и е протективен, а алелът А се среща по-често при пациенти и е рисков като разликите са статистически значими ( $p=0.04$ ). Дори и хетерозиготното носителство на рисковия алел А води до двукратно повишаване на риска за възникване на РП ( $p=3 \times 10^{-4}$ , OR-2.21 95% CI: 1.43-3.41). Не се получиха статистически значими резултати за А/А генотипа вероятно защото той е рядък и за да се определи ефекта му върху риска за развитие на РП е необходимо изследването на по-голяма кохорта от пациенти и контроли. Този полиморфен вариант оказва и посилен ефект върху предразположеността за развитие на РП от rs7127900 тъй като повишава риска с над 2 пъти в сравнение с 1.77 пъти. Проведеният хаплотипен анализ с изследваните полиморфизми на 11p15 също показва, че определени хаплотипни комбинации от изследваните полиморфизми са статистически значимо асоциирани с РП. Установи се, че хаплотипни комбинации между полиморфизми, които не показаха статистически значима асоциация при изследването им поотделно, са асоциирани с риска за развитие на метастази.

## **5.2. Обсъждане на резултатите от проведените асоциативни проучвания на полиморфни варианти в гена AMACR и гените AR и CYP17 свързани с метаболизма на андрогените**

Изследваните полиморфни варианти в *CYP17* (rs2567206), *AR* (CAG повтор в екзон 1) и *AMACR* (rs3195676) не показаха статистически значима асоциация с риска за развитие на РП, както и с клиникопатологичните характеристики, определящи агресивността на туморите.

*CYP17* е важен ензим за активирането на екзогенни и ендогенни прокарциногени в реактивни метаболити, които предизвикват увреждания в ДНК [13]. Той е много полиморфен и неговата активност и каталитична специфичност се регулират от няколко функционални несинонимни еднонуклеотидни полиморфизми (SNP) [14]. В много изследвания се анализира връзката между тези полиморфизми и РП.

Veuten и съавтори изследват и нефункционален полиморфизъм в *CYP17* - **rs2567206** за асоциация с РП. Те установяват, че този вариант е асоцииран със значително понижаване на риска за развитие на агресивен РП при испанските кавказци [15]. В нашето проучване rs2567206 не показва асоциация с риска за развитие на РП, а така също и с клиникопатологичните характеристики. Това може да се дължи на малката група изследвани пациенти и контроли. Статистически значими резултати са получени в изследването на Veuten, но то включва общо 706 пациенти и 1334 контроли. В нашето проучване са включени 181 пациента и 168 контроли.

Ефектите на андрогените се медиат от андрогеновия рецептор (*AR*), ядрен транскрипционен фактор кодиран от *AR* гена. Тринуклеотидният полиморфизъм (**CAG**)<sub>n</sub>, кодиращ полиглутаминов повтор (Q tract) в екзон 1 на този ген, се предполага, че е рисков фактор при РП [16].

Нормалният брой повтори на CAG микросателита е между 8 и 35, а средно около 20. Микросателитният повтор се асоциира с различия в активността на *AR* [17]. По-късите повтори водят до по-висока активност [18, 19] и са асоциирани с риска за развитие на РП, агресивни тумори, биохимични рецидиви и повишена смъртност поради заболяването [16, 20-23]. Въпреки това резултатите варират за различните етнически групи. Най-скорошните изследвания не откриват асоциация на този полиморфизъм с риска за развитие на РП [24, 25], прогресията и общата преживяемост, а така също с Gleason score или туморния стадий при поставянето на диагнозата [26]. Противоположните заключения вероятно са поради различия в дизайна, малките изследвани групи в някои проучвания, различия в средата, генетичните фактори и други случайни фактори, а така също и различия в приетата гранична стойност за дължина на повторите [27].

*AMACR* кодира  $\alpha$ -метилацил-СоА рацемаза, която участва в  $\beta$  окислението на разклонените мастни киселини и техни деривати, катализира конверсията на няколко R-метилацил-КоА мастни киселини в техните S-стерео изомери [28]. *AMACR* експресията е маркер за туморна диференциация. Този маркер има способността да потвърждава диагноза за злокачественост при простатна биопсия. Нивата на иРНК на гена за *AMACR* показват 9-кратно повишение в биопсии от карцином на простатата в сравнение с нормална простатни тъкани [29].

Открити са различни полиморфизми в *AMACR*, няколко мисенс замени M9V (rs3195676), G1175D, S291L, и K277E, които са асоциирани с РП [28].

Изследваният полиморфен вариант **rs3195676** води до аминокиселинната замяна метионин към валин в кодон 9 - M9V в екзон 2. Този полиморфизъм показва най-силна асоциация с РП от всички изследвани полиморфни варианти в *AMACR* [28-31]. В нашето проучване не се достига статистическа значима асоциация, но генотипът С/С и алелът С се срещат по-често при контролите в сравнение с пациентите с агресивно заболяване и вероятно понижават риска за развитие на метастази и тумори с висок Gleason score. Установено е, че С алелът се предава по-често на незасегнатите родственици при фамилните случаи на РП [32], но също така редуцира и риска за възникване на заболяването при спорадичните случаи [33]. До този момент няма проучвания, които да изследват асоциацията на M9V с риска за развитие на агресивен простатен карцином. Трябва да се увеличи изследваната група, за да се определи асоциацията на този полиморфизъм с развитието на РП при български пациенти.

### **5.3. Обсъждане на резултатите получени от анализа на промоторното хиперметиране на гените *GSTP1*, *HIST1H4K* и *RASSF2* в урина на пациенти с РП и контроли**

#### **5.3.1. Обсъждане на резултатите получени от анализа на промоторното хиперметиране на *GSTP1* в урина**

Най-проучваният епигенетичен биомаркер при РП е ДНК метилирането на *GSTP1* гена, който кодира ензим необходим за детоксикацията и предпазването на ДНК от оксиданти и електрофилни метаболити. Представява атрактивен неинвазивен биомаркер тъй като може да бъде открит и изследван в телесни течности като серум, плазма и урина [34].

В нашето проучване промоторно хиперметиране на *GSTP1* показаха 70.31% (45) от пациентите с РП и 65.38% (17) от контролите с ДПХ. Сходни резултати за пациентите (76% метилирани) получават и Goessl и съавтори, когато използват QIAamp Viral Kit [35].

В нашето проучване откриваме висок процент (65.38%) метилиране и сред контролите с ДПХ, каквото в повечето проучвания не откриват. Тъй като контролите с ДПХ показват висок процент метилиране, то в анализа на ROC кривите не може да се направи надеждно разграничаване между тях и пациентите (AUC=0.525) и специфичността на промоторното хиперметиране на *GSTP1* е ниска (35%). Това показва, че метилирането на *GSTP1* не е надежден диагностичен биомаркер. В сравнение с него серумните нива на PSA в изследваната група по-надеждно разграничава болните от здравите (AUC=0.745) с чувствителност 73.3%, и специфичност 60.9% при гранична стойност от 9 ng/ml. В едно скорошно проучване *GSTP1* промоторното хиперметиране в урина също не показва статистически значимост като предиктивен фактор за наличие на РП [36].

Метаанализ на биомаркера *GSTP1* показва, че специфичността в различните проучвания варира от 0.41 (41%) до 1 (100%) като в повечето е над 0.5 (50%). За разлика от сравнително високата специфичност, която се открива в повечето изследвания, чувствителността варира в широки граници от 0.05 (5%) до 1 (100%) [37]. Контролите спрямо, които се сравнява ДНК метилирането на *GSTP1* в пациентите с РП се различават в отделните проучвания и вероятно поради тази причина варира и процента метилиране, който се открива при тях. Използваните контроли повлияват върху специфичността на биомаркера, която се получава. В някои проучвания

използват напълно здрави мъже, без урологични оплаквания и често с ниски средни стойности на PSA [38-40]. В нашето проучване контролите, които използвахме са възрастни мъже, с неоткрит рак след биопсия, с ДПХ и със средни PSA стойност 10.36 ng/ml. Така подбрани контроли използват редица други автори [35, 41]. В проучването на Hoque et al сред контролите присъстват и жени [42].

Поради варирането на специфичността и чувствителността на биомаркера *GSTP1* в отделните проучвания, то неговата роля като неинвазивен диагностичен маркер и навлизането му в клиничната практика все още не са напълно изяснени и предстоят още проучвания, в които трябва да се подберат подходящи китове за изолиране, методи за анализ и да се включат контроли, които са възрастни, нямат простатен карцином, но с урологични оплаквания (възпалителни процеси, ДПХ), тъй като в клиничната практика трябва да се прави разграничаване именно между тях и пациентите с простатни карциноми.

Когато в анализа на ROC кривите включихме пациентите и МАМ, то получихме голяма площ на кривата (AUC)- 0.777 и резултатът бе статистически значим ( $p < 0.05$ ) със специфичност 85% (95% CI: 62.08 % - 96.62 %) и чувствителност 70.31% (95% CI: 57.58 % - 81.08 %). Тези резултати могат да се обяснят с корелация на промоторното хиперметиране на *GSTP1* с възрастта. Kwabi-Addo и съавтори откриват зависимо от възрастта метилиране на *RARB2*, *RASSF1A* и *GSTP1* [43]. В нашето проучване след провеждане на корелационен анализ също се установи, че ДНК метилирането на *GSTP1* корелира с възрастта ( $r=0.255$ ,  $p=0.018$ ).

### **5.3.2. Обсъждане на резултатите получени от анализа на промоторното хиперметиране на *HIST1H4K* в урина**

Изследваният ген *HIST1H4K* кодира член на хистон H4 семейството и лежи в рамките на голям клъстер от репликационно-зависими хистоновни гени на хромозома 6p21-22 [44]. Представява обещаващ биомаркер при РП според проучването на Раупе и съавтори [38].

За да определим дали метилирането на *HIST1H4K* е свързано с простатната карциногенеза или се дължи на промени свързани със стареенето, използвахме две групи контроли- контроли с ДПХ, които съответстват по възраст на пациентите и МАМ.

Открихме много сходни честоти на метилиране при пациентите с РП (52.63%) и контролите с ДПХ (55.17%), докато метилиране не бе установено при МАМ. По тази причина, когато в ROC анализа сравнихме пациентите спрямо контролите с ДПХ, не получихме статистически значими резултати и маркерът има ниска диагностична точност (AUC=0.513). Метилирането на *HIST1H4K* успешно разграничава пациентите от младите мъже (AUC=0.763; 95% CI: 0.672-0.839,  $p < 0.0001$ ) и показва по-добра специфичност (100%), но по-ниска чувствителност (52.63%) в сравнение с резултати получени от Раупе и съавтори (AUC=0.64; 95% CI: 0.55–0.72,  $p < 0.00001$ ) [38]. В сравнение с *HIST1H4K* преоперативно измерените серумни стойности на PSA показват по-голяма диагностична точност в разграничаването на пациентите с малигна находка от тези с негативен резултат при биопсия (AUC=0.785,  $p < 0.0001$ , чувствителност от 74.51% и специфичност от 78.57%) при гранична стойност от 11.38 ng/ml.

Корелационният анализ показва статистически значимо, зависимо от възрастта хиперметиране на *HIST1H4K* промоторната област в изследваната извадка от пациенти и контроли без рак (ДПХ контроли и млади мъже), сходно на *GSTP1*. Тази корелация не е необичайна тъй като стареенето е многостранен процес, характеризиращ се с генетични и епигенетични промени в генома. Епигенетичните механизми са главни фактори, водещи до промени в геномната структура и функции, съпътстващи стареенето [45]. Все още не е ясно дали промоторното хиперметиране на *HIST1H4K* в простатната жлеза предразполага стареещите клетки към неопластична трансформация. За да се отговори на този въпрос е необходимо изследването на по-голяма кохорта и пациентите с ДПХ показали *HIST1H4K* промоторно хиперметиране, които да се проследяват, за да се определи дали ще развият рак след проведената

първа биопсия. Ще бъде полезно и включването в анализа на пациенти с високо стадийна простатна интерепителиална хиперплазия.

### **5.3.3. Обсъждане на резултатите получени за *RASSF2***

Подбрахме *RASSF2*, сходно на *HIST1H4K*, тъй като представлява потенциален диагностичен биомаркер при РП [38]. *RASSF2* кодира член на *RASSF1* семейството на RAS ефекторите, които негативно инхибират K-ras индуцираната онкогенетична трансформация [46]. Разглежда се като потенциален туморсупресорен ген. Може да иницира апоптоза и стопиране на клетъчния цикъл.

*RASSF2* не показва промоторно метилиране в урина на включените пациенти с РП, контроли с ДПХ и МАМ. За разлика от нашето изследване това на Рауне и съавтори открива метилиране в 37% от МАМ, 82% от мъжете с негативна биопсия и 59% от пациентите с РП. Това противоречие в получените резултатите може да се дължи на популационни различия, на различните използвани методи за анализ (Рауне и съавтори използват за анализ HeavyMethyl технологията). Рауне и съавтори получават много висока площ на кривата при анализа на ROC кривите при използването на промоторното хиперметиране на *RASSF2* в урина за разграничаване на пациентите с рак от МАМ [38]. По-ниска площ (0.66) получават при разграничаването на пациентите от контролите с негативни биопсии. Авторите не коментират причината за по-високия процент промоторно хиперметиране на *RASSF2* при контролите с негативна биопсия в сравнение с пациентите с РП. Очаква се метилирането на този биомаркер да е с по-висока честота при пациентите, тъй като представлява потенциален туморсупресорен ген. По голяма разлика между метилирането се наблюдава между МАМ и контролите с негативна биопсия, отколкото между пациентите с рак и контролите. На основа на наблюденията в настоящото изследване този биомаркер не се потвърди като надежден диагностичен или прогностичен биомаркер.

### **5.4. Обсъждане на резултатите получени от експресионния анализ на *GSTP1*, *PSA*, *PCA3*, *AMACR* и *GOLPH2 (GOLM1)* в урина на пациенти с РП и контроли**

В анализа на ROC кривите нивата на експресия на *PSA (KLK3)* в урина не показаха достатъчно добро разграничаване на пациентите от контролите ( $AUC=0.694$ ) с чувствителност от 61.11% и специфичност от 72.7%. За разлика от експресионните нива на *PSA* в урина, серумните нива на *PSA* дадоха по-точно разграничаване на пациентите от контролите ( $AUC=0.767$ ) и с по-висока чувствителност 76.9%, малко по-ниска специфичност- 60%, но при използване на гранична стойност от 8.9 ng/ml.

За разлика от нивата на *PSA* в урина и серум тези на *PCA3* показаха по-надеждно разграничаване на пациентите от контролите. Стойността за  $AUC$  (0.778) е близка до тази получена за *PCA3* score (0.787) в други проучвания, показващи че този биомаркер е по-добър от *PSA*, от съотношението free (свободен) *PSA*-total *PSA* и *PSA* плътността ( $AUC=0.564$ , 0.594 и 0.684 съответно). Открита е и корелация между *PCA3* score и агресивността на заболяването-вероятността за развитие на метастази и туморния обем при радикална простатектомия [47, 48]. Друго предимство на *PCA3* score е, че той не се повлиява от възрастта, наличието на простатит и от 5- $\alpha$ -редуктазни инхибитори [49]. Като цяло в различните проучвания  $AUC$  за този биомаркер варира от 0.72 до 0.87 [50-52]).

Експресията на *AMACR* в нашето проучване показва по-добра диагностична точност ( $AUC=0.728$ ) от *PSA* в урина, но не и от *PSA* нивата в серум. Получената площ под кривата за *AMACR* е по-висока от получената от Оуанг и съавтори ( $AUC=0.65$ ), но за разлика от тях стойностите за специфичност и чувствителност са по-ниски (61.11% чувствителност спрямо 70% и 69.23% специфичност спрямо 71%) и диагностичната точност на този биомаркер не надминава тази на *PSA* в серум [53].

В нашето проучване *GSTP1*, като експресионен биомаркер в урина, не се оказа надежден в разграничаването на пациентите от контролите. Такива резултатите получихме и за промоторното хиперметиране. Понижена експресия *GSTP1* беше наблюдавана само в 11.11% от пациентите, а в 50% експресията бе без значима промяна спрямо контролите. Получените резултати могат да се обяснят с наличието на промоторно хиперметиране в голям процент от контролите с ДПХ. Това предположение бе потвърдено с изследване на ДНК промоторното хиперметиране в част от анализирания пациенти и контроли. От 13-те контроли включени в експресионния анализ 11 са изследвани и за промоторно хиперметиране на *GSTP1*. От тези 11 контроли 3 имат неметиран промоторни области и 9 имат метилации. Друго възможно обяснение е изолираната РНК от пробите-урина да е не само от простатни клетки, но и от други епителни клетки, които нямат понижено експресия на *GSTP1* поради промоторно хиперметиране.

Експресията на *GOLPH2* показва по-добро разграничаване на пациентите от контролите в сравнение с експресията на *GSTP1*, но е по-малко надежден от PSA в серум и урина, както и от *PCA3* и *AMACR*. За разлика от проучванията на Varambally [54] и Laxman [55] *GOLPH2* не надминава диагностичната точност на серумните нива на PSA в нашето проучване. Това може да се дължи на много ниските стойности на AUC за серумните стойности на PSA докладвани от тези два авторски колектива (0.495 при Varambally и 0.508 при Laxman), различаващи се от публикуваните стойности в повечето проучвания.

В нашето проучване най-надежден от изследваните биомаркери в разграничаването на пациентите от контролите се оказва *PCA3*, което е в съгласие с литературните данни [50-52, 56].

Съществуват проучвания, които откриват по-високи стойности на AUC и по-добри специфичност и чувствителност при комбинация на няколко маркера в сравнение с използването единствено на *PCA3* [55]. По тази причина проведохме мултимаркерен анализ на ROC кривите, в който не включихме *GSTP1*, тъй като той показва най-ниска диагностична точност, както като експресионен биомаркер, така и като промоторно хиперметиран биомаркер в урина. Комбинирането на биомаркери в нашето проучване доведе до подобряване на AUC, чувствителността и специфичността в разграничаването на пациентите и контролите в сравнение с използването на *PCA3* биомаркера сам по себе си.

Площта под кривата (AUC), която получихме при комбинирането на *PSA*, *PCA3* и *AMACR* е 0.823 и тази стойност показва добра диагностична точност, и е по-висока в сравнение с получените при комбинирането на *PCA3*, *SPINK1*, *GOLPH2*, *TMPRSS2-ERG* (AUC=0.758) в изследването на Laxman и съавтори [55] и при комбинирането на *PSMA*, *PCA3* и *PSGR* (AUC=0.74) в изследването на Rigau и съавтори [57].

Най-добрата комбинация между два биомаркера в нашето проучване е между *PCA3* и *AMACR* с чувствителност от 77.8% и специфичност от 75%. Ouyang и съавтори получават малко по-високи стойности за чувствителност и специфичност при комбинирането на тези два биомаркера в урина: 81% и 84% съответно. Това може да се обясни с различните методи за анализ на нивата на експресия [53]. Комбинирането на *PCA3*, *AMACR* и *GOLM1* доведе до получаването на най-голямата площ под кривата (AUC=0.836), но резултатът не достига статистическа значимост ( $p=0.06$ ). Необходимо е изследването на по-голям брой пациенти и контроли, за да се определи диагностичната точност на тази комбинация от три биомаркера. Комбинирането на 4 от изследваните биомаркери в урина (без *GSTP1*) също води до по-добро разграничаване на пациентите от контролите в сравнение с използването им поотделно или в сравнение със серумните нива на PSA. Резултатът достига статистическа значимост, но получената площ под кривата (AUC=0.795) е по-малка в сравнение с получените за останалите комбинирани вече комбинации от биомаркери. Тази комбинация от 4 биомаркери в урина обаче има по-добра диагностична точност от намерената от Laxman и съавтори [55].

### **5.5. Обсъждане на резултатите получени от експресионния анализ на let-7c, miR-30c, miR-141 и miR-375 в плазма на пациенти с РП и контроли**

В настоящото изследване анализирахме експресионните нива на miR-141, miR-375, let-7c и miR-30c в плазма на пациенти с РП и контроли, състоящи се от мъже с ДПХ и МАМ с цел да определим диагностичната и прогностичната точност при български пациенти. Тези микроРНК-и интензивно се изследват и тяхната експресия корелира с развитието на РП, метастазите и други клиникопатологични характеристики [58-61], но все още е необходимо провеждането на валидиращи проучвания в плазма и серум.

В нашето изследване нивата на miR-141 са сходни в пациентите и МАМ, в съгласие с получените резултати в други проучвания [61, 62], но за разлика от намереното от Mitchell и съавтори [58]. Несъответствията между проучванията може да се дължат на различната концентрация и съдържание на микроРНК-и в плазма и серум, различните използвани методи за анализ (например включване на пре-амплификационна стъпка между обратната транскрипция и PCR в реално време за увеличаване на количеството на микроРНК-ите с ниска концентрация) и размера на изследваните групи от пациенти и контроли. Друго възможно обяснение е, че Mitchell и съавтори сравняват нивата на микроРНК-ите между пациенти с РП и метастази и здрави контроли. Ние не успяхме да намерим корелация на miR-141 с развитието на метастази, тъй като бяха анализирани много малък брой такива пациенти в нашата извадка. Не намерихме и корелация с други клиникопатологични характеристики (Gleason score, туморен стадий, засягане на лимфните метастази), вероятно поради малката изследвана група и ниските нива на тази микроРНК в плазма. Анализът на ROC кривите доказа, че нивата на miR-141 не могат надеждно да разграничат пациентите от ДПХ контролите и МАМ.

Нивата на експресия на miR-375 са сравнявани между различни групи пациенти с РП или между пациенти с кастрационно резистентни простатни тумори с метастази (мКРРП) и здрави контроли и е потвърдено, че циркулиращите нива на miR-375 са повишени в пациенти с мКРРП в сравнение със здрави контроли или пациенти с локализиран РП [60, 63-65]. В проведеното изследване ние сравнихме експресионните нива на тази микроРНК в пациенти и две групи контроли (ДПХ и МАМ). Открихме статистически значимо понижена експресия на miR-375 в 83.05% от пациентите в сравнение с контролите. В сравнение с МАМ, 45.76% от пациентите показаха намалена експресия. Несъответствието между получените от нас резултати и докладваните от други изследователи е възможно да се дължи на размера и състава на изследваните групи. В нашето проучване са включени само двама с далечни и 6 с лимфни метастази. Експресията на miR-375 е открито, че е понижена и при други малигнени заболявания [66-74]. Анализът на ROC кривите в нашето проучване показва, че понижената експресия на miR-375 в плазма представлява най-надеждния и точен диагностичен биомаркер и може да разграничи пациентите с РП от контролите с висока чувствителност и специфичност. Експресионните нива на miR-375 в плазма могат да бъдат използвани не само като прогностичен, но и като диагностичен биомаркер, въпреки че не открихме статистически значима корелация на miR-375 с клиникопатологичните характеристики.

Наблюдаваната понижена експресия на miR-375 може да бъде обяснена не само с малкия брой пациенти с далечни метастази и позитивни лимфни възли, но също така с вероятното присъствие на други съпътстващи заболявания като диабет, простатитис, различни патофизиологични процеси, андроген изчерпваща терапия.

Другите две изследвани микроРНК са let-7c и miR-30c. В съгласие с други проучвания let-7c и miR-30 са с понижена експресия в голяма част от пациентите в сравнение с ДПХ контролите използвани за калибратори. Но когато МАМ бяха използвани като калибратори, пациентите с РП се разпределят по равно в групи според експресията си (понижена, повишена и без промяна). По тази причина, когато използваме МАМ като калибратори в ROC анализа за всички изследвани микроРНК-и включвахме и ДПХ контролите с цел да определи дали разграничаването между пациентите с РП спрямо ДПХ контролите и МАМ ще се подобри. Анализът на ROC кривите

показа, че когато ДПХ пробите бяха използвани като калибратори, let-7c нивата в плазма имат потенциал да се използват като диагностичен биомаркер за разграничаване на пациентите с РП от ДПХ контролите с AUC- 0.757 и чувствителност от 75% и специфичност от 61%. Специфичността бе по-висока, а чувствителността сходна на тази получена при анализа на ROC кривите на PSA. Сходна площ под кривата (AUC-0.784) за let-7c е получена от Chen и съавтори [75]. Когато МАМ бяха използвани като калибратори в анализа на ROC кривите за разграничаване на пациентите от контролите с ДПХ бе наблюдавана по-малка площ на кривата AUC (0.626). Chen и съавтори получават по-голяма площ (AUC-0.775), но тяхната група от здрави контроли се състои от възрастни мъже без ДПХ и със средна възраст от 72 години. Те също така са анализирали по-голяма извадка, което също може да е причина за по-малката получена площ под кривата при анализа на ROC кривите. Нито let-7c, нито miR-30c показаха корелация с клиникопатологичните характеристики на заболяването.

Няколко проучвания показват, че мониторингът на PSA стойностите може да се използва за оценка на риска за развитие на агресивен рак (напреднал туморен стадий, висок Gleason score и метастази) при пациенти с РП [76-80]. PSA нивата заедно с Gleason score и туморния стадий се използват, за да се изчисли риска за развитие на агресивен простатен карцином, за появата на биохимичен рецидив след радикална простатектомия в различни класификатори като D'Amico, CAPRA score [81, 82]. В съответствие с проучванията, които показват корелация на PSA с клиникопатологичните характеристики, открихме статистически значима корелация на PSA с Gleason score, туморния стадий и наличието на лимфни метастази със следните коефициенти на Spearman: 0.612 ( $p=5.31 \times 10^{-7}$ ); 0.576 ( $p=4.21 \times 10^{-6}$ ) и 0.458 ( $p=4.34 \times 10^{-4}$ ). PSA нивата при диагностицирането предсказват наличието на лимфни метастази с 100% чувствителност и 90% специфичност, когато 27.1 ng/ml се използва за гранична стойност.

Анализът на ROC кривите бе използван и за да се оцени диагностичната стойност на комбинациите от изследваните микроРНК-и и PSA. По-висока диагностична стойност бе наблюдавана, когато комбинирахме микроРНК-ите с или без PSA. Най-добро разграничаване между пациентите с РП и двете групи контроли с 86.8% чувствителност и 81.8% специфичност се получи, когато бяха комбинирани всички биомаркери и МАМ бяха използвани като калибратори. Получената площ под кривата бе 0.877. Когато ДПХ пробите бяха използвани като калибратори, то няколко комбинации от изследваните биомаркери могат по-надеждно да разграничат групите в сравнение с използването на биомаркерите поотделно. Когато всички 4 микроРНК-и се комбинират AUC е 0.781 и пациентите се разграничават от контролите с ДПХ с 81.4% чувствителност и 81.2% специфичност. Друга надеждна комбинация е между miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA с AUC-0.836 и чувствителност от 94.5% и специфичност от 66.7%.

В заключение тези панели, състоящи се от микроРНК и серумен PSA имат предимство пред използването на микроРНК-ите или PSA самостоятелно тъй като различните микроРНК имат променена експресия в различните субтипове на рака и PSA не е специфичен за наличието на рак.

## **5.6. Обсъждане на резултатите от микроРНК експресионното профилиране чрез микрочипове в туморни и нормални простатни тъкани**

### **5.6.1. Обсъждане на микроРНК-ите, показали диференциална промяна**

В нашето проучване установихме, че по-голям брой от микроРНК-ите с установена промяна са с повишена експресия (28 на брой), отколкото с понижена (14 на брой), което противоречи на първоначалните резултати за РП [83-85], но е в съгласие с няколко скорошни проучвания [86-88]. В допълнение, в отделните изследвания са анализирани различен набор от микроРНК-и чрез различни платформи. Това може да е вероятна причина за противоречивите резултати.

Изследвахме експресията на микроРНК-ите в **туморни тъкани от радикални простатектомии** тъй като по този начин може да се осигури достатъчно туморна тъкан и висок добив на РНК необходим за провеждането на микрочипов анализ. Сравнявахме експресията на

микроРНК-ите в туморните тъкани спрямо **нормални простатни тъкани от биопсии на контроли с ДПХ**. Използвахме така подобрени нормални тъкани по две причини: 1) в клиничната практика е необходимо разграничаване на пациентите с рак от тези с ДПХ, а не диференциране на туморни и нормални тъкани в едни и същи пациенти и 2) възможно е възникване на промени в експресията на микроРНК в строма и нормални тъкани в близост до туморни. Сходен дизайн на експеримента е използван и в други проучвания [84, 89].

Установените микроРНК-и с повишена експресия в изследваните от нас простатни тумори показват промяна от 3 до 172 пъти като повечето са с над 17 пъти промяна. По-голяма част от микроРНК-ите с понижена експресия показват от 2 до 9 пъти промяна, а 3 от тях над 80 пъти намалена експресия. **До този момент в изследванията на микроРНК профилите при РП чрез микрочипове не е докладвана толкова значителна промяна в експресията.** Степента на промяна на микроРНК-ите с повишена експресия в проучванията варира в границите 1.5 до 6.36 [86, 87, 90]. Аналогично, степента на промяна на тези с понижена, варира между 1.5 – 3 в литературата. Само в проучването на He и съавтори се докладва промяна в експресията 58.96 пъти за една микроРНК с понижена експресия [90].

**Част от установените микроРНК с променена експресия са докладвани и в други проучвания на РП.** От 28-те микроРНК с увеличена експресия, 7 са докладвани в литературата и са показали асоциация с РП и това са: miR-17\*, miR-194, miR-126\*, miR-299-5p, miR-381, miR-186, miR-582-5p. От 14-те микроРНК с понижена експресия, 7 са докладвани: miR-634, miR-1234, miR-144, miR-486-5p, miR-484, miR-494 и miR-196.

**За някои от тези микроРНК-и получените от нас резултати са в съгласие с тези получени от други изследователи като например: miR-17\* [91], miR-194 [92, 93], miR-126\* (miR-126-5p) [94, 95], miR-582-5p [96,] от показали повишена експресия и miR-634 [97], miR-1234 [98], miR-486-5p [95], miR-484 [98], miR-494 [99], от показали понижена експресия.**

Някои от микроРНК-ите показали повишена експресия в нашето проучване, но не докладвани до този момент в литературата за връзка с РП, са потенциални онкогени тъй като са показали повишена експресия при други онкологични заболявания. Потенциални туморсупресорни микроРНК-и, показали намалена експресия в текущото проучване са miR-144 и miR-215. Те са с установена понижена експресия при други тумори.

Има редица проучвания за ролята на микроРНК-ите за развитието на РП. Част от докладваните микроРНК-и са показали променена експресия в единични изследвания и не са валидирани до този момент. За други съществуват противоречиви резултати. Изследователите, осъществяващи широко мащабно микроРНК експресионно профилиране чрез микрочипове, PCR-чипове или чрез новогенерационно секвениране докладват различен набор от микроРНК с променена експресия. Наблюдава се припокриване само за единични микроРНК-и. Всичко това показва, че са необходими още проучвания, а причините за вариациите в резултатите се дължат на различните методи за съхранение и процесирание на използваните биологичните материали, различните платформи и методи използвани за анализ на експресията, различните начини за нормализация на резултатите и ниската статистическа сила на извадките при някои проучвания. В допълнение, съществуват различия и в дизайна на самите проучвания.

### **5.6.2. Обсъждане на повлияните гени и клетъчни пътища**

Проведеният онтологичен анализ показва, че най-много гени (mRNA) повлияни от микроРНК-ите с диференциална експресия участват на първо място в генната експресия, а след това в апоптозата, клетъчната пролиферация и клетъчния отговор към растежни фактори и ДНК, увреждащи стимули и др. Карциногенезата се иницира и съпътства от промяна в генната експресия. Вследствие на променената експресия се модулират важни клетъчни процеси, необходими за оцеляването на раковите клетки. Tang и съавтори използват данните от анализирани 4 miRNA микрочипове при РП, за да установят клетъчните пътища, които са повлияни от диференциално експресираните микроРНК-и. Те взимат под внимание хетерогенността на

простатните тумори и използват различни статистически методи. Сходно на нашето проучване те откриват, че най-много гени имат GO термини свързани с транскрипцията (генната експресия) и нейната регулация [100].

Сигналните пътища най-силно повлияни от участници в тях с променена експресия са MAPK сигналния път; пътищата, регулиращи апоптозата; клетъчната адхезия; клетъчния цикъл; ДНК поправката; Wnt сигналния път; EGF-EGFR сигналния път; p53 сигналния път; NOTCH сигналния път и други. В един метаанализ на данните от експресионното профилиране на гени (mRNA) чрез микрочипове се установяват няколко клетъчни пътища асоциирани с простатната карциногенеза. Голяма част от пътищата докладвани в този метаанализ са силно засегнати вследствие действието на микроРНК-ите и в текущото проучване [101]. Продължават да се откриват и нови пътища засегнати при простатната карциногенеза. РП е хетерогенен и по тази причина в отделните проучвания се установяват различни повлияни пътища, като е затруднено определянето на най-важните и най-силно засегнатите. Част от установените пътища се докладват в няколко проучвания докато други са установени само в единични изследвания. За да се разбере молекулната основа на РП, е необходимо натрупването на още данни и тяхното коректно анализиране.

#### 5.6.2.1. MAPK сигнален път

Митоген активираните протеин кинази (MAPK) сигнални пътища са еволюционно консервативни сред еукариотите и е установено че играят роля в набор от биологични процеси, включващи клетъчния растеж, диференциация, апоптоза, възпаление и отговор на клетката към стресови стимули [102].

Участниците в този път, които са свързани със спиране на клетъчния цикъл и водещи до апоптоза като *NF1*, *NLK*, *ATF2* са повлияни от микроРНК-и с повишена експресия, тоест тези участници са инхибирани. Позитивно са повлияни участници, които повишават клетъчната пролиферация и възпалителните процеси като *MRAS*, *MAP3K1*.

Най-много микроРНК-и регулират *NF1*, който е важен туморсупресор и мутации в него водят до доминантното генетично заболяване неврофиброматоза тип 1. Мутации или делеции в този ген обаче са открити и при множество онкологични заболявания като рака на гърдата [103], рака на белия дроб [104], глиобластома [105] и др. При РП този ген е много рядко мутирал (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), но е възможно експресията му да е понижена в изследваните простатни тумори вследствие на действието на микроРНК-ите с повишена експресия. *NF1* предпазва от клетъчен свръхрастеж чрез регулация на RAS белтъците, които стимулират клетъчния растеж и делене.

#### 5.6.2.2. Сигнални пътища свързани с апоптоза

В резултат на диференциално експресираните микроРНК-и апоптозата се инхибира тъй като се нарушава баланса между про-апоптотичните белтъци и анти-апоптотичните белтъци, редуцира се каспазната активност и се повлияват сигнални пътища свързани с апоптозата. Модулиран е и отговора на клетката към стресови сигнали. От каспазите е инхибирана *CASP11*. Повишена е експресията на инхибитора на апоптозата сървивин (*BIRC5*). Потиснат е външния път на апоптозата чрез инхибиране на Death рецептора *FAS* и неговия лиганд *FASL*, а така също някои от активаторите на апоптозата: *APAF1*, *ARHAGP10*. Инхибирана е и експресията на *DCC*, който индуцира алтернативен път на клетъчна смърт. С понижена експресия е и *TP53*, главен туморсупресорен ген, чиято основна функция е да индуцира апоптозата. Модулатори на отговора на клетката към стресови стимули повлияни от микроРНК-ите са например *GADD45A* и *IL1A*.

#### 5.6.2.3. Wnt сигнален път

Wnt сигналният път регулира ембрионалния растеж, определя клетъчната съдба, регулира пролиферацията, полярността и миграцията. Също така участва в поддържането на популациите на стволовите клетки. Силно консервативен път от червеи до бозайници.

Действието на микроРНК-ите активира пътя тъй като позитивно е повлияна експресията на няколко Wnt лиганди (*WNT4*, *WNT6*, *WN5B*) и един от техните рецептори (*FZD2*), а са инхибирани някои туморсупресорни гени като *PPP2R5E*, *PKD1*. Експресията на *RACGAP1* вероятно е повишена, а този ген е потенциален онкоген. Вследствие на активирането на този път се увеличава пролиферацията и се инхибират апоптотичните сигнали [106, 107].

#### 5.6.2.4. Клетъчен цикъл

Клетките, които прогресират през клетъчния цикъл без да преминават през контролните пунктове формират малигнени тумори. По тази причина нарушената регулация на клетъчния цикъл е важна стъпка в карциногенезата [108]

Действието на диференциално експресирани микроРНК води до преодоляване на контролните пунктове. Инхибирани са важни участници в контрола на клетъчния цикъл като *BUB3*, *MAD2*, *PTTG1* и *Emi1*, които играят роля във формирането на делителното вретено, в разделянето на сестринските хроматиди и правилното навлизане в митоза.

#### 5.6.2.5. TGF- $\beta$ сигнален път

В епителните клетки TGF- $\beta$  функционира като туморсупресор тъй като инхибира пролиферацията, индуцира апоптоза и медира диференциацията. В друг контекст обаче TGF- $\beta$  може да иницира туморната прогресия чрез повишаване на инвазивността и метастатичния потенциал. По тази причина TGF- $\beta$  има противоположна роля и вероятно това зависи отчасти от стадия, в който се намира тумора [109].

Според ефекта, който упражняват микроРНК-ите показали диференциална експресия предполагаме, че TGF- $\beta$  сигналният път е инхибиран. С понижена експресия са както един от цитокините (*TGFB2*), два от рецепторите (*TGFBR1*, *TGFBR3*), така и белтъците, участващи в предаването на сигнала и регулацията на експресията (*SMAD1*, *SMAD9*). От всички компоненти на TGF- $\beta$  сигналния път е установено, че *TGFBR3* е най-често засегнат и е с понижена експресия при РП. При изключване на експресията на този ген се иницира фокусна формация и увеличена експресия на *CD133*, който е маркер открит при простатни ракови стволови клетки [110].

#### 5.6.2.6. NOTCH сигнален път

NOTCH сигналният път играе ключова роля за нормалното развитие на множество тъкани и клетъчни типове чрез повлияване на диференциацията, оцеляването, пролиферацията, които силно зависят от силата на сигнала и клетъчния контекст [111]. Елементи от NOTCH сигналния път играят важна роля за развитието на РП и неговата прогресия като онкогени и туморсупресори [112].

Повлияни участници в NOTCH сигналния път, които имат потенциална връзка с карциногенезата са *FURIN* и *CIR*, с вероятна повишена експресия, и *HEY1*, с вероятна намалена експресия.

#### 5.6.2.7. Toll-like receptor сигнален път

Toll-like рецепторите (TLR) основно се експресират от имунните клетки като дендритните, макрофагите и НК клетките. Експресията на TLR в тези клетки води до активирането на вродения имунитет и в резултат се секретират про-възпалителни цитокини, хемокини, адхезионни молекули, с които се подпомага адаптивния имунен отговор. Съществуват доказателства, че TLR също се експресират от туморните клетки. Активирането на тези рецептори в туморните клетки и в туморната среда е „нож с две остриета” в туморната прогресия [113].

Мишена на показаните повишена експресия микроРНК-и е *TLR4*. Най-вероятно неговата експресия е понижена в изследваните простатни туморни тъкани, но ефекта върху туморогенезата не може да се тълкува категорично. Експресията на *TLR4* от простатните ракови клетки може да подпомогне туморния растеж, но в същото време може да го инхибира.

#### 5.6.2.8. Поправка на ДНК повреди

Установено е, че ДНК мутации възникват спонтанно около 20 000- 40 000 пъти всеки ден [114]. По тази причина съществуват различни пътища за поправка на ДНК. Дефекти в тези пътища може да доведат до увеличаване на мутациите, до геномна нестабилност и до развитието на рак включително и РП. МикроРНК-ите показали диференциална експресия повлияват както MMR, така и BER репарационните системи, тъй като инхибират експресията на *MSH2*, *TDG*, *LIG3*, *NTHL1* (*NTH1*; *OCTS3*).

#### 5.6.2.9. p53 сигнален път

p53 сигналният път е един от най-силно засегнатите в карциногенезата на туморите [115].

Около 25-30% от простатните тумори имат мутации в *TP53*, но като цяло мутациите в този ген са по-късни събития в простатната карциногенеза [116, 117]. Въпреки че в началните етапи на простатната туморогенеза може да няма мутации в *TP53*, които да го инактивират, то може той да бъде регулиран епигенетично от микроРНК-ите. В изследваните в текущото проучване простатни тумори най-вероятно експресията на този важен туморсупресор е намалена. p53 взаимодейства и регулира активността на редица други важни тумор супресорни ген и по тази причина намалената му експресия би имала големи последствия.

#### 5.6.2.10. Аспаргин- N- свързано гликозилиране

Установено е, че промени в гликозилирането са една от характеристиките на малигнената трансформация и туморната прогресия. Ембрионалното развитие, както и активирането на раковите клетки се съпровождат с промени в гликозилирането. Туморните клетки се характеризират с повишаване на нивата на гликопептидите [118].

Участници в гликозилирането и мишени на микроРНК-ите с намалена експресия са *DOLPP1* и *MGAT3*. *DOLPP1* е долихол пирофосфат фосфатаза, а *MGAT3* е манозил (бета-1,4)-гликопротеин. Тези ензими са необходими за поддържането на оптимални нива на долихол свързани олигозахариди [118] и вероятно в изследваните простатни тумори те са с повишена експресия.

При РП е установено, че гликоформи на PSA са повишени в простатни тумори и техните нива корелират с туморната агресивност [119]

#### 5.6.2.11. Поддържане на теломерите

Повечето туморни клетки експресират теломеразата и имат стабилна дължина на теломерите [120].

Експресията на *TERT* в изследваните простатни тумори вероятно се повлиява и от някои микроРНК-и показали понижена експресия. Присъствието на *TERT* е задължително за аномалната клетъчна пролиферация и обезсмъртяване на повечето тумори (>85%) [121]. При простатни тумори е установено, че *TERT* има повишена експресия и ядрена локализация в началните етапи, но при прогресията на заболяването към по-висок туморен стадий *TERT* се локализира в цитоплазмата [122]. Предполага се, че в цитоплазмата теломеразата предпазва митохондриите от оксидативен стрес [123] и спомага за оцеляването на клетките при състояния на хипоксия [124].

#### 5.6.2.12. EGF-EGFR сигнален път

EGF-EGFR сигналният път е важен за карциногенезата на различни видове солидни тумори, включително и РП [125]. Повишена експресия на EGFR и ErbB2 се асоциира с по-агресивно клинично поведение на туморите и корелира с лоша прогноза [126, 127]. Около 40-80% от простатните тумори експресират високи нива на EGFR [128].

Гени, участващи в EGF-EGFR сигналния път и които се регулират от микроРНК-ите показали диференциална експресия са следните: *AB11* (*SSH3BP1*), *BCAR1* и *MAP3K1*.

AB11 играе ролята на онкоген в развитието на левкемия и рак на гърдата. Противоположна роля играе при рака на стомаха и РП, тъй като при тях се наблюдава понижена експресия [129].

Предполагамата повишена експресия на *BCAR1* също е логична тъй като това е наблюдавано в простатни тумори. Установено е, че експресията на този ген корелира с висок Gleason score и с риска за развитие на рецидиви след радикална простатектомия [130, 131]. Експресията на *BCAR1* показва и обратно пропорционална зависимост със загуба на хетерозиготност на 16q23 и се асоциира с повишени нива на EGFR и негативна експресия на KAI1 [130].

#### 5.6.2.13. ID сигнален път

Има нарастващи доказателства, че Id белтъците са жизнено важни пролиферативни фактори за различни клетъчни типове. Голям брой изследвания откриват промяна в експресията на Id белтъците при различни човешки тумори [132]. От този път регулирани от микроРНК-ите показали диференциална експресия са *ID4*, *SREBP1* и *PAX5*.

*ID4* действа директно като туморсупресор чрез повлияване на йерархията на клетъчните процеси на множество нива, което води до понижаване на пролиферацията и промяна в морфологията вероятно медирано от индукцията на инхибирани туморсупресори [133]. Това е в съгласие с получените от нас резултати.

*SREBP1* се регулира от микроРНК-ите с понижена експресия и е с предполагаема повишена експресия в изследваните простатни тумори. Установено е, че свърексресията на този ген сама по себе си е достатъчна да повиши туморогенността и инвазивността на простатни ракови клетки, а инхибирането му намалява *de novo* синтезата на мастни киселини и предизвиква инхибиране на туморния растеж и индукция на апоптоза [134].

*PAX5* е необходим за правилното развитие на В клетките и е открито, че е с повишена експресия при левкемия, дребноклетъчен рак на белия дроб, рак на устата, рак на гърдата, рак на пикочния мехур, което показва че той е онкоген [135-139]. Няма достатъчно проучвания за експресията на този ген при РП. Agostinelli и съавтори показват, че 4 от 21 от изследваните простатни тумори имат повишена експресия на *PAX5*. Ролята на този ген престои да се изясни за развитието на РП.

#### 5.6.2.14. Енергиен метаболизъм

Една от основните характеристики на раковите клетки е промяна на метаболизма [140]. Метаболитните промени, подпомагащи усилен растеж и задоволяващи високите енергийни нужди са важни за туморната прогресия. Установено е, че туморите имат завишен глюкозен метаболизъм, но също така се наблюдават промени в метаболизма на аминокиселини и липиди [141-143].

При РП са установени генетични и епигенетични промени, засягащи метаболитните пътища [144-147].

Част от гените, участващи в липидния и глюкозния метаболизъм са засегнати от микроРНК-ите показали диференциална експресия. Като цяло, най-вероятният ефект от действието на микроРНК-ите е повишаване на глюкозния метаболизъм, което е нормално за раковите клетки, инхибиране на електрон транспортната верига, тъй като АТФ в раковите клетки се синтезира основно в цитоплазмата, усилване на триацилглицерол биосинтезата.

Някои от засегнатите гени са: *SLC25A4*, *ATP5J*, *ATP5G2*, *COX5A*, *COX7B*, *COX11*, регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия и гените *MDH2*, *PGAM2*, *SREBP1* регулирани от микроРНК-ите с намалена експресия.

#### 5.6.2.15. Отговор към оксидативен стрес

Оксидативният стрес участва в различни физиологични и патологични процеси, включително ДНК увреждане, пролиферация, клетъчна адхезия и оцеляване. Има доказателства, че играе роля и в карциногенезата. Реактивните кислородни видове (ROS) водят до натрупване на повреди в ДНК, което от своя страна може да задейства сигнална трансдукция, водеща до стопиране на клетъчния цикъл или индукция на транскрипция, геномна нестабилност и развитие на рак [148].

Гените, участващи в отговора към оксидативен стрес и регулирани от микроРНК-ите с променена експресия са *TXN2*, *MTIX*, *UGT1A6* и други UDP- глюкозоилтрансферази.

#### 5.6.2.16. Клетъчна адхезия

Клетъчната адхезия осигурява директна връзка между извънклетъчния матрикс и актиновия цитоскелет. Отслабената клетъчна адхезия води до модулиране на клетъчната подвижност, пролиферация и апоптоза и осигурява молекулната основа за възникване на хистопатологични промени в простатната туморогенеза. При РП е установено, че голяма част от интегрините, колагените, кавеолините и други, участващи в клетъчната адхезия са с понижена експресия. В съгласие с литературните данни с предполагаема понижена експресия вследствие на действието на микроРНК-ите с установена повишена експресия, са интегрините *ITGA2*, *ITGA9*, *ITGB8*, *ITGAM*, два типа колагени *COL4A6*, *COL4A1*, а така също *CAV2*, *MET* и други.

#### 5.6.3. Обсъждане на резултатите от PCA и клъстерния анализ

Проведеният анализ на основните компоненти (Principal Component Analysis, PCA) показва добро разграничаване на туморните от нормалните простатни тъкани въз основа на микроРНК експресионните профили. Пет от 19-те туморни тъкани обаче не се разделят ясно от групата на нормалните тъкани и по тази причина те бяха изключени от последващите анализи за откриване на диференциално експресираните микроРНК-и. Сходно на нашето проучване и други изследователски групи наблюдават диференциране (агрегиране) на туморните и нормалните проби, но и не съвсем категорично разграничаване. В проучванията на Schaefer и Wach се наблюдават не само преминаване на туморни проби към нормалните, каквото и ние наблюдавахме, но и преминаване на нормални проби към туморните [86, 87]. Точната причина за попадането на част от изследваните туморни проби в близост до групата на нормалните тъкани не може да бъде установена. Възможно обяснение е наличие на по-голям процент нормална тъкан или строма в тях. След изключването на туморните проби, които не се отделят от нормалните се получи много добро разграничаване на двете групи. По тази причина и в клъстерния анализ не бе наблюдавано смесване на нормалните и туморните проби сходно на He и съавтори [90]. Те включват обаче 4 туморни тъкани и съответните им нормални тъкани от общо 20 изследвани тъканни двойки. За разлика от тях ние включихме 14-те туморни проби и всички нормални проби (14 на брой). При включването в клъстерния анализ на 27 от микроРНК-ите с повишена експресия и 5 от микроРНК-и с намалена експресия, детектирани в над 5 проби се получава още по-добро разграничаване на туморните от нормалните тъкани.

## 6. ИЗВОДИ

1. Полиморфните варианти rs6465657 (7q21, *LMTK2*), rs620861 (8q24), rs11603378 (11p15), rs10770125 (11p15), rs3842756 (11p15), rs55930300 (11p15), rs902774 (12q13), rs266849 (19q13, *KLK3*), rs2659056 (19q13, *KLK15*) не показаха статистически значима асоциация с РП или с клиникопатологичните характеристики (висок Gleason score, метастази) при български пациенти вероятно поради малката статистическа сила на проучването и малкия ефект, който те оказват върху предразположеността за развитие на заболяването.

2. Изследваните полиморфни варианти в гените *CYP1B1* и *AR*, участващи в андрогеновия метаболизъм, както и полиморфизма в *AMACR* не показаха статистически значима асоциация с РП при български пациенти, което може да се дължи на малкия им ефект върху развитието на заболяването и недостатъчната статистическа сила на проучването.

3. Потвърди се асоциацията на полиморфизмите rs1016343, rs7841060 и rs4871008 в 8q24 и на полиморфизма rs7920517 в 10q11 с РП при български пациенти като за пръв път бе наблюдавана асоциация на полиморфизмите в 8q24, както и на техни хаплотипни комбинации с риска за развитие на агресивни тумори, което трябва да се валидира в разширена извадка.

4. Полиморфизмът rs10993994 (10q11, *MSMB*) показва тенденция за асоциация с риска за развитие на лимфни метастази при български пациенти, което е в съгласие с литературните данни.

5. Потвърди се асоциацията на rs7127900 в 11p15 с риска за развитие на РП и се намери нов полиморфизъм - rs11564710 в този локус, който е по-силно асоцииран с РП като се свързва с два пъти повишен риск за развитие на заболяването.

6. Диагностичната и прогностичната роля на промоторно хиперметираните биомаркери *GSTP1*, *HIST1H4K* и *RASSF2* в урина при РП не бе валидирана, тъй като не открихме *RASSF2* промоторно хиперметиране при пациентите и контролите и наблюдавахме статистически значима корелация на метилирането на *GSTP1* и *HIST1H4K* с възрастта.

7. От изследваните експресионни биомаркери в урина *PCA3* и *AMACR* показаха най-надеждно разграничаване на пациентите с РП от контролите с ДПХ, което е в съгласие с литературните данни. Комбинирането им с *PSA* в урина показва по-добра диагностична точност от използването им поотделно, както и от серумните нива на *PSA*.

8. Установено бе, че нивата на miR-375 в плазма разграничават пациентите с РП от контролите с ДПХ с по-голяма диагностична точност от серумните нива на *PSA*, както и от нивата на експресия на *PCA3* в урина.

9. Комбинирането на изследваните микроРНК-и в плазма (*let-7c*, miR-30c, miR-141, miR-375) и серумните нива на *PSA* с по-добра диагностична точност разграничават пациентите с РП от контролите с ДПХ в сравнение с използването на биомаркерите поотделно или използването на комбинации от изследваните биомаркери в урина.

10. От проведения микроРНК микрочипов анализ се установиха 28 микроРНК-и с повишена и 14 микроРНК-и с понижена експресия в туморни простатни тъкани като от тях 28 са нови недокладвани до този момент в литературата за връзка с РП и представляват потенциални диагностични биомаркери.

11. Установените микроРНК-и с диференциална промяна в туморна спрямо нормална простатна тъкан имат потенциални онкогенни и туморсупресорни функции.

12. Клъстерният анализ показва, че 27 от микроРНК-ите с повишена експресия и 5 от микроРНК-ите с понижена експресия в туморни простатни тъкани най-надеждно разграничават пациентите от контролите и тези микроРНК-и могат да бъдат анализирани в последващи валидиращи проучвания.

## 7. ПРИНОСИ

### Научно фундаментални приноси

1. Открити са нови микроРНК-и с потенциални онкогенни и туморсупресорни функции с променена експресия в туморни простатни тъкани, представляващи интерес за валидиране в последващи проучвания.

2. Потвърдена е в разширена извадка от български пациенти асоциацията на локус на 11p15 хромозома с РП, открит при предходно геномно асоциативно изследване на консорциума PRACTICAL. Намерена е по-силна асоциация от първоначалната с нов полиморфизъм в региона, rs11564710 свързан с повишен риск за развитие на РП.

### Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е асоциацията на открити при големи геномни проучвания полиморфни варианти в хромозомните локуси 8q24 (rs1016343, rs4871008, rs7841060) и 10q11 (rs7920517) с РП при български пациенти.

### Научно приложни

1. Изследваните промоторно хиперметилирани гени в урина не са добри неинвазивни диагностични и прогностични биомаркери тъй като не се установи промоторно хиперметилиране на *RASSF2*, а това на *HIST1H4K* и *GSTP1* показва корелация с възрастта, а не с диагнозата при български пациенти.

2. За пръв път се открива, че експресионните нива на miR-375 в плазма са потенциален диагностичен биомаркер при РП, превъзхождащ серумните нива на PSA, както и изследваните експресионни нива на *AMACR* и *PCA3* в урина показали най-добра диагностична точност.

3. Комбинирането на изследваните микроРНК-и в плазма и серумните нива на PSA по-надежно разграничават пациентите с РП от контролите с доброкачествена простатна хиперплазия като превъзхождат комбинациите получени от изследваните биомаркери в урина и серумен PSA.

### Методични приноси

1. За пръв път са въведени и използвани MethyLight метода за анализ на промоторно хиперметилиране и микроРНК микрочипов анализ в България.

## 8. БИБЛИОГРАФИЯ

- [1] Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic acids research*. 2011 Jan;39(Database issue):D561-8.
- [2] Lange EM, Salinas CA, Zuhlke KA, Ray AM, Wang Y, Lu Y, et al. Early onset prostate cancer has a significant genetic component. *Prostate*. 2012 Feb 1;72(2):147-56.
- [3] Kote-Jarai Z, Easton DF, Stanford JL, Ostrander EA, Schleutker J, Ingles SA, et al. Multiple novel prostate cancer predisposition loci confirmed by an international study: the PRACTICAL Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Aug;17(8):2052-61.
- [4] Bao BY, Pao JB, Lin VC, Huang CN, Chang TY, Lan YH, et al. Individual and cumulative association of prostate cancer susceptibility variants with clinicopathologic characteristics of the disease. *Clin Chim Acta*. 2010 Sep 6;411(17-18):1232-7.
- [5] Gallagher DJ, Vijai J, Cronin AM, Bhatia J, Vickers AJ, Gaudet MM, et al. Susceptibility loci associated with prostate cancer progression and mortality. *Clin Cancer Res*. 2010 May 15;16(10):2819-32.
- [6] Shui IM, Lindstrom S, Kibel AS, Berndt SI, Campa D, Gerke T, et al. Prostate cancer (PCa) risk variants and risk of fatal PCa in the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *Eur Urol*. 2014 Jun;65(6):1069-75.
- [7] San Francisco IF, Rojas PA, Torres-Estay V, Smalley S, Cerda-Infante J, Montecinos VP, et al. Association of RNASEL and 8q24 variants with the presence and aggressiveness of hereditary and sporadic prostate cancer in a Hispanic population. *J Cell Mol Med*. 2014 Jan;18(1):125-33.
- [8] Yeager M, Chatterjee N, Ciampa J, Jacobs KB, Gonzalez-Bosquet J, Hayes RB, et al. Identification of a new prostate cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1055-7.
- [9] Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet*. 2008 Mar;40(3):316-21.
- [10] Eeles RA, Kote-Jarai Z, Al Olama AA, Giles GG, Guy M, Severi G, et al. Identification of seven new prostate cancer susceptibility loci through a genome-wide association study. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1116-21.
- [11] Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):563-6.
- [12] Ho GY, Melman A, Liu SM, Li M, Yu H, Negassa A, et al. Polymorphism of the insulin gene is associated with increased prostate cancer risk. *Br J Cancer*. 2003 Jan 27;88(2):263-9.
- [13] Chang BL, Zheng SL, Isaacs SD, Turner A, Hawkins GA, Wiley KE, et al. Polymorphisms in the CYP1B1 gene are associated with increased risk of prostate cancer. *Br J Cancer*. 2003 Oct 20;89(8):1524-9.
- [14] Pastina I, Giovannetti E, Chioni A, Sissung TM, Crea F, Orlandini C, et al. Cytochrome 450 1B1 (CYP1B1) polymorphisms associated with response to docetaxel in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC) patients. *BMC Cancer*. 2010;10:511.
- [15] Beuten J, Gelfond JA, Byrne JJ, Balic I, Crandall AC, Johnson-Pais TL, et al. CYP1B1 variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians. *Carcinogenesis*. 2008 Sep;29(9):1751-7.
- [16] Akinloye O, Gromoll J, Simoni M. Variation in CAG and GGN repeat lengths and CAG/GGN haplotype in androgen receptor gene polymorphism and prostate carcinoma in Nigerians. *Br J Biomed Sci*. 2011;68(3):138-42.
- [17] Bosland MC, Mahmoud AM. Hormones and prostate carcinogenesis: Androgens and estrogens. *J Carcinog*. 2011;10:33.
- [18] Beilin J, Ball EM, Favaloro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol*. 2000 Aug;25(1):85-96.
- [19] Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res*. 1994 Aug 11;22(15):3181-6.
- [20] Zeegers MP, Kiemeny LA, Nieder AM, Ostrer H. How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Nov;13(11 Pt 1):1765-71.
- [21] Strom SS, Gu Y, Zhang H, Troncoso P, Babaian RJ, Pettaway CA, et al. Androgen receptor polymorphisms and risk of biochemical failure among prostatectomy patients. *Prostate*. 2004 Sep 1;60(4):343-51.
- [22] Hsing AW, Gao YT, Wu G, Wang X, Deng J, Chen YL, et al. Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. *Cancer Res*. 2000 Sep 15;60(18):5111-6.

- [23] Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Neal CL, Blumenstein BA, et al. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res.* 1997 Mar 15;57(6):1194-8.
- [24] Lindstrom S, Ma J, Altshuler D, Giovannucci E, Riboli E, Albanes D, et al. A large study of androgen receptor germline variants and their relation to sex hormone levels and prostate cancer risk. Results from the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Sep;95(9):E121-7.
- [25] Price DK, Chau CH, Till C, Goodman PJ, Baum CE, Ockers SB, et al. Androgen receptor CAG repeat length and association with prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *J Urol.* 2010 Dec;184(6):2297-302.
- [26] Misra D, Xie W, Regan MM, Ross RW, Lee GS, Germain D, et al. Germline CAG repeat length of the androgen receptor and time to progression in patients with prostate cancer treated with androgen deprivation therapy. *BJU Int.* 2011 Oct;108(7):1086-91.
- [27] Robins DM. Androgen receptor gene polymorphisms and alterations in prostate cancer: of humanized mice and men. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Apr 16;352(1-2):26-33.
- [28] Zheng SL, Chang BL, Faith DA, Johnson JR, Isaacs SD, Hawkins GA, et al. Sequence variants of alpha-methylacyl-CoA racemase are associated with prostate cancer risk. *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6485-8.
- [29] Wright JL, Neuhauser ML, Lin DW, Kwon EM, Feng Z, Ostrander EA, et al. AMACR polymorphisms, dietary intake of red meat and dairy and prostate cancer risk. *Prostate.* 2011 Apr;71(5):498-506.
- [30] FitzGerald LM, Thomson R, Polanowski A, Patterson B, McKay JD, Stankovich J, et al. Sequence variants of alpha-methylacyl-CoA racemase are associated with prostate cancer risk: a replication study in an ethnically homogeneous population. *Prostate.* 2008 Sep 15;68(13):1373-9.
- [31] Daugherty SE, Shugart YY, Platz EA, Fallin MD, Isaacs WB, Pfeiffer RM, et al. Polymorphic variants in alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. *Prostate.* 2007 Oct 1;67(14):1487-97.
- [32] Levin AM, Zuhlke KA, Ray AM, Cooney KA, Douglas JA. Sequence variation in alpha-methylacyl-CoA racemase and risk of early-onset and familial prostate cancer. *Prostate.* 2007 Oct 1;67(14):1507-13.
- [33] FitzGerald LM, Patterson B, Thomson R, Polanowski A, Quinn S, Brohede J, et al. Identification of a prostate cancer susceptibility gene on chromosome 5p13q12 associated with risk of both familial and sporadic disease. *Eur J Hum Genet.* 2009 Mar;17(3):368-77.
- [34] Chiam K, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T. Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses. *Cancer Lett.* 2014 Jan 28;342(2):248-56.
- [35] Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H, Miller K. DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Sep;945:51-8.
- [36] Dimitriadis E, Kalogeropoulos T, Velaeti S, Sotiriou S, Vassiliou E, Fasoulis L, et al. Study of genetic and epigenetic alterations in urine samples as diagnostic markers for prostate cancer. *Anticancer Res.* 2013 Jan;33(1):191-7.
- [37] Wu T, Giovannucci E, Welge J, Mallick P, Tang WY, Ho SM. Measurement of GSTP1 promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2011 Jun 28;105(1):65-73.
- [38] Payne SR, Serth J, Schostak M, Kamradt J, Strauss A, Thelen P, et al. DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for non-invasive detection. *Prostate.* 2009 Sep 1;69(12):1257-69.
- [39] Rogers CG, Gonzalgo ML, Yan G, Bastian PJ, Chan DY, Nelson WG, et al. High concordance of gene methylation in post-digital rectal examination and post-biopsy urine samples for prostate cancer detection. *J Urol.* 2006 Nov;176(5):2280-4.
- [40] Roupret M, Hupertan V, Yates DR, Catto JW, Rehman I, Meuth M, et al. Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage. *Clin Cancer Res.* 2007 Mar 15;13(6):1720-5.
- [41] Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Nov 21;93(22):1747-52.
- [42] Hoque MO, Topaloglu O, Begum S, Henrique R, Rosenbaum E, Van Criekinge W, et al. Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 20;23(27):6569-75.
- [43] Kwabi-Addo B, Chung W, Shen L, Ittmann M, Wheeler T, Jelinek J, et al. Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Clin Cancer Res.* 2007 Jul 1;13(13):3796-802.

- [44] Albig W, Doenecke D. The human histone gene cluster at the D6S105 locus. *Hum Genet.* 1997 Dec;101(3):284-94.
- [45] Gonzalo S. Epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol* (1985). 2010 Aug;109(2):586-97.
- [46] Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, et al. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2005 Jul;129(1):156-69.
- [47] Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, Bhadkamkar V, Blase A, Kumar SV, et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *J Urol.* 2008 May;179(5):1804-9; discussion 9-10.
- [48] Whitman EJ, Groskopf J, Ali A, Chen Y, Blase A, Furusato B, et al. PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. *J Urol.* 2008 Nov;180(5):1975-8; discussion 8-9.
- [49] Hessels D, Schalken JA. Urinary biomarkers for prostate cancer: a review. *Asian J Androl.* 2013 May;15(3):333-9.
- [50] Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol.* 2003 Jul;44(1):8-15; discussion -6.
- [51] Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur Urol.* 2004 Aug;46(2):182-6; discussion 7.
- [52] Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C, et al. uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology.* 2004 Aug;64(2):311-5; discussion 5-6.
- [53] Ouyang B, Bracken B, Burke B, Chung E, Liang J, Ho SM. A duplex quantitative polymerase chain reaction assay based on quantification of alpha-methylacyl-CoA racemase transcripts and prostate cancer antigen 3 in urine sediments improved diagnostic accuracy for prostate cancer. *J Urol.* 2009 Jun;181(6):2508-13; discussion 13-4.
- [54] Varambally S, Laxman B, Mehra R, Cao Q, Dhanasekaran SM, Tomlins SA, et al. Golgi protein GOLM1 is a tissue and urine biomarker of prostate cancer. *Neoplasia.* 2008 Nov;10(11):1285-94.
- [55] Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, et al. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 Feb 1;68(3):645-9.
- [56] Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem.* 2006 Jun;52(6):1089-95.
- [57] Rigau M, Ortega I, Mir MC, Ballesteros C, Garcia M, Llauro M, et al. A three-gene panel on urine increases PSA specificity in the detection of prostate cancer. *Prostate.* 2011 Dec;71(16):1736-45.
- [58] Mitchell P. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 29;105(30):10513-8.
- [59] Nadiminty N, Tummala R, Lou W, Zhu Y, Zhang J, Chen X, et al. MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2012 Jan 6;287(2):1527-37.
- [60] Nguyen HC, Xie W, Yang M, Hsieh CL, Drouin S, Lee GS, et al. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate.* 2013 Mar;73(4):346-54.
- [61] Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol.* 2011 Jun;32(3):583-8.
- [62] Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology.* 2011 May;77(5):1265 e9-16.
- [63] Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, Steuber T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2011 Feb 1;128(3):608-16.
- [64] Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer.* 2012 Feb 14;106(4):768-74.
- [65] Cheng HH, Mitchell PS, Kroh EM, Dowell AE, Chery L, Siddiqui J, et al. Circulating microRNA profiling identifies a subset of metastatic prostate cancer patients with evidence of cancer-associated hypoxia. *PLoS One.* 2013;8(7):e69239.
- [66] Ding L, Xu Y, Zhang W, Deng Y, Si M, Du Y, et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. *Cell Res.* 2010 Jul;20(7):784-93.
- [67] Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, et al. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Res.* 2010 Mar 15;70(6):2339-49.

- [68] Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009 Apr 15;15(8):2850-5.
- [69] Harris T, Jimenez L, Kawachi N, Fan JB, Chen J, Belbin T, et al. Low-level expression of miR-375 correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol.* 2012 Mar;180(3):917-28.
- [70] Mathe EA, Nguyen GH, Bowman ED, Zhao Y, Budhu A, Schetter AJ, et al. MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. *Clin Cancer Res.* 2009 Oct 1;15(19):6192-200.
- [71] Jung HM, Patel RS, Phillips BL, Wang H, Cohen DM, Reinhold WC, et al. Tumor suppressor miR-375 regulates MYC expression via repression of CIP2A coding sequence through multiple miRNA-mRNA interactions. *Mol Biol Cell.* 2013 Jun;24(11):1638-48, S1-7.
- [72] Li Y, Jiang Q, Xia N, Yang H, Hu C. Decreased expression of microRNA-375 in nonsmall cell lung cancer and its clinical significance. *J Int Med Res.* 2012;40(5):1662-9.
- [73] Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology.* 2008 Jun;47(6):1955-63.
- [74] Zhou J, Song S, Cen J, Zhu D, Li D, Zhang Z. MicroRNA-375 is downregulated in pancreatic cancer and inhibits cell proliferation in vitro. *Oncol Res.* 2012;20(5-6):197-203.
- [75] Chen ZH, Zhang GL, Li HR, Luo JD, Li ZX, Chen GM, et al. A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate.* 2012 Sep 15;72(13):1443-52.
- [76] Antenor JA, Roehl KA, Eggener SE, Kundu SD, Han M, Catalona WJ. Preoperative PSA and progression-free survival after radical prostatectomy for Stage T1c disease. *Urology.* 2005 Jul;66(1):156-60.
- [77] Corcoran NM, Casey RG, Hong MK, Pedersen J, Connolly S, Peters J, et al. The ability of prostate-specific antigen (PSA) density to predict an upgrade in Gleason score between initial prostate biopsy and prostatectomy diminishes with increasing tumour grade due to reduced PSA secretion per unit tumour volume. *BJU Int.* 2012 Jul;110(1):36-42.
- [78] Kundu SD, Roehl KA, Yu X, Antenor JA, Suarez BK, Catalona WJ. Prostate specific antigen density correlates with features of prostate cancer aggressiveness. *J Urol.* 2007 Feb;177(2):505-9.
- [79] Ulmert D, Cronin AM, Bjork T, O'Brien MF, Scardino PT, Eastham JA, et al. Prostate-specific antigen at or before age 50 as a predictor of advanced prostate cancer diagnosed up to 25 years later: a case-control study. *BMC Med.* 2008;6:6.
- [80] Vickers AJ, Cronin AM, Bjork T, Manjer J, Nilsson PM, Dahlin A, et al. Prostate specific antigen concentration at age 60 and death or metastasis from prostate cancer: case-control study. *Bmj.* 2010;341:c4521.
- [81] D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *Jama.* 1998 Sep 16;280(11):969-74.
- [82] Patel AA, Chen MH, Renshaw AA, D'Amico AV. PSA failure following definitive treatment of prostate cancer having biopsy Gleason score 7 with tertiary grade 5. *Jama.* 2007 Oct 3;298(13):1533-8.
- [83] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
- [84] Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6130-5.
- [85] Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene.* 2008 Mar 13;27(12):1788-93.
- [86] Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer.* 2010 Mar 1;126(5):1166-76.
- [87] Wach S, Nolte E, Szczyrba J, Stohr R, Hartmann A, Orntoft T, et al. MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening. *Int J Cancer.* 2012 Feb 1;130(3):611-21.
- [88] Feng J, Huang C, Diao X, Fan M, Wang P, Xiao Y, et al. Screening biomarkers of prostate cancer by integrating microRNA and mRNA microarrays. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013 Nov;17(11):807-13.
- [89] Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2257-61.
- [90] He HC, Han ZD, Dai QS, Ling XH, Fu X, Lin ZY, et al. Global analysis of the differentially expressed miRNAs of prostate cancer in Chinese patients. *BMC Genomics.* 2013;14:757.

- [91] Yang X, Du WW, Li H, Liu F, Khorshidi A, Rutnam ZJ, et al. Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. *Nucleic Acids Res.* 2013 Nov;41(21):9688-704.
- [92] Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, et al. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther.* 2009 Mar;16(3):206-16.
- [93] Selth LA, Townley SL, Bert AG, Stricker PD, Sutherland PD, Horvath LG, et al. Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients. *Br J Cancer.* 2013 Aug 6;109(3):641-50.
- [94] Watahiki A, Macfarlane RJ, Gleave ME, Crea F, Wang Y, Helgason CD, et al. Plasma miRNAs as Biomarkers to Identify Patients with Castration-Resistant Metastatic Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2013;14(4):7757-70.
- [95] Song C, Chen H, Wang T, Zhang W, Ru G, Lang J. Expression profile analysis of microRNAs in prostate cancer by next-generation sequencing. *Prostate.* 2015 Apr;75(5):500-16.
- [96] Maeno A, Terada N, Uegaki M, Goto T, Okada Y, Kobayashi T, et al. Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions. *Prostate.* 2014 Dec;74(16):1604-12.
- [97] Ostling P, Leivonen SK, Aakula A, Kohonen P, Makela R, Hagman Z, et al. Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2011 Mar 1;71(5):1956-67.
- [98] Haj-Ahmad TA, Abdalla MA, Haj-Ahmad Y. Potential Urinary miRNA Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients. *J Cancer.* 2014;5(3):182-91.
- [99] Shen PF, Chen XQ, Liao YC, Chen N, Zhou Q, Wei Q, et al. MicroRNA-494-3p targets CXCR4 to suppress the proliferation, invasion, and migration of prostate cancer. *Prostate.* 2014 May;74(7):756-67.
- [100] Tang Y, Yan W, Chen J, Luo C, Kaipia A, Shen B. Identification of novel microRNA regulatory pathways associated with heterogeneous prostate cancer. *BMC systems biology.* 2013;7 Suppl 3:S6.
- [101] Gorlov IP, Byun J, Gorlova OY, Aparicio AM, Efstathiou E, Logothetis CJ. Candidate pathways and genes for prostate cancer: a meta-analysis of gene expression data. *BMC Med Genomics.* 2009;2:48.
- [102] Kim TW, Michniewicz M, Bergmann DC, Wang ZY. Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature.* 2012 Feb 16;482(7385):419-22.
- [103] Wallace MD, Pfefferle AD, Shen L, McNairn AJ, Cerami EG, Fallon BL, et al. Comparative oncogenomics implicates the neurofibromin 1 gene (NF1) as a breast cancer driver. *Genetics.* 2012 Oct;192(2):385-96.
- [104] Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1069-75.
- [105] Appin CL, Brat DJ. Molecular genetics of gliomas. *Cancer J.* 2014 Jan-Feb;20(1):66-72.
- [106] Benhaj K, Akcali KC, Ozturk M. Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2006 Mar;15(3):701-7.
- [107] Milovanovic T, Planutis K, Nguyen A, Marsh JL, Lin F, Hope C, et al. Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. *Int J Oncol.* 2004 Nov;25(5):1337-42.
- [108] Chow A. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nature Education.* 2010;3(9):7.
- [109] Smith AL, Robin TP, Ford HL. Molecular pathways: targeting the TGF-beta pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2012 Sep 1;18(17):4514-21.
- [110] Sharifi N, Hurt EM, Kawasaki BT, Farrar WL. TGFBR3 loss and consequences in prostate cancer. *Prostate.* 2007 Feb 15;67(3):301-11.
- [111] Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther.* 2002 Sep-Oct;1(5):466-76.
- [112] Leong KG, Gao WQ. The Notch pathway in prostate development and cancer. *Differentiation.* 2008 Jul;76(6):699-716.
- [113] Zhao S, Zhang Y, Zhang Q, Wang F, Zhang D. Toll-like receptors and prostate cancer. *Front Immunol.* 2014;5:352.
- [114] Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct;1(1):22-33.
- [115] Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet.* 2012 Mar;28(3):128-36.
- [116] Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, Catto JW, Culig Z, Gronberg H, et al. The mutational landscape of prostate cancer. *Eur Urol.* 2013 Oct;64(4):567-76.

- [117] VanderWeele DJ, Brown CD, Taxy JB, Gillard M, Hatcher DM, Tom WR, et al. Low-grade prostate cancer diverges early from high grade and metastatic disease. *Cancer Sci.* 2014 Aug;105(8):1079-85.
- [118] Varki Ajit KRaTB. Glycosylation Changes in Cancer In: Varki A CR, Esko JD, ed. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009.
- [119] Meany DL, Chan DW. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *Clin Proteomics.* 2011;8(1):7.
- [120] Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):331-41.
- [121] Lu MH, Liao ZL, Zhao XY, Fan YH, Lin XL, Fang DC, et al. hTERT-based therapy: a universal anticancer approach (Review). *Oncol Rep.* 2012 Dec;28(6):1945-52.
- [122] Gasinska A, Luczynska E, Wilk W, Cichocka A. Differences in the expression of telomerase and prostate-specific membrane antigen in non-advanced prostatic cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 2013;51(1):66-72.
- [123] Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, Beckmann T, Brings S, Peters H, et al. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci.* 2008 Apr 1;121(Pt 7):1046-53.
- [124] Bollmann FM. The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. *Bioessays.* 2008 Aug;30(8):728-32.
- [125] Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer.* 2004 Dec;11(4):689-708.
- [126] Hatake K, Tokudome N, Ito Y. Next generation molecular targeted agents for breast cancer: focus on EGFR and VEGFR pathways. *Breast Cancer.* 2007;14(2):132-49.
- [127] Lichtner RB. Estrogen/EGF receptor interactions in breast cancer: rationale for new therapeutic combination strategies. *Biomed Pharmacother.* 2003 Dec;57(10):447-51.
- [128] Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, Azzariti A, Bellizzi A, Paradiso A. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Aug;1766(1):120-39.
- [129] Xiong X, Chorzalska A, Dubielecka PM, White JR, Vedvyas Y, Hedvat CV, et al. Disruption of Abi1/Hssh3bp1 expression induces prostatic intraepithelial neoplasia in the conditional Abi1/Hssh3bp1 KO mice. *Oncogenesis.* 2012;1:e26.
- [130] Fromont G, Vallancien G, Validire P, Levillain P, Cussenot O. BCAR1 expression in prostate cancer: association with 16q23 LOH status, tumor progression and EGFR/KAI1 staining. *Prostate.* 2007 Feb 15;67(3):268-73.
- [131] Fromont G, Rozet F, Cathelineau X, Ouzzane A, Doucet L, Fournier G, et al. BCAR1 expression improves prediction of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Prostate.* 2012 Sep 1;72(12):1359-65.
- [132] Lasorella A, Uo T, Iavarone A. Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene.* 2001 Dec 20;20(58):8326-33.
- [133] Carey JP, Asirvatham AJ, Galm O, Ghogomu TA, Chaudhary J. Inhibitor of differentiation 4 (Id4) is a potential tumor suppressor in prostate cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:173.
- [134] Nambiar DK, Deep G, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits aberrant lipid metabolism, proliferation and emergence of androgen-independence in prostate cancer cells via primarily targeting the sterol response element binding protein 1. *Oncotarget.* 2014 Oct 30;5(20):10017-33.
- [135] Kanteti R, Nallasura V, Loganathan S, Tretiakova M, Kroll T, Krishnaswamy S, et al. PAX5 is expressed in small-cell lung cancer and positively regulates c-Met transcription. *Lab Invest.* 2009 Mar;89(3):301-14.
- [136] Denk D, Bradtke J, Konig M, Strehl S. PAX5 fusion genes in t(7;9)(q11.2;p13) leukemia: a case report and review of the literature. *Mol Cytogenet.* 2014;7(1):13.
- [137] Norhany S, Kouzu Y, Uzawa K, Hayama M, Higo M, Koike H, et al. Overexpression of PAX5 in oral carcinogenesis. *Oncol Rep.* 2006 Nov;16(5):1003-8.
- [138] Ellsworth RE, Seebach J, Field LA, Heckman C, Kane J, Hooke JA, et al. A gene expression signature that defines breast cancer metastases. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26(3):205-13.
- [139] Agostinelli C, Sabbatini E, Gjorret JO, Righi S, Rossi M, Mancini M, et al. Characterization of a new monoclonal antibody against PAX5/BASP in 1525 paraffin-embedded human and animal tissue samples. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010 Dec;18(6):561-72.
- [140] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- [141] Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Nov;12(11):829-46.
- [142] Zhang F, Du G. Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World J Biol Chem.* 2012 Aug 26;3(8):167-74.

- [143] DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008 Jan;7(1):11-20.
- [144] Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 Jul;8(7):497-511.
- [145] Arnold RS, Sun CQ, Richards JC, Grigoriev G, Coleman IM, Nelson PS, et al. Mitochondrial DNA mutation stimulates prostate cancer growth in bone stromal environment. *Prostate.* 2009 Jan 1;69(1):1-11.
- [146] Costello LC, Franklin RB. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Mol Cancer.* 2006;5:17.
- [147] Nelson PS. Predicting prostate cancer behavior using transcript profiles. *J Urol.* 2004 Nov;172(5 Pt 2):S28-32; discussion S3.
- [148] Dayem AA, Choi HY, Kim JH, Cho SG. Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells. *Cancers (Basel).* 2010;2(2):859-84.

## 9. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ

### 9.1. Публикации в списания

1. Kachakova D, Mitkova A, Popov E, Beltcheva O, Vlahova A, Dikov T, Hristova S, Mitev V, Slavov C, Kaneva R. Evaluation of the clinical value of the newly identified urine biomarker HIST1H4K for diagnosis and prognosis of prostate cancer in Bulgarian patients. *J BUON*. 2013 Jul-Sep;18(3):660-8. IF=0.706
2. Kachakova D, Mitkova A, Popov E, Popov I, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Mitev V, Slavov C, Kaneva R. Combinations of Serum Prostate-Specific Antigen and Plasma Expression Levels of let-7c, miR-30c, miR-141, and miR-375 as Potential Better Diagnostic Biomarkers for Prostate Cancer. *DNA Cell Biol*. 2014 Dec 18. [Epub ahead of print], IF=1.991
3. Д. Качакова, А. Миткова, Радка Кънева, Ваньо Митев. Ракът на простатата-генетично, геномно и епигенетично заболяване. Биоамаркери. *Studia Oncologica*, Октомври 2014

### 9.2. Участия в конгреси и конференции свързани с темата на дисертацията

1. Kaneva Radka, Kachakova Darina, Mitkova Atanaska, Popov Elenko, Vlahova Aleksandrina, Dikov Tihomir, Christova Svetlana, Kremensky Ivo, Mitev Vanio, and Slavov Chavdar, "CYP1B1 polymorphic variants associated with prostate cancer risk in Bulgaria", Poster presentation. European Human Genetics Conference , 23 – 26 May 2009 Vienna, Austria. /vol. 17, supplement 2, P06.072, p. 182/
2. Kachakova Darina, Mitkova Atanaska, Popov Elenko, Vlahova Aleksandrina, Dikov Tihomir, Christova Svetlana, Kremensky Ivo, Mitev Vanio, Kaneva Radka, and Slavov Chavdar , "Association of SRD5A2 polymorphic variants with prostate cancer risk in Bulgaria", Poster presentation. 8th Balkan Meeting on Human Genetics, 14 – 17 May 2009 Cavtat, Croatia
3. Slavov Ch, Kachakova D, Popov E, Mitkova A, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Kremensky I, Mitev V, and Kaneva R. Role of genetic polymorphism in SRD5A2 gene in progression of prostate cancer. 30th Congress of the Societe Internationale d'Urologie, November 1-5, 2009, Shanghai, China
4. Kachakova D, Popov E, Mitkova A, Dodova R, Vlahova A, Dikov T , Christova S, Slavov C, Mitev V and Kaneva R, "Association study of polymorphic variants in chromosome locus 8q24 linked with prostate cancer in Bulgarian patients", 21-st Meeting of the European Association of Cancer Research, 26-29 June 2010, Oslo, Norway, /volume 8, number 5, 873, p.220
5. Kachakova D, Popov E, Mitkova A, Dodova R, Vlahova A, Dikov T , Christova S, Slavov C, Mitev V and Kaneva R, "Polymorphic variants in CYP1B1 linked with increased risk for prostate cancer in Bulgarian patients", The European Human Genetics Conference, 12-15 June 2010, Gothenburg, Sweden, /vol. 18, supplement 1, P06.135, p. 189-190
6. Popov E, Kachakova D, Boyadjieva M, Mitkova A, Dodova R, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Kremensky I, Slavov Ch, Mitev V, Kaneva R, "Role of genetic polymorphism in SRD5A2 gene in progression of prostate cancer", IX International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 13-16 may, 2010, /vol. LXII, supplement to issue 1/2010, ICMS 2010/PP 22 Preclinic, p. 65/
7. Popov E, Kachakova D, Mitkova A, Kaneva R, Vlahova A, Dikov T, Slavov C, Mitev V, Kremensky I, "Prostate cancer risk association with SNP polymorphic variants of CYP1B1 gene in the Bulgarian population", 25th Anniversary EAU (European Association of Urology) Congress, Barcelona, Spain, 16-20 April 2010, /vol. 9, issue 2, ISSN 1569-905, 748, p. 242/
8. Kachakova D, Popov E, Mitkova A, Dodova R, Vlahova A, Dikov T , Christova S, Slavov C, Mitev V and Kaneva R, "Association analysis in Bulgarian prostate cancer patients adds support to a newly identified susceptibility locus on chromosomo 8q24", The European Human Genetics Conference, 28-31 May 2011, Amsterdam, The Netherlands, /vol. 19, supplement 2, P06.181, p. 231
9. Vlahova A, Dikov T , Christova S, Kachakova D, Mitkova A, Genadijeva M, Popov E , Slavov C, Mitev V and Kaneva R, "AMACR polymorphic variant rs3195676 and prostate cancer aggressiveness in Bulgarian patients", 23rd European Congress of Pathology, 27 August- 1 September

2011, Helsinki, Finland, Virhows archive, The European Journal of Pathology, Vol 459, Supplement 1, p. S294

10. Kachakova D, Popov E, Mitkova A, Beltcheva O, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R, "Promoter hypermethylation of HIST1H4K and RASSF2 in urine from prostate cancer patients", European Association for Cancer Research conference, 7-10 July 2012, Barcelona, Spain, /vol.48, supplement 5, 520, p. S123-124

11. Качакова Д. Генетични и епигенетични промени при рака на простатата. Национален симпозиум „Акад. Чудомир Начев“; 06-07 юни 2012; София, България; устна презентация

12. Slavov C, Kachakova D, Popov E, Mitkova A, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R, "Association analysis of rs 2567206 polymorphism in promoter region of CYP1B1 with the risk for development prostate cancer in Bulgarian patients", 32nd Congress of the Societe Internationale d'Urologie, September 30- October 4, 2012, Fukuoka, Japan, Urology 80, supplement 3A, EP309, p.S296

13. Kachakova D, Popov E, Mitkova A., Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R;"Association analysis of polymorphisms in candidate genes on 11p15 locus with prostate cancer in Bulgarian patients", The European Human Genetics Conference, 8-11 June 2013, Paris, France, /vol. 21, supplement 2, P11.216, p. 316

14. Kachakova D, Popov E, Mitkova A., Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R, Genetic and epigenetic changes in prostate cancer. The search of diagnostic and prognostic biomarkers. XI-th International Medical Science Conference for students and young doctors, 16-19 october 2013, Medical University- Pleven, Bulgaria, p 15, lectur

15. Kachakova D, Popov E, Mitkova A., Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R, "Analysis of GSTP1 promoter hypermethylation in urine samples of Bulgarian prostate cancer patients and controls", The European Human Genetics Conference, 31 May-3 June, 2014, Milan, Italy, Vol. 22, supplement 1, P16.67-S, p. 318

16. Kachakova D, Popov E, Mitkova A, Popov I, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R, "miR-141 and miR-375 expression in plasma samples from Bulgarian prostate cancer patients and controls", European Association for Cancer Research conference, 5-8 July 2014, Munich, Germany, Vol. 50, supplement 5, 397, p. S95

17. Д. Качакова, д-р А.Влахова; Молекулни биомаркери при рак на простатата; Първа Национална Конференция „Молекулярна патология в онкологията“; София, България; 06-07 юни 2014; устна презентация

## 10. SUMMARY

Prostate cancer (PC) is a multifactorial, heterogeneous and multifocal disease. It is the most frequently diagnosed malignancy in men worldwide. Despite the advance in science, medicine and early diagnosis PC remains the second leading cause of cancer deaths among men in developed countries.

Despite their low specificity and sensitivity the serum levels of PSA and digital rectal examination are so far the standard methods used to determine the need for prostatic biopsy for the diagnosis of PC. Finding new noninvasive diagnostic biomarkers in order to reduce the number of unnecessary needle biopsies, and also new prognostic biomarkers for differentiating aggressive from indolent forms for improvement of therapy are needed.

PC is a genetic, genomic and epigenetic disease. Therefore the goal of the current dissertation is to study the genetic factors associated with the disease in Bulgarian patients and to analyze promoter hypermethylation, and expression levels of mRNAs and miRNAs in different biological materials in order to evaluate their roles as diagnostic and prognostic biomarkers.

Polymorphic variants found in GWAS and located on different chromosomes loci (7q21, 8q24, 10q11, 11p15, 12q13, 19q13) were studied. Fine mapping of the 11p15 chromosome region was also performed in order to elucidate the association with PC observed for this locus. The association of rs1016343, rs7841060 and rs4871008 in 8q24, and rs7920517 in 10q11 with PC in Bulgarian patients was confirmed. An association of the polymorphisms in 8q24 and some haplotype combinations with the development of aggressive tumours was estimated for the first time but these results should be validated in larger samples. We found a new associated polymorphic variant - rs11564710 in 11p15 which leads to two-fold increase risk for disease development. It is more strongly associated with PC in comparison with rs7127900 which was initially discovered.

The studied polymorphic variants in *CYP11B1* and *AR* genes related to the metabolism of androgens and *AMACR* gene related to metabolism of branched fatty acids did not show statistically significant association with PC in Bulgarian patients.

The analyzed promoter hypermethylated genes *GSTP1*, *HIST1H4K* and *RASSF2* in urine were rejected as good diagnostic and prognostic biomarkers. The methylation of *GSTP1* and *HIST1H4K* showed correlation with age but not with diagnosis. Methylation of *RASSF2* was not found in patients nor in controls.

Expression levels of *PCA3*, *PSA*, *AMACR*, *GSTP1* and *COLPH2 (GOLM1)* in urine were analyzed. *PCA3* and *AMACR* most reliably distinguish patients with PC from controls with BPH. The combination of these two biomarkers with *PSA* in urine showed better diagnostic accuracy than their use separately and in comparison with serum PSA levels.

From the studied miRNAs in plasma (let-7c, miR-30c, miR-141 and miR-375) miR-375 levels discriminate between PC patients and BPH controls more precisely than serum PSA levels and expression levels of *PCA3* in urine. Combinations of analyzed miRNAs in plasma and serum PSA levels distinguish patients with PC from BPH controls even better than their use separately or in comparison with the combinations of studied biomarkers in urine.

In order to find new potential biomarkers for PC miRNA expression profiling in tumour and normal prostatic tissues by microarray analysis was performed. Twenty eight miRNAs showed increased and 14 miRNAs decreased expression in tumour prostatic tissues. Twenty eight of them are not reported in the literature for association with PC. Gene ontology analysis showed that the most of mRNAs (genes) regulated by differentially expressed miRNAs participate in regulation of gene expression, apoptosis, cell proliferation, cellular response to growth factors and DNA damage stimulus, and others. The most influenced pathways by genes with changed expression are MAPK signaling pathway, pathways involved in regulation of apoptosis, cell adhesion, cell cycle, DNA repair, Wnt, EGF-EGFR, p53, NOTCH signaling pathways, telomere maintenance and others. Cluster analysis showed that 27 from miRNAs with elevated expression and 5 of the miRNAs with decreased expression most reliably discriminate patients from controls and these miRNAs could be analyzed in subsequent validation studies as potential diagnostic biomarkers.

Our study shows that combinations of noninvasive biomarkers lead to better diagnostic accuracy in comparison with their use separately. Estimated combinations outperform serum PSA levels and have potential to enter clinical practice after their validation in larger sample cohorts. The conducted whole miRNA expression profiling complements the knowledge about miRNAs related to prostate carcinogenesis. Most of the studied polymorphic variants selected from literature data have low penetrance and the association with PC in patients with Bulgarian ethnicity was not confirmed. In order to evaluate their role a larger case-control study should be performed. A new polymorphic variant in previously associated with PC chromosome locus 11p15 was found. We showed for first time that expression levels of miR-375 in plasma could be used as diagnostic biomarker in PC.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Изказвам благодарности на акад. проф. д-р Ваньо Митев за предоставената ми възможност за изработване на дисертацията. Бих искала да изкажа искрени благодарности и на научния ми ръководител доц. д-р Радка Кънева и на научния ми консултант гл. ас. д-р Атанаска Миткова. Благодаря им за търпението, всеотдайността, за напътствията и за получените знания и умения. Благодарна съм им за доверието, вярата в мен, искреността, съветите и помощта, които получих. Те бяха съпричастни и изживяваха с мен както радостите, така и тревогите.

Също така искам да благодаря на всички колеги от Центъра по Молекулна Медицина, които ме насърчаваха в трудните моменти, даваха ми съвети и ми помагаша.

Благодарна съм на нашите колаборатори в Клиниката по Урология и в Клиниката по Обща и клинична патология към Университетска болница „Александровска“, МУ-София, без които изработването на дисертацията не би било възможно.

Благодарна съм и на семейството ми, на съпруга ми, които ме подкрепяха през цялото време.