

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

АНИТА ОГНЯНОВА ЦВЕТКОВА

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

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР”

Професионално направление

4.3.

Биологически науки

Научна специалност: „Молекулярна биология”

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

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

Доц. Албена Тодорова, дб

София, 2015

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

Цитирани са 105 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в: Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет – София; Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника”, София

Работата по дисертационния труд е финансирана частично от Съвета за медицинска наука на Медицински Университет – София (Договор № 26-Д ; №17-Д).

Дисертационният труд е представен на заседание на разширен катедрен съвет на Катедра „Медицинска Химия и Биохимия”, Медицински Университет - София, на 05.03.2015 г. и насочен за защита към 01.06.2015 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 01.06.2015 г. в Катедра Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет София, ул. Здраве 2, гр. София, пред научно жури в състав:

1. Доц. Алексей Савов дб (рецензент)
2. Доц. Албена Георгиева Йорданова (рецензент)
3. Доц. Милена Сергеева Мурджева-Андонова
4. Доц. Ивелин Йорданов Панчев
5. Чл. Кор. Проф. Д-р Ваньо Иванов Митев

Материалите по защитата са на разположение в Катедра „Медицинска Химия и Биохимия“, Медицински Университет - София и са публикувани на интернет страницата на МУ-София - Развитие на академичния състав - <http://career.mu-sofia.bg>

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

GS- Gleason score

DEPC- Diethylpyrocarbonate

MS-PCR- Methylation specific Polymerase chain reaction

NCBI- National Center for Biotechnology Information

PCR- Polymerase Chain Reaction

RT-PCR – Reverse Polymerase chain reaction

siRNAs – Small interfering Ribonucleic acids

SNPs- Single Nucleotide Polymorphisms

TNM- Tumor Node Metastases

АПТ- Андроген потискаща терапия

ДНК- Дезоксирибонуклеинова киселина

ДПХ- Доброкачествена простатна хиперплазия

ДРИ- Дигитално ректално изследване

ЕДТА- Етилен диамин тетраацетат

КРПК- Кастрация резистентен простатен карцином

ПИА -Простатни интраепителни атрофични лезии

ПИН-Простатни интраепителни неопластични лезии

ПК – Простатен карцином

ПСА - Простатно-специфичен антиген

РНК- Рибонуклеинова киселина

СЗО- Световна здравна организация

ТКБ- тру-кът биопсия

ЦНС- Централна нервна система

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	9
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	38
БИБЛИОГРАФИЯ	40
ИЗВОДИ	44
ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ	45
ПРИНОСИ	47
SUMMARY	48

ВЪВЕДЕНИЕ

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

В настоящата разработка проведохме комплексни молекулярно-генетични изследвания при 150 български пациента с диагнози: агресивен ПК (18), неагресивен ПК (83), ДПХ (25) и простатит (24) и интерпретирахме получените резултати в светлината на клинично-хистологичните аспекти на болестта. Почти всички пробанди с агресивно поведение на ПК, показаха наличие на *PCA3* свръхзавишени експресионни нива, *T2ex1-ERGe4* фузия и *GSTP1* промоторно хиперметиране. Беше установена асоциация между *TMPRSS2-ERG* позитивен фузионен статус и умерено до слабо-диференцирани простатни тумори, по-висок туморен стадий. Този молекулен маркер има отношение и към допълнителни клинично-патологични данни за животозастрашаващ ПК, като периневрална и периваскуларна инфилтрация, клетъчен плейоморфизъм, андрогенна неподатливост, метастазирание и др. Наличието на ПК специфични молекулни маркери в кръвта се асоциира с неблагоприятна прогноза, като *T2-ERG* позитивни пробанди са предразположени към образуването на метастази. *GSTP1* промоторното хиперметиране бе определено, като най-ранната епигенетична мутация, индикираща преканцерозни и малигнени промени в простатната жлеза и най-дълго персистиращ епигенетичен маркер в кръвта. Не бяха детектирани соматични мутации в *AR* гена. 41 % от пробандите с ПК показаха големина на *AR* (CAG)_n повтора ≤ 22 /критична точка/, което доказва наличие на вродено предразположение към рак на простатата при тези пациенти. Всички изследвани пациенти показаха нормален генотип по отношение на IVS1-27G>A полиморфизма.

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

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

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

ЗАДАЧИ

- Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-биологична методика за оценка на експресионните нива на тумор-специфичния маркер *PCSA3*.
- Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-биологична техника за анализ на *T2-ERG* фузионни транскрипти.
- Разработване и въвеждане на методика за анализ на промоторно хиперметиране в *GSTP1* гена.
- Въвеждане и оптимизиране на методика за анализ на *IVS1-27:G/A* полиморфизма в *KLF6* гена.
- Секвениране на *AR* гена и анализ на $(CAG)_n$ повтора в екзон 1 на гена.
- Приложение на разработените методи за изследване на тумор-специфичните маркери за диагностика и контрол на заболяването при български пациенти с ПК или други патологии на простатната жлеза: ДПХ и хронично възпалително заболяване (простатит).
- Извършване на сравнителен анализ на базата на получените молекулни профили и наблюдаваните клинични и хистологични характеристики при изследваните пациенти с ПК, ДПХ и простатит.
- Разработване на системен подход за молекулярно-генетичен анализ при пациенти с ПК; интердисциплинарен подход за индивидуализирана терапия.
- Сравняване на получените данни при български пациенти със световната база данни.
- Обобщение на получените резултати.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

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

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

В проучването бяха използвани, като контроли следните клетъчни линии, предоставени от Gerald W. Verhaegh PhD, Radboud University Nijmegen Medical Centre: Q3657 22Rv1(ДПХ); Q3658 22Rv1 (ПК); DNA 810 pCMV-PCA3 plasmid (6008bps); Q2353 DuCaP (ПК *T2/ERG*)

Всички изследвани клинични случаи са спорадични и с български произход. Пациентите са клинично диагностицирани и насочени за ДНК анализ. Клиничната диагноза е поставена на базата на стандартни клинични и лабораторни изследвания: провеждане на ПСА анализ, специализиран преглед при уролог-специалист, провеждане на различен вид биопсия, според профила на пациента и последващо хистологично изследване.

2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

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

Биологични материали, използвани в дисертационния труд:

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

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. ПРЕДНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

- 1.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв и уринни седименти.
- 1.2. Изолиране на високомолекулна ДНК от тъканни проби по фенол-хлороформен метод.
- 1.3. Колектиране и предварителна обработка на уринни проби с цел последващо изолиране на РНК от уринен седимент.
- 1.4. Изолиране на високомолекулна РНК от уринни седименти и венозна кръв чрез използването на тризол (TriPure Isolation reagent, Life Technologies).
- 1.5. Изолиране на високомолекулна РНК от тъканни проби.
- 1.6. Бисулфитно конвертиране на ДНК

2. АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

- 2.1. Провеждане на обратна транскрипция.
- 2.2. Полимеразна Верижна Реакция (ПВР; Polymerase Chain Reaction; PCR)
 - *PCA3*
 - *T2-ERG*
 - *GSTP1*
 - *IVS1-27:G/A*
 - *AR(CAG)_n; AR*
- 2.3. Електрофореза в агарозен гел
- 2.4. Фрагментен анализ в полиакриламиден гел
- 2.5. Електрофореза за фрагментен анализ на денатуриращ полиакриламиден гел на ALFexpress автоматичен секвенатор.
- 2.6. Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди. Принцип на метода на Sanger
- 2.7. Секвениране на получените специфични фрагменти в настоящата разработка: *GSTP1* неметиран (непатологичен) алел и метиран (патологичен) алел, *T2-ERG* фузии, *AR* екзони, *KLF6*-таргетна секвенция)
- 2.8. Real time PCR - метод за количествен анализ

РЕЗУЛАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Клинични групи, включени в проучването.

Обект на молекулярно-генетични изследвания в настоящия дисертационен труд са 150 пациента, разпределени в групи според конкретната патология засягаща простатната жлеза (Таблица 1).

Таблица 1. Клинични групи, участващи в проучването.

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

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

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

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

По отношение на изолирането на РНК от неинвазивни уринни проби бяха въведени лабораторни протоколи за колектиране на уринни проби, чрез използване на 0,5 М ЕДТА стабилизатор за начално транспортиране, както и за предобработка до получаване на уринен седимент.

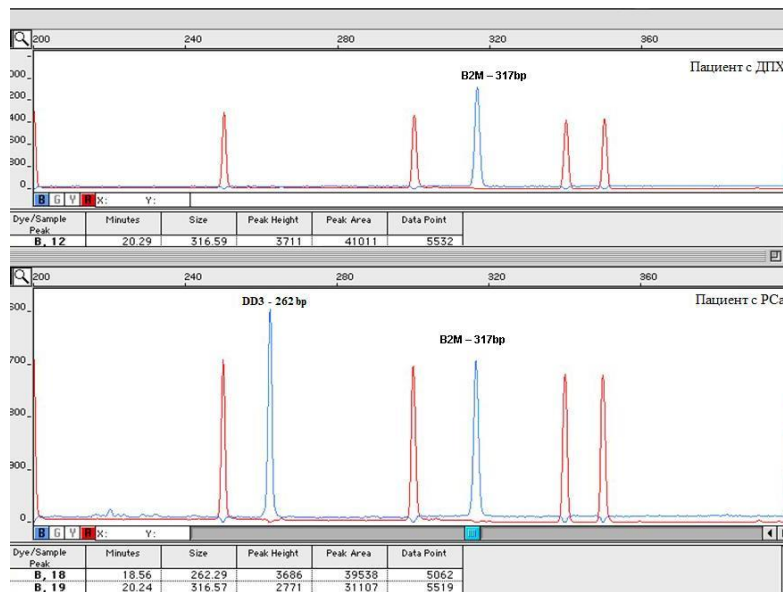
Оптимизиран протокол за изолиране на високомолекулна РНК от уринен седимент и тъканни проби е поместен в глава „Материали и Методи“.

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

Изследване на *PCA3* и *B2M* гена в качеството му на вътрешна контрола чрез амплификация на копии ДНК: В хода на оптимизация на експеримента намалихме размера на *B2M* фрагмента от 535 bp на 317 bp., което доведе до оптимална амплификация на двата фрагмента (контролен *B2M* и простатно тумор-специфичен *PCA3*) в мултиплексна реакция при всички използвани контроли. В пациентски проби, обаче резултатите бяха все още незадоволителни поради намаляване чувствителността на *PCA3* амплификацията.

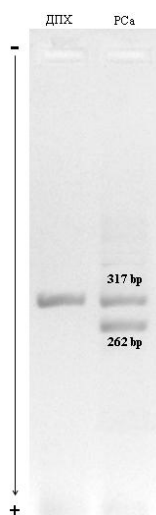
При проби от пациенти успехът на анализа зависи от фазата на заболяването и вида на биологичната проба. Предполага се, че туморната формация, експресираща специфичния маркер *PCA3* е в пъти по-малко съотношение спрямо здравата тъкан. В резултат на това предприехме стратегия, целяща засилване чувствителността на *PCA3* амплификацията. Беше въведен нов протокол за амплификация, чрез който в отделни реакции се размножават *PCA3* и *B2M* гените върху едно и също количество изходна копии ДНК матрица, след което се смесват в еквивалентни количества.

Приложението на оптимизираните методики при реални проби от пациенти доведе до задоволителни резултати, приложими за диагностични цели. На Фигура 1 са представени резултати от фрагментен анализ след оптимизация в методичния протокол и намаляване размера на амплифицирания контролен *B2M* ген от 535 бд. на 317 бд.



Фигура 1. Електроферограмен профил при фрагментен анализ на маркери *PCA3* (*DD3*) и *B2M*.

Проба номер 1 представлява молекулен профил при пациент с диагноза ДПХ. Детектира се добре изразен пик на *B2M* и липса на *PCA3* (*DD3*) експресия. Проба номер 2 представлява амплифициран стандарт с ПК. Установяват се тумор-специфичния маркер и контролния продукт. На Фигура 2 е представен агарозен електрофоретичен профил на същите две проби 1 и 2.



Фигура 2. Агарозна гел електрофореза.

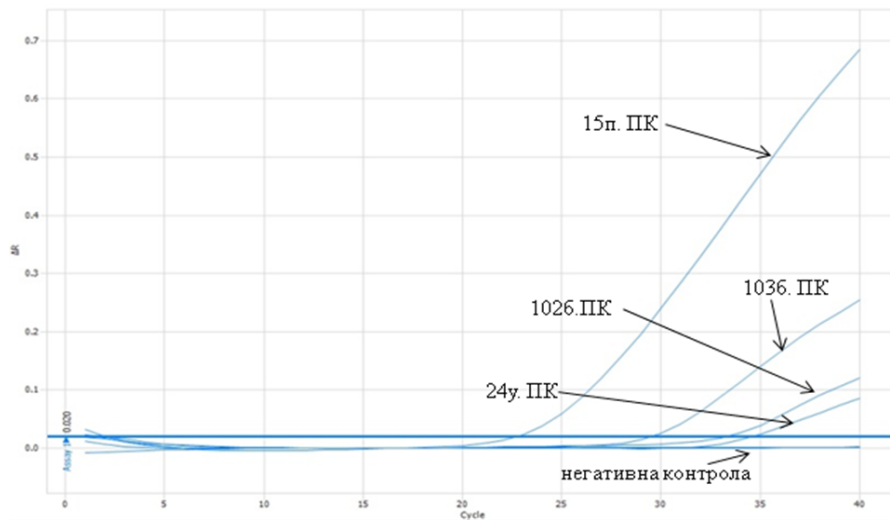
Първи старт – електрофоретичен профил на пациент с ДПХ – само един фрагмент 317 бд. *B2M*.

Втори старт – електрофоретичен профил на контролна проба с ПК – два фрагмента: 317 бд. *B2M* и 262 бд. *PCA3*.

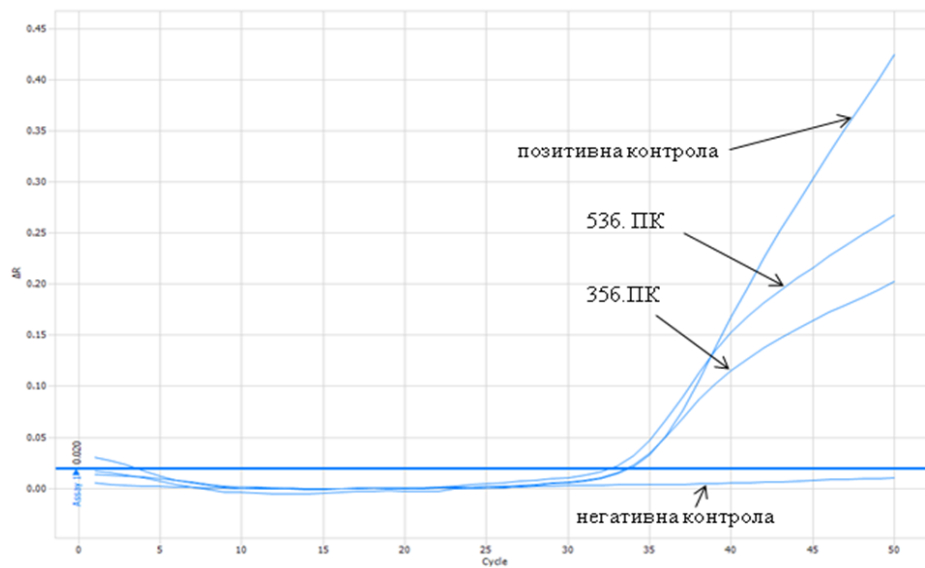
В допълнение, разширихме анализа на маркера *PCA3* чрез приложението на друга методика на амплификация в реално време (real time PCR), с помощта на която се оценява количествено нивото на *PCA3* експресия.

Бяха изпробвани 2 варианта на метода чрез SYBRgreen mix амплификация и чрез използване на TaqMan*PCA3* probe и Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster

City, CA), като за диагностични цели се спряхме на варианта с TaqMan $PSA3$ probe. На Фигури 3 и 4 са показани резултати от real time PCR на $PSA3$ маркера.



Фигура 3. Резултати от $PSA3$ тумор-специфична експресия в различни видове биологични проби чрез real time PCR с TaqMan $PSA3$ проба.15п.ПК- свежа тъкан от простатектомия; 103б. и 102б.ПК –”tru-cut “ биопсии; 24-уринен седимент.



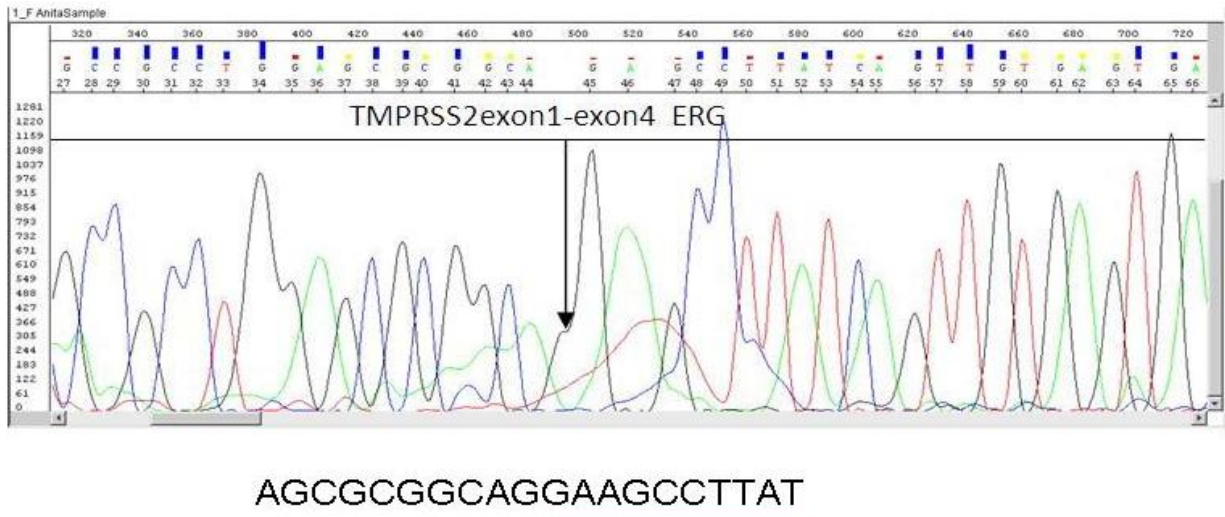
Фигура 4. Резултати от $PSA3$ тумор-специфична експресия в ”tru-cut “ биопсии чрез real time PCR с TaqMan $PSA3$ проба: позитивен стандарт за ПК; ”tru-cut “ биопсии 53б. и 35б. на пациенти с ПК и негативна контрола.

1.2. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-биологична техника за анализ на $T2-ERG$ фузионните транскрипти.

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

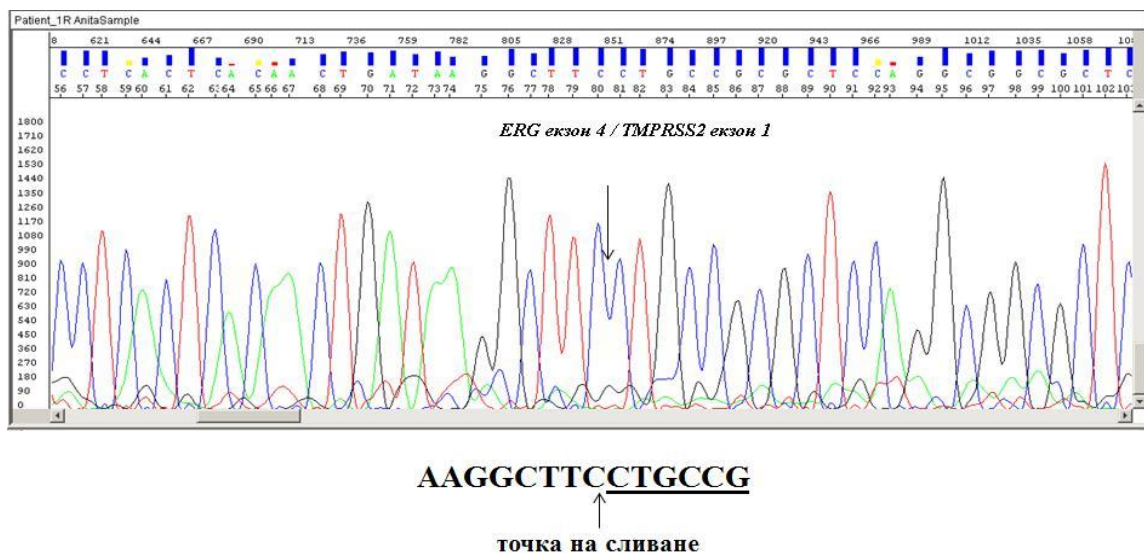
В хода на разработката, използвахме като стандарт клетъчна линия ПК, експресираща *T2-ERG* фузионен вариант. При наличие на фузионен транскрипт се получава амплификационен продукт 180бд., който се подлага на секвениране за идентифициране точката на сливане на двата гена.

На Фигура 5 е показан секвенционен профил на *T2-ERG* фузионен вариант, получен при амплификация на контролната клетъчна линия ПК.



Фигура 5. Секвенционен профил на най-честата *TMPPRSS2ex1-ex4ERG* фузия в контролна проба клетъчна линия от ПК. Стрелката обозначава точката на сливане между двата гена.

На Фигура 6 е показана *T2-ERG* фузия детектирана при наш пациент с ПК.



Фигура 6. Секвенционен профил, представящ точката на сливане на гените *TMPPRSS2* и *ERG* при пациент с ПК.

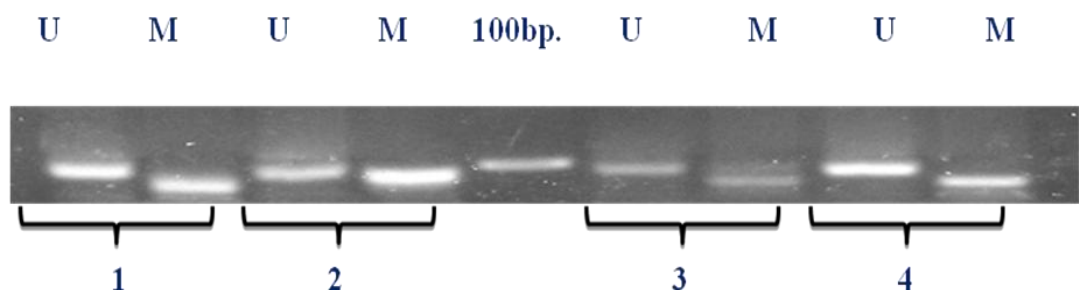
В анализираната от нас група български пациенти беше детектиран само един вариант на фузионен транскрипт, идентичен с показания по-горе на Фигура 6. Този вариант е аналогичен на наблюдавания в контролната проба (виж Фигура 5), попада в същите екзони (екзон 1 на *T2* и екзон 4 на *ERG* гените) и спада към най-честите фузионни транскрипти с диагностична значимост. За проверка на копи ДНК синтезата беше използван същият хаускипинг ген *B2M*, както при *PCAZ* анализа (виж глава „Материали и Методи“).

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

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

Уринните проби са по-бедни на клетъчен материал и ДНК концентрацията е значително по-ниска, поради което увеличихме двойно изходната ДНК при бисулфитното конвертиране. Същият протокол беше използван и за кръвни проби.

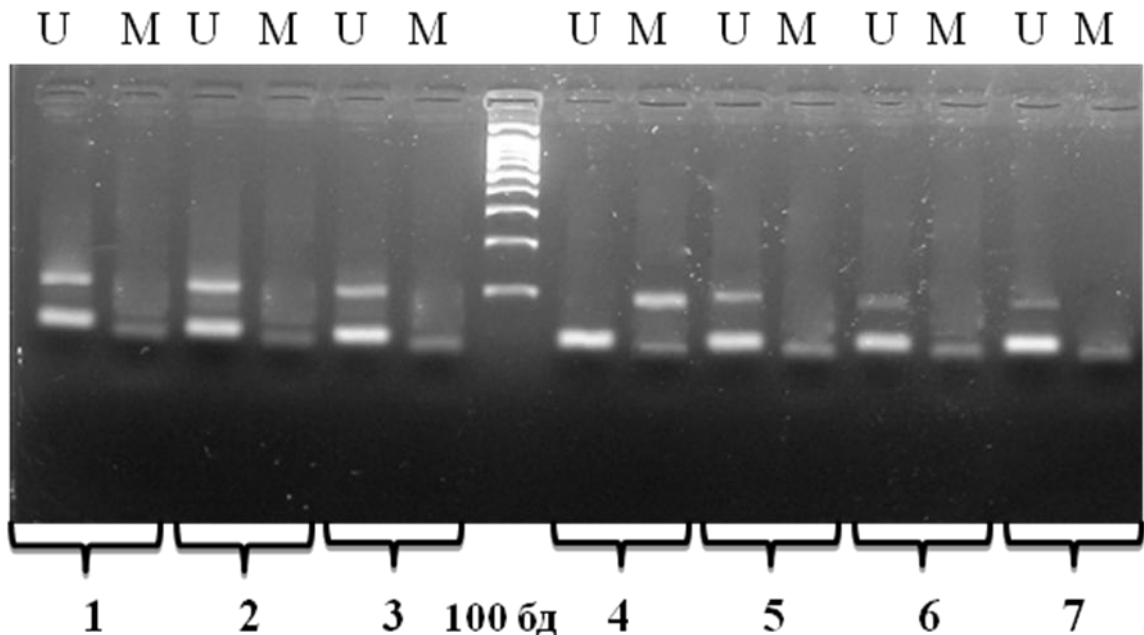
На Фигура 7 е показана снимка на агарозен гел с профил на *GSTP1* промоторно хиперметиране.



Фигура 7. Агарозен гел, представящ получените метилрани и неметиранни фрагменти при анализ на промотора на гена *GSTP1*.

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

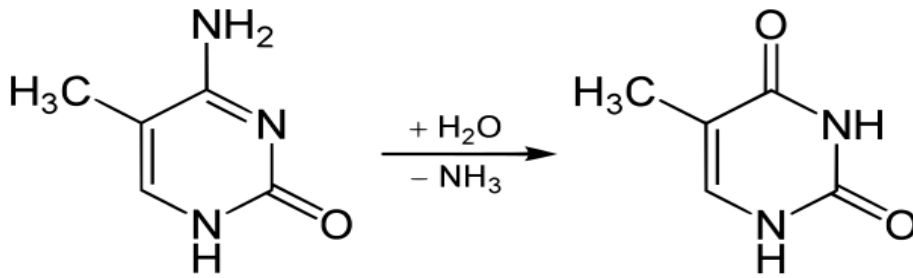
На Фигура 8 е представен резултат от анализ на *GSTP1* промоторно хиперметиране в различни проби от изследваните пациенти.



Фигура 8. Агарозен гел, представящ промоторно хиперметиране на *GSTP1* гена в различни проби.

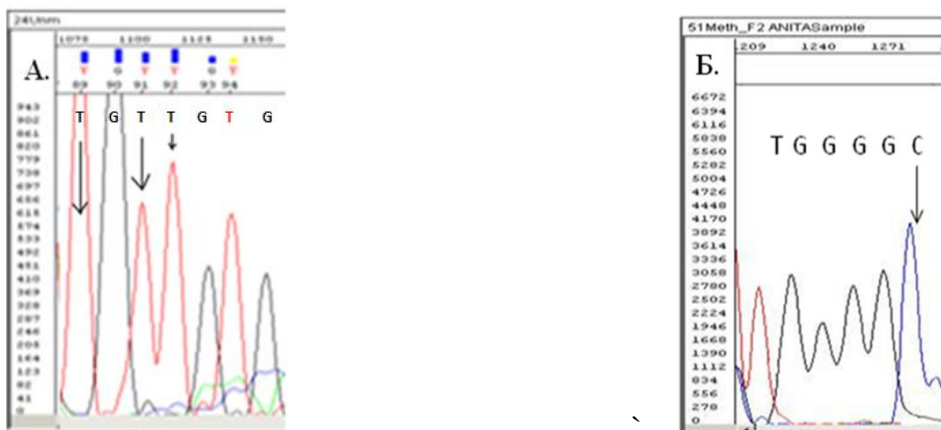
- 1- 3). Пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия (ДПХ).-биопсичен тур.
 - 4). Пациент с рак на простатата – “tru-cut”биопсия- (първоначален стадий)
 - 5= 4). Венозна кръв от пациент с рак на простатата. (първоначален стадий)
 - 6-7). Пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия (ДПХ).-уринен седимент.
- U-неметиран алел (норма) M –метиран алел, доказателство за неопластичност.

След провеждане на MS-PCR, проведихме секвениране на специфичните алели с цел потвърждаване на специфичността на MS-PCR метода. Метираните и неметираните алели се модифицират различно в присъствието на натриев бисулфит [Clark et al., 1994]. Натриевият бисулфит конвертира цитозиновите остатъци до урацилови остатъци в едноверижни ДНК фрагменти, докато метилираният цитозин (5-метилцитозин) остава непроменен. В хода на последващата амплификация цитозиновите остатъци представляват метилирани остатъци в изходната верига, докато неметираният цитозин, конвертиран в урацил се детектира като тимин в получения амплификационен продукт. По този начин бисулфитното конвертиране позволява визуализиране и разграничаване на метиран от неметиран фрагмент. Метираният хомолог е неактивен, докато неметираният е транскрипционно активен (Фигура 9).



Фигура 9. Мутагенеза чрез дезаминиране на 5-метил цитозин до тимин.

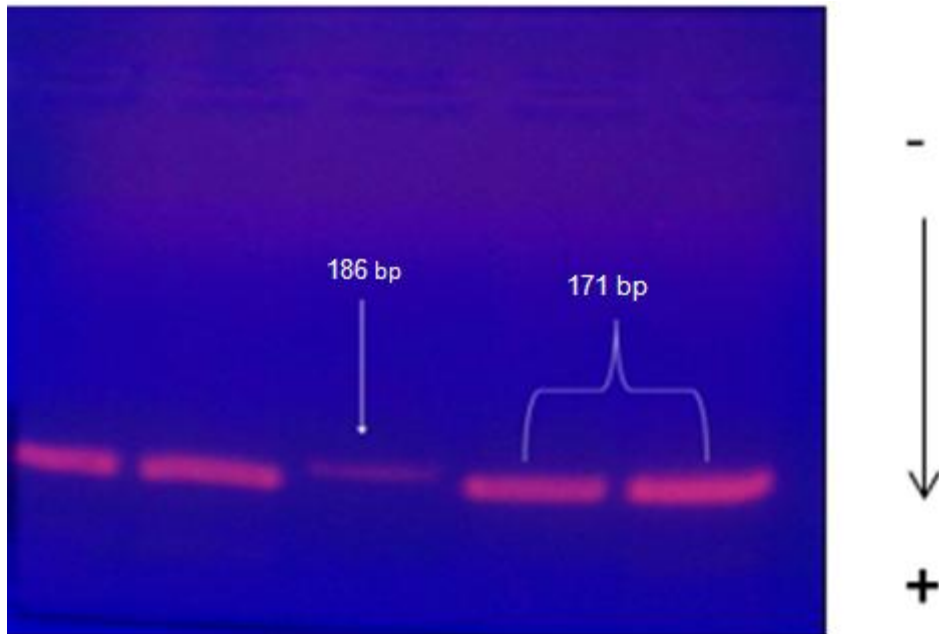
Резултат от бисулфитно конвертиране при пациент от нашата извадка е представен на Фигури 10 А и Б. Върху приложената част от секвенция се наблюдава наличие само на Т бази (червени пикове) и липса на Ц бази в местата на CpG островите, което доказва на секвенционен ниво характерният профил на неметиран *GSTP1* алел. При секвенционния анализ на метилирания (неопластичен) алел, се наблюдава профил с наличие на запазени С бази в CpG островите.



Фигура 10. Секвенционен профил на *GSTP1* алел в промоторната област на гена след бисулфитно конвертиране : А неметиран *GSTP1* алел; Б метилиран *GSTP1* алел.

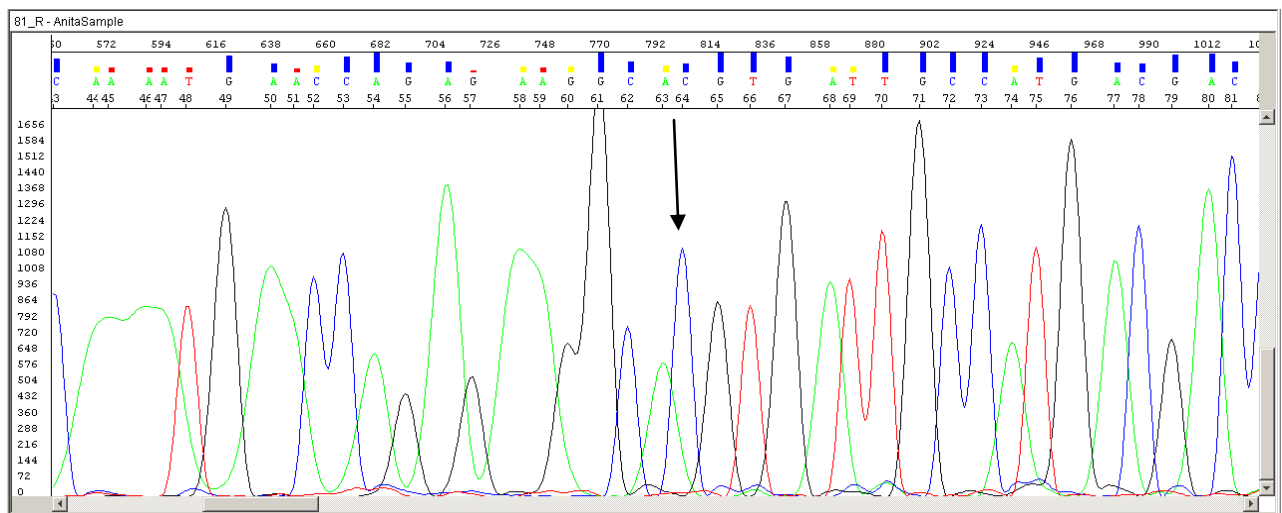
1.4. Въвеждане и оптимизиране на методика за анализ на IVS1-27:G/A полиморфизма в *KLF6* гена.

Амплификационният продукт с размер 171бд е представен електрофоретично на Фигура 11.



Фигура 11. Гел електрофореза на *KLF6* амплификационен продукт – 171бд.

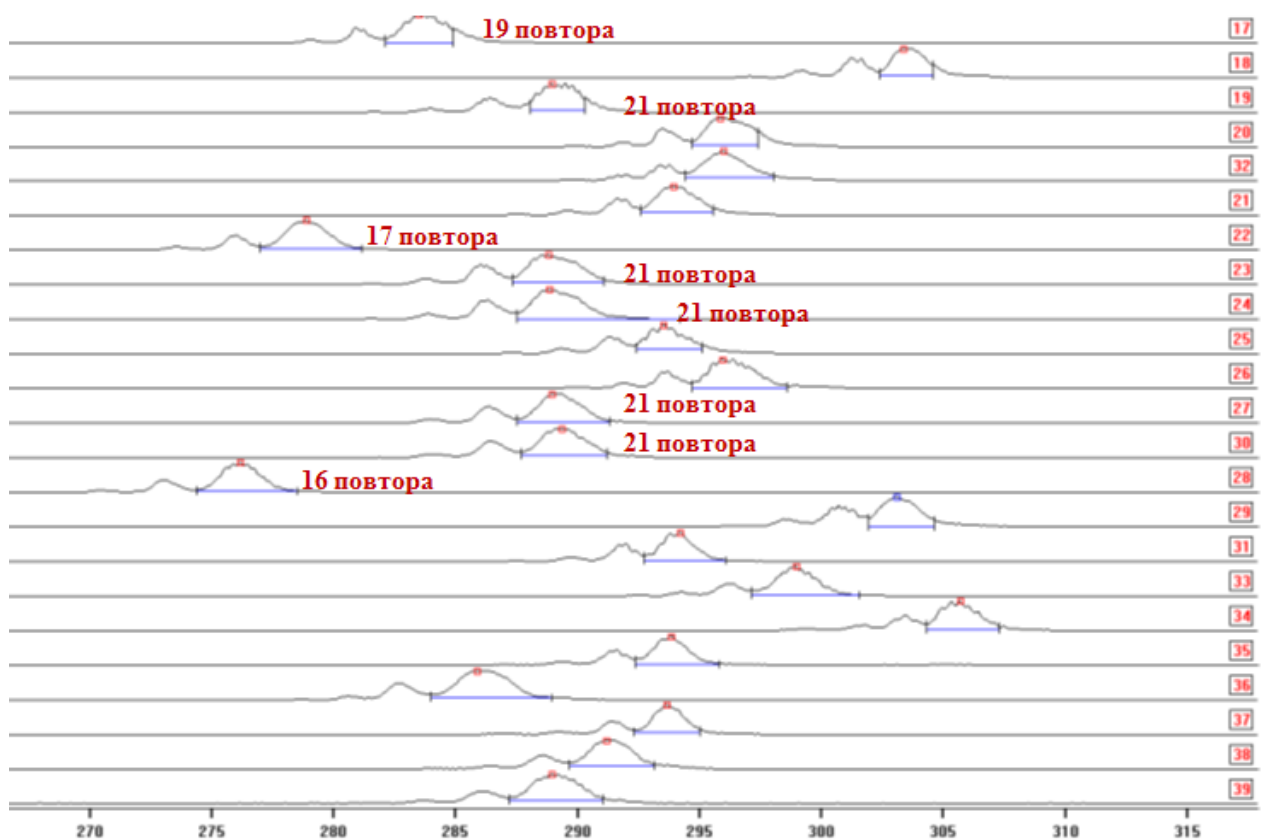
На Фигура 12 е показан секвенционният профил на *KLF6* фрагмента, съдържащ таргетния участък за IVS1-27:G>A полиморфния вариант.



Фигура 12. Секвенционен профил на фрагмент от *KLF6* гена, съдържащ полиморфизма IVS1 -27:G>A. Нормален генотип.

1.5. Секвениране на *AR* гена (екзон 1-екзон 8).

Всички изследвани проби в разработката показаха нормален генотип по отношение на *AR* гена. Всички налични кръвни проби (56бр.) от пробандите с диагноза ПК, бяха изследвани за големината на триплетния (CAG)*n* повтор, локализиран в екзон 1 на *AR* гена. Вариациите в броя повтори се асоциира с вродено предразположение към болестта простатен карцином, като за критична точка се приема брой повтори ≤ 22 . Има данни за асоциация на значително по-къс *AR* (CAG) повтор $n = 14/15$ или $<14/15$ и наличие на агресивен клиничен ход на заболяването. На Фигура 13 е електрофоретичен профил на *AR* (CAG)*n* повтора в серия от ПК пробанди.



Фигура 13. Електрофоретичен профил на (CAG)*n* повтори в *AR* при ПК пробанди (ALF Express). С червено са отбелязани профилите на пациенти с *AR*(CAG)*n* ≤ 22 , която се приема за критична точка. Такъв генотип се асоциира с вродена предразположеност към ПК.

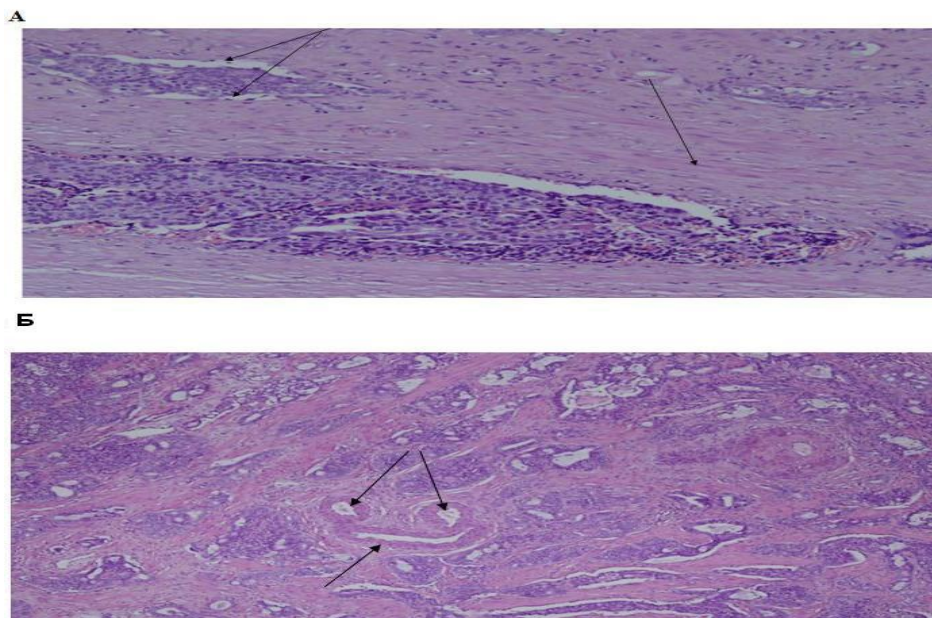
1.6. Приложение на разработените методи за изследване на тумор-специфичните маркери за диагностика и контрол на заболяването при български пациенти с ПК или други патологии на простатната жлеза: ДПХ и хронично възпалително заболяване (простатит).

Обект на настоящето проучване са 101 спорадични пациенти с ПК, обособени в две основни групи: агресивен ПК и неагресивен ПК. Наред с клиничните и хистологични данни при пациентите бяха проведени молекулярно-генетични изследвания с набор от молекулни маркери за оценка на тяхната диагностична и прогностична стойност. Клиничните, хистологични и молекулни данни за подгрупите с агресивен и неагресивен ПК са представени в Таблица 2 и Таблица 3 по-долу.

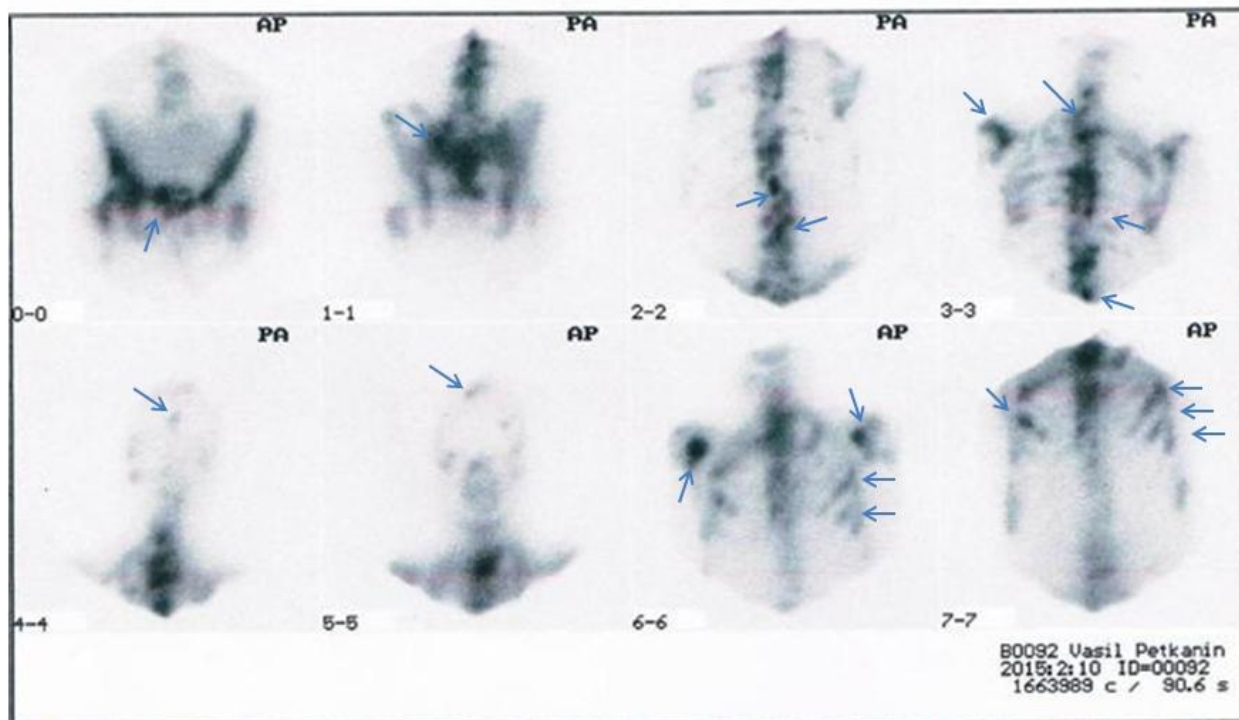
Комбинацията от маркери *PCA3*, *T2-ERG* фузии и *GSTP1* промоторно хиперметиране беше изследвана също в 2 допълнителни клинични групи (зdravi по отношение на ПК): ДПХ (25 пациента) и хронично възпалително заболяване на простатата/простатит (24 пациента). Получените резултати са представени по групи.

I. Агресивен ПК (16 пациента):

Хистологичните и клинични резултати в изследваната група пациенти показаха наличие на агресивен подтип ПК, включващ перинеурална и периваскуларна инфилтрация (Фигура 14 А и Б), както и метастази в черепа и скелетните кости (Фигура 15).



Фигура 14. А. Наличие на простатни туморни клетки в лимфни цепки, умерено-диференциран тумор; **Б.** Хистологично изображение на ПК. Наличие на периваскуларни туморни инфилтрати; туморни огнища и артериални съдове. GS 4+3=7, умерено-диференциран тумор.



Фигура 15. Костна скитинграфия. Радиофармацевтик ^{99m}Tc -MDP Въведена активност 700 MBq. Фокуси на повишена фиксация: илиачни кости, десен ацетабулум, големи трохантери, главички на раменни кости, ребра-двустранно, гръбначен стълб –на почти всички нива; черепни кости – теменна кост в ляво.

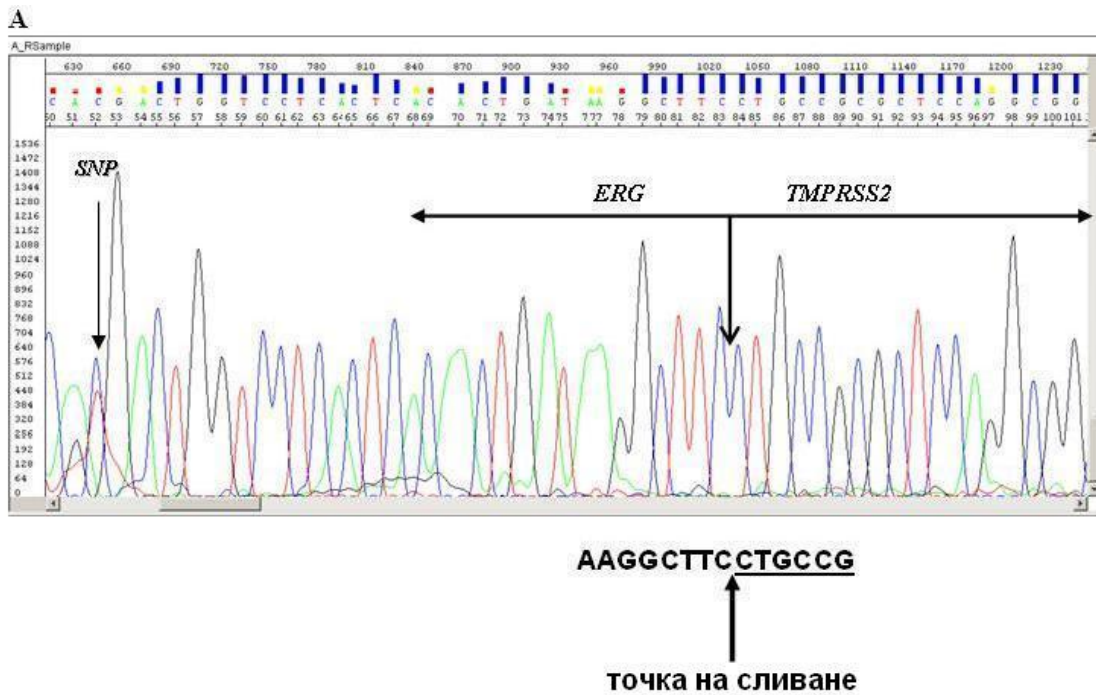
По-голяма част от пациентите (1-13, Таблица 2) в агресивната подгрупа имат кастрация резистентен простатен карцином (КРПК) със строго хормонално-резистентно поведение през периода на лечение, базирано на индивидуалния отговор след прилагането на андроген потискаща терапия (АПТ). Пет пациента се характеризират с андроген-податлив ПК, неблагоприятна прогноза и висок риск за биохимичен рецидив (Таблица 2, #14-18).

PCSA3 експресия: Всички с изключение на двама пациента от тази група (# 9 и # 10 от които липсват тъканни проби за анализ) показаха *PCSA3* свръхекспресия, оценена с помощта на real time qPCR метод. Пациенти # 9 и # 10 бяха включени в проучването на по-късен етап, след провеждане на АПТ, поради което тъканните проби при първично диагностициране на ПК, не бяха налични за молекулярен анализ.

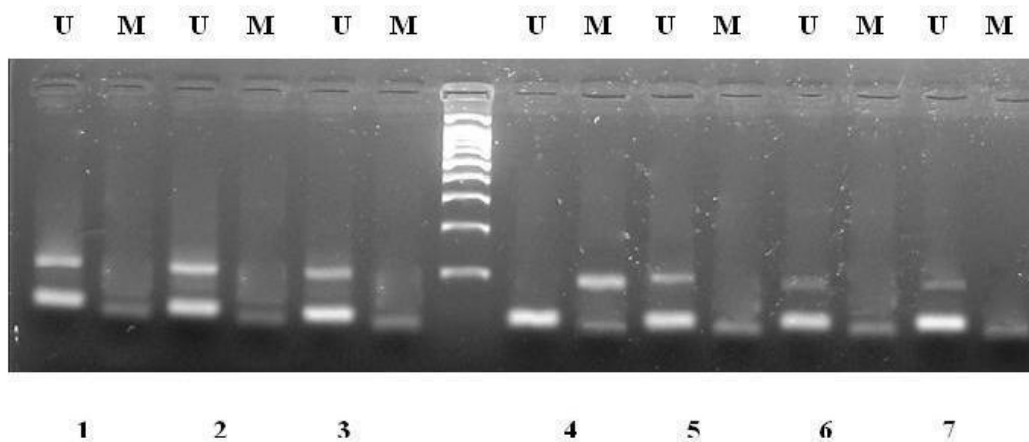
Изследваните уринни проби след АПТ при пациенти # 9 и # 10 бяха *PCAZ* негативни. Завишени *PCAZ* експресионни нива бяха детектирани и в 4 кръвни проби (Таблица 16 #1, 2, 3 и 16).

Експресионен анализ на *TMPRSS2:ERG* генни сливания: Около 18,2% от пациентите с простатен карцином в изследваната извадка показаха *T2-ERG* позитивен фузионен статус. Беше детектиран само един тип фузионен транскрипт: *TMPRSS2* екзон 1 фузира към *ERG* екзон 4 (Фигура 34А). В един от пациентите с позитивен *T2-ERG* фузионен статус, секвенционният анализ детектира и синонимна замяна, полиморфизъм с.51G>A, р.Ser17Ser (Фигура 34А). *T2ex1-ERGeX4* позитивен фузионен статус беше намерен във всички тъканни проби от агресивната ПК група. Позитивен *T2ex1-ERGeX4* фузионен статус беше наблюдаван в пациентите, изследвани преди АПТ, но пациенти # 9 и # 10, тествани след АПТ, показаха негативен фузионен статус в урина. Наличие на *T2ex1-ERGeX4* фузия в кръвни проби беше наблюдавано само при трима пациенти (Таблица 2 #1, 7 и 16).

Хиперметиране на *GSTP1* генен промотор: Тази епигенетична мутация беше детектирана при всички пациенти във всички изследвани проби, включително в кръв (Фигура 16 Б).



Б



Фигура 16А. Секвенционен профил на *TMPRSS2ex1-ERGex4* фузия детектирана в “tru-cut” биопсия с GS /7/ простатен тумор; наличие на полиморфизъм с.51G>A, р.Ser17Ser.

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

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

В една кръвна проба (Таблица 2 # 1) беше детектиран тройно позитивен молекулен профил за *PCA3*, *GSTP1* и *T2ex1-ERGex4*.

AR и IVS1-27G>A профил: В цялата група от 18 пациента с агресивен ПК не бяха открити соматични мутации в *AR* гена и всички анализирани пациенти показаха

нормален генотип по отношение на *IVS1-27G>A* полиморфния вариант в *KLF6* гена. Наблюдаваният нормален генотип по отношение на *IVS1-27G>A* полиморфния вариант във всичките 16 пациента с агресивен ПК противоречи на публикуваните данни в други популации за висока честота на мутантния алел при ПК пациенти [Goutham et al., 2008].

По отношение на негативния резултат относно соматични мутации в *AR* гена, нашите резултати потвърждават хипотезата, че *AR* мутациите са сравнително редки събития при ПК и КРПК пациенти [Eisermann et al., 2013], въпреки очаквания индуциран мутационен ефект от АПТ (Taxotere (Docetaxel), Xgeva (Denosumab), Zytiga (Abiraterone Acetate) + Deltasone (Prednisone), Zometa (Zoledronic acid), и др.).

AR (CAG) n дължината на повтора беше проучена в 56 пациента с ПК, (във всичките 18 КРПК пробанда и в 38 с индолентен ПК) от които разполагахме с кръвни проби. Беше установена дължина на (CAG)n повторите ≤ 22 (критичната точка) в 41 % от изследваните пациенти. Този резултат доказва наличието на вродена предизпозиция към заболяването ПК при тези пациенти. До момента няма строги препоръки от световната общност по онкологична медицина за скрининг на *AR*(CAG) n дължината, но все по-често се обсъжда подобна възможност. На база получените резултати, екипът ни подкрепя идеята за въвеждането на *AR* (CAG) n към високоинформативните маркери за вроден повишен риск от развитие на ПК, както и за молекулярно профилиране на болестта.

В таблица 4 са представени таблично резултатите по отношение дължината на *AR* (CAG) n повтора.

Таблица 4. Дължина на *AR*(CAG)n повтора в извадка от 56 пациента с ПК.

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

Всички пробанди в тази група, изследвани преди АПТ бяха позитивни за *PCa3* свръхекспресия, *T2ex1-ERGe4* фузия и *GSTP1* промоторно хиперметиране. *T2-F1/ERG-R4* фузионен транскрипт беше преимуществено детектиран при пациенти с по-

висока хистологична степен по Gleason GS /7/, /8/ и /9/, респективно умерено и слабо диференцирани тумори. Такива данни са докладвани и в литературата [Yoshimoto et al., 2008; Shen et al., 2010; Tomlins et al., 2007; Rajput et al., 2007]. *T2ex1-ERGe4* фузия беше открита само в един пациент с наличие на тумор, хистологично определен, като GS 6 степен, която се асоциира принципно с по-добра прогноза. Беше установена позитивна асоциация между *T2-F1/ERG-R4* фузионен статус в извадката и по-висок туморен стадий (оценен по TNM, като T3 и T4), докато в T2 стадий, подобна асоциация не беше открита.

Детектираният единичен нуклеотиден полиморфизъм 51G>A, p.Ser17Ser (Фигура 16А) при пациент с позитивен фузионен статус е с неясна значимост и отношение към ПК и клиничната прогноза. По литературни данни този полиморфизъм не се смята за асоцииран с ПК. Все пак, предвид хипотезата за комбинирания ефект на многобройни полиморфни варианти върху патогенезата на ПК и безспорната хетерогенност на тази неоплазма, не изключваме възможността за връзка.

Най-вероятно *GSTP1* промоторното хиперметиране представлява най-ранната епигенетична промяна, индикираща злокачествени простатни изменения и най-дълго персистиращият маркер в периферна кръв. Появата на *GSTP1* промоторното хиперметиране в кръвта го прави подходящ маркер за проследяване на ефекта от лечението.

Появата на *GSTP1* хиперметиран неопластичен алел в кръвта подсказва процес на формиране на микрометастази и последващото им разпространение. При двама от пациентите (#1 и 16, Таблица 2) установихме тройно позитивен резултат за *GSTP1* промоторно хиперметиране, *TPMRSS2-ERG* фузия и *PCA3* свръхекспресия в кръв. Такъв резултат би могъл да се интерпретира, като индикация за изразена миграция и разпространение на простатни туморни клетки в кръвната циркулация.

Пациент #1 беше подложен на АПТ с Docetaxel и след едногодишна терапия резултатите от молекулярно-генетичните изследвания показаха наличие единствено на *GSTP1* промоторно хиперметиране в кръвта. Контролният молекулен профил се приема, като доказателство за добър индивидуален отговор към назначената терапевтична схема, което съвпада с резултатите от клиничните наблюдения. При пациент #16, тройно позитивната кръвна проба за молекулните маркери в комбинация с

лоша клиничко-хистологична прогноза персистираща до ПК-асоцииран летален изход. Появата на молекулните маркери в кръвта беше разглеждана като предпоставка за микрометастатичен ПК.

Циркулиращите микрометастази биха могли да се развият в метастази с последващо разпространение в близко и далечно разположени тъкани и често заемат неслучайни локализации, предимно в кости и централна нервна система (ЦНС) [Shen et al., 2010], както беше демонстрирано в 5 от представените ПК случаи (# 2, 3, 9, 14, 16, Таблица 2).

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

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

PCSA3 експресия: *PCSA3* свръхекспресия беше детектирана при 75 пациента от тази група (75/83=90.4%). Останалите *PCSA3* негативни пациенти показаха ПСА серумни нива между 3,0-10,0 нг/мл и тумори с GS 4-6. Детектираните *PCSA3* завишени експресионни нива в 90,36% от пациентите в индолентната ПК група потвърждава високата специфичност на маркера, както и предикативната му стойност. Липсата на *PCSA3* експресия в 8 пациента с диагноза първичен ПК (ПСА стойности в сива зона 3,0-10нг/мл; Gl.score /4-6/) се обяснява с данните за наличие на 3-5% *PCSA3* негативни ПК пациенти, дължащо се на разлики в пробовземането, качеството на биологичния материал и др.

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

интерпретира едновременно с допълнителни хистологични, клинични и молекулни находки.

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

III. ДПХ (25 пациента):

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

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

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

Хиперметиране на *GSTP1* генен промотор: В 9 от 25 пациента с ДПХ (36%) беше детектирано *GSTP1* промоторно хиперметиране. Вероятно наблюдаваният резултат се дължи на наличието на допълнителни патологични промени

при тези пациенти, като простатни интраепителни неопластични (ПИН) лезии и кистозни промени на простатната жлеза, установени хистологично.

Повечето от изследваните молекулни маркери в ДПХ групата бяха негативни, което съвпада с публикуваните данни [Bussemakers et al., 1999; Wang et al., 2006]. Единствено *GSTP1* промоторно хиперметиране беше детектирано в 36% от ДПХ пробандите. Пациентите с положителна *GSTP1* епигенетична мутация показаха и присъствие на ПИН III-та степен, както и кистозни промени в простатната жлеза. Подобни открития бяха докладвани и преди за >70% от случаите с ПИН и ПИА, които се разглеждат понастоящем, като преканцерозни лезии [Brooks et al., 1998; Nakayama et al., 2003].

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

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

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

PCA3 експресия и анализ на *TMPRSS2-ERG* генни сливания: Цялата група беше негативна по отношение на *PCA3* експресия и *TMPRSS2-ERG* фузионен статус.

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

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

Клиничните, хистологични и молекулни данни за подгрупите с агресивен и неагресивен ПК са представени в Таблица 2 и Таблица 3. Резултатите от различни аспекти на болестта в групата с агресивен ПК (Таблица 2) бяха подробно дискутирани по-горе, но тук са изложени най-важните акценти.

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

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

В $\frac{1}{4}$ от групата бяха открити допълнителни клинично-патологични характеристики на агресивност: семенно-везикуларна, ангио-лимфна и лимфонодална инвазия, както и наличие на дуктален инвазивен ПК. Именно в група пациенти са „концентрирани” предимно случаите с по-висок туморен стадий Т3-Т4, наличие на многобройни черепни и костни метастази и/или ПК-свързан летален изход.

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

Появата на ПК специфични маркери в тъканни, неинвазивни проби и най-вече в кръвотока (Таблица 2) при пациенти с наличие на многобройни метастази, авансирал стадий и неблагоприятна прогноза, доказаха високата им диагностична стойност и ефективност.

В групата на индолентния ПК (таблица 3) най-много пациенти попадат в сивата зона на ПСА (3.0-10.0) с високо-диференцирани тумори с GS 4-6 и ~ 80% от пациентите

се характеризират с първичен, локален и органно-ограничен простатен карцином. Малкото изключения (Таблица 3) с регионален ПК и екстракапсулно разпространение бяха строго мониторирани чрез чести контролни изследвания и показаха индолентен клиничен ход на болестта и много добър терапевтичен отговор.

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

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

Таблица 2. Молекулен профил и клиникопатологични параметри при 18 от 101 български пациента, формиращи агресивна ПК подгрупа.

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

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

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

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

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

Таблица 3. Молекулни и кликопатологични характеристики при пациенти с първичен индолентен ПК.

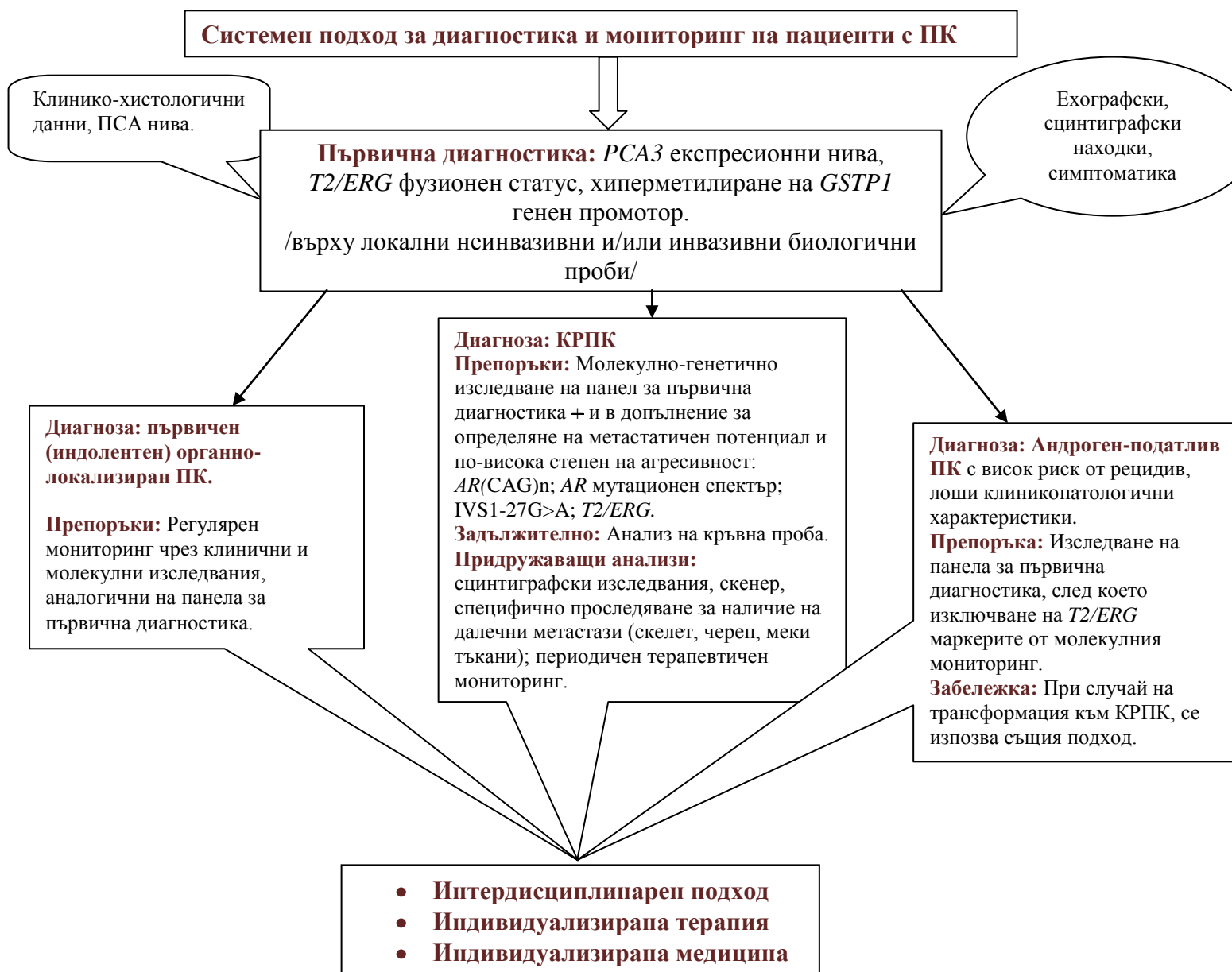
Кликопатологични параметри	Брой случаи	<i>TMPRSS2ex1-ERGex4</i> фузия	<i>PCA3</i> свръхекспресия	<i>GSTP1</i> промоторно хиперметиране
PSA нг/мл				
0.0-3.0	0(83)	----	----	----
3.0-10.0	43(83)	липсва	35 (83) *	43(83)
10.1-20	13(83)	липсва	13(83)	13(83)
20.1-85.0	27(83)	липсва	27(83)	27(83)
Хистологична степен по Gleason		липсва		
/4-6/	51	1(51)**	43(51) *	51(51)
/7/	21	липсва	21(21)	21(21)
/8-9/	11	липсва	11(11)	11(11)
Патологичен стадий	66		19(19)	19(19)
Локален/ Органно ограничен	(pT2a)19 (pT2b)8	липсва	8(8)	8(8)
Регионален/ Екстракапсулно разпространение	14 (pT3a)5 (pT3b)3	липсва	5(5) 3(3)	5(5) 3(3)
Авансирал/разпространение към семенни везикули	3	липсва	3(3)	3(3)
Бележки	----	<i>TMPRSS2ex1-ERGex4</i> фузионен транскрипт беше открит в 1(83) проби. 0.83%	<i>PCA3</i> завишени нива бяха детектирани в 75(83) ПК проби. 90,361%	<i>GSTP1</i> промоторно хиперметиране беше детектирано в 83(83) ПК проби. 100%

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

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

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

На базата на проведеното проучване на някои молекулно-генетични характеристики на ПК в комбинация с клинични и хистологични данни, разработихме системен подход за диагностика и мониторинг на ПК при български пациенти. Системният подход е представен схематично на Фигура 17.



Фигура 17. Системен подход за диагностика и мониторинг на ПК при български пробанди.

1.8.1. Първична диагностика:

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

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

1.8.2. При наличие на агресивен КРПК подтип карцином:

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

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

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

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

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

В случай, че след продължителна терапия в ПК профила настъпи промяна към КРПК е наложително да се изследват всички маркери, включително *T2-ERG* в комбинацията, описана по-горе в 1.8.2.

1.8.4. Интердисциплинарен подход за индивидуализирана терапия на ПК.

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

1.9. Обобщение на получените резултати.

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

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

Получените резултати от настоящето проучване показват, че *T2-ERG* фузии се откриват при 18,18% от пациентите с диагноза ПК в изследваната извадка български пациенти. Този % е значително по-нисък от докладваните ~60% за други популации [Wang et al., 2006; Perner et al., 2006]. Разликата би могла да се дължи на дизайна на анализа, при който сме подбрали да анализираме най-често срещаните фузии с клинична значимост върху ПК.

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

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

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПК е една от най-широко разпространените неоплазми и преобладаваща причина за мъжка смъртност в Света. Представява хетерогенно заболяване с вариabilно клинично-патологично поведение, което може да остане индолентно десетилетия или да бъде животозастрашаващо с прогресивен летален изход. Характеризира се с поликлонален характер и комплекса predisпозиция, която се дължи на множество хромозомни локуси, съдържащи потенциални рискови варианти с ниска самостоятелна пенетрантност.

По най-нови прогнозни данни на Националния онкологичен център в България за 2015г. се очакват ~ 2783 новорегистрирани случая с ПК и ~ 949 починали от болестта.

Като генетични маркери с най-висок потенциал за ранна диагностика и молекулно профилиране на ПК се приемат: епигенетични мутации; генни сливания; иРНК флукутации и промени в генната експресия.

Обект на настоящата разработка бяха набор от молекулни маркери: *PCAZ*, *TMPRSS2-ERG* фузии, *GSTP1* промоторно хиперметиране, *IVS1-27G>A*, *AR(CAG)_n*, както и *AR* мутационен статус.

Нашата цел беше насочена към комбиниране на генетичните резултати с клинично-хистологични данни за оптимизиране на системен подход за ранна диагностика на ПК и изясняване поведението на рака при конкретния индивид.

Бяха въведени методики за молекулярно-генетичен анализ на изброените специфични молекулни маркери. Чрез прецизирането на системен алгоритъм за ранна диагностика, профилиране и мониторинг на заболяването бяха охарактеризирани 101 пациента с ПК, които получиха шанс за индивидуализирана терапия.

PCAZ свръхекспресия се установи при 90.4% от пробандите с неагресивен ПК и 100% с агресивен ПК (общо 95,2%). Липсата на маркера в останалите клинични групи потвърди специфичността и диагностичната му стойност.

T2/ERG фузия беше диагностицирана преобладаващо в групата с агресивен КРПК, по-висока хистологична степен GS /7,8,9/ и допълнителни неблагоприятни хистологични параметри, авансирал туморен стадии. Наблюдаваните резултати недвосмислено доказват позитивната асоциация на маркера с агресивността на заболяването.

По-ниската честота на *T2-ERG* позитивен фузионен статус 18,18% в сравнение със световните данни би могъл да се дължи на по-малката пациентска извадка или дизайна на анализа, при който сме подбрали да анализираме най-често срещаните фузии с клинична значимост върху ПК.

GSTP1 промоторно хиперметиране беше детектирано в 100% от неагресивните ПК пробанди. Повечето от пациентите в групата бяха с първичен ПК в съвсем начална фаза. Вероятно *GSTP1* промоторното хиперметиране е високо специфичен маркер, представляващ една от най-ранните епигенетични промени в простатната жлеза, който допринася за детекция на малигненост в хода на заболяването.

Полиморфният маркер IVS1-27G/A в *KLF6* гена не беше открит в изследваните КРПК пациенти въпреки цитираната честота ~18% за други популации. Резултата е обясним, предвид малката КРПК клинична група от 18 пациента, включена в проучването. Не установихме соматични мутации в *AR* гена въпреки АДТ при същата група пациенти. Използваният от нас метод на директно секвениране покрива до голяма степен мутационния спектър на *AR* гена, но въпреки това остават генетични изменения, като например copy number мутации или микроделеции, които изискват друг метод за анализ.

При 41% от ПК пациентите установихме дължина на (CAG)_n повтора в *AR* гена ≤ 22 , която се приема за критична точка. По-къси алели се асоциират с повишен риск от развитие на ПК.

Появата на туморспецифичните молекулни маркери в кръвта беше разглеждана, като неблагоприятен прогностичен белег за микрометастатично разпространение на ПК и предпоставка за развитие на далечни метастази.

Получените резултати от настоящето проучване показват, че панела от молекулярно-генетичните маркери, застъпени в разработката може да се използва успешно за по-добра диагностика и мониторинг на пациенти с ПК. Молекулярно-генетичните резултати трябва да се интерпретират едновременно с клинично-хистологичната анамнеза. При позитивен статус от молекулярно-генетичните изследвания би могло да се улесни разграничаването на метастатичен от индолентен подтип ПК. Появата на ПК-специфични молекулни маркери в периферна кръв (без използване на техники за набогатяване на проби) сочи, че молекулярният аспект на простатната неоплазма е много важен за стриктното мониториране, избор на адекватно лечение и проследяване на индивидуалния терапевтичен отговор на пациентите.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. БЪЛГАРСКА ЛИТЕРАТУРА:

1. Валерианова и сътр. (2014) Том XXIII. 47-49.

2. ЧУЖДОЕЗИЧНА ЛИТЕРАТУРА:

1. Foster et al. (1999) *BJU Int.* 83(2):171-94.
2. Clark et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22(15):2990-7.
3. Eble et al. (2004) *Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 162-208.
4. Rosai et al. (2011) *Surgical Pathology.*
5. NICE clinical guideline (2014) *Prostate cancer: diagnosis and treatment.*
6. Arlen et al. (2008) *Urol.* 179(6): 2181-2185.
7. Heidenreich (2008) *Eur Urol.* 54 (5): 976-977.
8. Jan-Erik et al. (2008) *Prostate cancer.*
9. Shah et al. (2012) *Prostate biopsy interpretation: An illustrated guide.*
10. Rosai et al. (2011) *Surgical Pathology.*
11. O'Dowd et al. (2001) *PCRI Insights.* 4:1.
12. Tabesh et al. (2007) *IEEE transactions on medical imaging.* 26:1366-1378.
13. Thomas et al. (2008) *Nat Genet.* 40(3):310-5.
14. Eeles et al. (2008) *Nat Genet.* 40(3):316-21.
15. Edwards et al. (2004) *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 129 C (1):65-73.
16. Freedman et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(38):14068-73.
17. Schumacher et al. (2007) *Cancer Res.* 67(7):2951-6.
18. Yeager et al. (2007) *Nat Genet.* 39(5):645-649.
19. Gudmundsson et al. (2007) *Nat Genet.* 39(5):631-7.
20. Gudmundsson et al. (2007) *Nat Genet.* 39(8):977-83.
21. Thomas et al. (2008) *Nat Genet.* 40(3):310-5.
22. Long-Cheng et al. (2007) *Frontiers in Bioscience.* 12: 3377-3397.
23. William et al. (2009) *Endocrinology.* 150(9): 3991-4002.
24. Long-Cheng et al. (2007) *Frontiers in Bioscience.* 12:3377-3397.
25. Li et al. (2000) *Cancer Res.* 60:702-6.
26. Sasaki et al. (2002) *J Natl Cancer Inst.* 94:384-90.
27. Jarrard et al. (1998) *Cancer Res.* 58:5310-4.
28. Nojima et al. (2001) *Cancer.* 92:2076-83.
29. Yegnasubramanian et al. (2004) *Cancer Res.* 64:1975-86.
30. Bott et al. (2005) *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 8:321-326.
31. Nguyen et al. (2000) *Prostate.* 43:233-42.
32. Verkaik et al. (1999) *Int J Cancer.* 80:439-43.
33. Verkaik et al. (2000) *Lab Invest.* 80:1291-8.
34. Vis et al. (2001) *Mol Urol.* 5:199-203.

35. Kito et al. (2001) *Prostate*. 49:110-5.
36. Enokida et al. (2005) *Clin Cancer Res*. 11:6582-8.
37. Zhou et al. (2004) *J Urol*. 171:2195-8.
38. Jeronimo et al. (2003) *J Clin Pathol*. 56:52-5.
39. Nelson et al. (1997) *Cancer Res*. 57:35-7.
40. Wu et al. (2004) *Oncogene*. 23:250-9.
41. Enokida et al. (2004) *Cancer Res*. 64:5956-62.
42. Kim et al. (2005) *Cancer Res*. 65:8118-24.
43. Laner et al. (2005) *Oncol Res*. 15:257-64.
44. Cho et al. (2003) *Biochem Biophys Res Commun*. 307:52-63.
45. Pong et al. (2003) *Cancer Res*. 63:8680-6.
46. Goldsmith et al. (2003) *Clin Cancer Res*. 9:5394-401.
47. Stirzaker et al. (2004) *Cancer Res*. 64:3871-7.
48. Metzger et al. (2005) *Nature*. 437:436-9.
49. Bussemakers et al. (1999) *Cancer Res*. 59(23):5975-9.
50. Hessels et al. (2005) *Molecular Biology for the Urologist*. 200–213.
51. de Kok et al. (2002) *Cancer Res*. 62:2695-2698.
52. Schalken et al. (2003) *Urology*. 62(5 Suppl 1):34-43.
53. Fradet et al. (2004) *Urology*. 64(2):311-5.
54. Groskopf et al. (2006) *Clin Chem*. 52(6).
55. Hessels et al (2003) *Eur Urol*. 44(1):8-15.
56. Parekh et al (2007) *J of Urology*. 2252–2259
57. Tinzl et al. (2004) *Eur Urol*. 46(2):182-6.
58. Wang et al. (2006) *Cancer Res*. 66(17):8347-51.
59. Perner et al. (2006) *Cancer Res*. 66(17):8337-41.
60. Nam et al. (2007) *Cancer Biology & Therapy*. 6(1): 40-45
61. Wang et al. (2006) *Cancer research*. 66(17):8347-51.
62. Hessels et al. (2007) *Clin Cancer Res*. 13(17):5103-8.
63. Jones et al. (2002) *Nature Reviews Genetics*. 3:415-428.
64. Merlo et al. (1995) *Nat Med*. 1(7):686-92.
65. Baylin et al. (1998) *Adv Cancer Res*. 72: 141–182, 182a, 182b, 183–196.
66. Jones et al. (1999) *Nat Genet*. 21:163 – 167.
67. Zimniak et al. (1994) *Eur J Biochem*. 224(3):893-9.
68. Henderson et al. (1998) *Chemico-Biological Interactions*.69–82.
69. Ryberg et al. (1997) *Carcinogenesis*. 18(7):1285-9.
70. Lee et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(24):11733-7.
71. Lee et al. (1997) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 6(6):443-50 .
72. Brooks et al. (1998) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 7(6):531-6.
73. Bastian et.al. (2004) *European Urology* 46(6):698-708.

74. Nakayama et al. (2003) *Am J Pathol.* 163(3):923–933.
75. Cairns et al. (2001) *Clin Cancer Res.* 7: 2727
76. Jeronimo et al. (2001) *JNCI J Natl Cancer Inst.* 93 (22): 1747-1752.
77. Harden et al. (2003) *J Natl Cancer Inst.* 95(21):1634-7.
78. Yutaka et al. (2004) *Clin Cancer Res.* 10(16):5518-22.
79. Mark et al. (2003) *Clin Cancer Res.* 9(7):2673-7
80. Catalona et al. (1997) *J Urol.* 158(6):2162-7.
81. Chon et al. (2002) *J Urol.* 167(6):2457-60.
82. Borboroglu et al. (2000) *J Urol.* 163(1):158-62.
83. Stewart et al. (2001) *J Urol.* 166(1):86-91.
84. Goessl et al. (2000) *Cancer Res.* 60:5941.
85. Goessl et al. (2001) *Ann N Y Acad Sci.* 945:51-8.
86. Goessl et al. (2002) *J Pathol.* 196(3):331-4.
87. Narla et al. (2001) *Science.* 294:2563–6.
88. Chen et al. (2003) *Am J Pathol.* 162:1349–54.
89. Goutham et al. (2008) *The Journal of clinical investigation.* 118(8).
90. Goutham et al. (2005) *Cancer Res.* 65(4):1213-22.
91. Narla et al. (2005) *Cancer Res.* 65:5761–5768.
92. Benzeno et al. (2004) *Cancer Res.* 64:3885–3891.
93. Holdcraft et al. (2004) *Development.* 131:459–67.
94. Trapman et al. (1988) *Biochem Biophys Res Commun.* 153:241–8.
95. Culig et al. (1993) *Mol Endocrinol.* 7:1541-1550.
96. Suzuki et al. (1993) *J Steroid Biochem Mol Biol.* 46:759-765.
97. Gaddipati et al. (1994) *Cancer Res.* 54:2861-2864.
98. Nelson et al. (2002) *American Journal of Epidemiology.* 155(10):883-890.
99. Ross et al. (1998) *Cancer Res* 58:4497–4504.
100. Irving et al. (1995) *Cancer Res* 55:1937–40.
101. Yoshimoto et al. (2008) *Modern Pathology.* 21(12):1451–60.
102. Shen et al. (2010) *Genes Dev.* 24(18):1967-2000.
103. Tomlins et al. (2007) *Nature.* 448(7153):595-9.
104. Rajput et al. (2007) *J Clin Pathol.* 60(11):1238-1243.
105. Eisermann et al. (2013) *Transl Androl Urol.* 2(3):137-147.

ИЗВОДИ:

1. Разработените методики за молекулярно-генетичен анализ на панел от ПК специфични молекулни маркери позволяват осъществяване на първична диагностика на ПК, разграничаване на индолентен от агресивен (метастатичен) молекулярен профил на заболяването и мониторинг.

2. *PCAZ* свръхекспресия, установена при 90.4% от пробандите с неагресивен ПК и 100% с агресивен ПК (общо 95,2%) и липса на свръхекспресия в останалите клинични групи го определят, като високо специфичен маркер за ранна диагностика и контрол на ПК.

3. Детекцията на *T2/ERG* фузия изключително в групата с агресивен КРПК в комбинация с по-висока хистологична степен *GS* /7,8,9/ и допълнителни неблагоприятни хистологични характеристики, по-висок туморен стадий определят позитивната асоциация на маркера с агресивността на заболяването.

4. *T2/ERG* позитивен фузионен статус е установен при 18,2% от пациентите с ПК, процент съществено по-нисък от докладвания в литературата.

5. *T2/ERG* фузионен статус не може да се използва за контрол на терапията при пациенти с андроген-податлив ПК, поради андроген-медираната им експресия.

6. Хиперметирането на *GSTP1* промотора се приема за най-ранната епигенетична промяна, индикираща злокачествени изменения в простатата и най-дълго персистиращия маркер в кръвта.

7. Появата на простатно тумор-специфични молекулни маркери в кръвта се интерпретира, като индикатор за микрометастатично разпространение и предпоставка за образуване на метастази.

8. Полиморфният маркер *IVS1-27G/A* в *KLF6* гена не беше информативен за отдиференциране на ПК с прогресивно метастатично поведение в изследваната извадка.

9. Не бяха открити соматични мутации в *AR* гена.

10. Изследването на $(CAG)_n$ повтора в *AR* ген, показва наличие на рисков алел за предразположение към развитие на ПК при 41% от пациентите с ПК.

11. Разработеният системен подход за молекулярно-генетична диагностика позволи охарактеризиране на 101 пациента с ПК и допринесе за прецизиране на схема за индивидуализирана терапия и молекулен мониторинг на заболяването.

**ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ
ТРУД:**

• Публикации във връзка с дисертационния труд

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

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 2,567

● **Научни прояви във връзка с дисертационния труд**

1. Tsvetkova A, Todorova A, Georgiev G, Kirov A, Mitev V. (Hungary 2012) *TMPRSS2-ERG* (Pathological) Gene Fusions in Patients with Prostate Cancer (PCa). Symbiose " The 16th Symposium of Biology Students in Europe 27July-6 August 2012 in Szeged and Gödollo.
2. Tsvetkova A. (Hungary 2012) Overexpression of DD3 genetic marker for early diagnosis of patients with prostate cancer (PCa). P.24 Symbiose " The 16th Symposium of Biology Students in Europe 27July-6 August 2012 in Szeged and Gödollo.
3. Tsvetkova A, Todorova A, Georgiev G, Mitev V. (2013) Simultaneous interpretation of combinative molecular analysis with histological and clinical data in prostate cancer patients.
Eur J Hum Genet, 2013 (P11.218) ESHG Conference, June 8-11, 2013, Paris, France.
4. Tsvetkova A, Todorova A, Georgiev G, Drandarska I, Mitev V. (2013) Molecular combinative analysis in diagnosis, treatment and prognosis of prostate cancer (PCa) in correlation with histological results. Book of abstracts: 99, P6.3 10th Balkan Congress of Human Genetics, October 10-12, 2013, Bled, Slovenia.
5. Tsvetkova A, Todorova A, Georgiev G, Drandarska I, Mitev V. (2014) 'Molecular subtyping of three aggressive PCa patients from Bulgaria in correlation with clinic-histological data' Eur J Hum Genet, 2014 (Control No. 2014-A-1960-ESHG Conference, May-31-June-3 2014, Milano, Italy.
6. Проект № 8-Д 2012г; Договор № 26-Д от конкурса „Млад изследовател”. Тема: Промоторно хиперметиране на GSTP1 гена при пациенти с рак на простатата - маркер за ранна диагностика и остатъчно заболяване. - (водещ изследовател Анита Огнянова Цветкова, докторант катедра Медицинска химия и Биохимия- МУ София)
7. Проект № 17-Д 2013г. от конкурса „Млад изследовател”. Тема: Проучване прогностичната и диагностична стойност на IVS1 -27:G/A полиморфизма в KLF6 гена за предсказване състояния на простатен карцином с бърза прогресия и метастазиране.- (водещ изследовател Анита Огнянова Цветкова, докторант катедра Медицинска химия и Биохимия- МУ София)

ПРИНОСИ

1. Беше въведена специфична молекулно-генетична диагностика на заболяването простатен карцином.
2. Проведените анализи бяха използвани за диагностични цели.
3. Предложен е алгоритъм за интердисциплинарен подход при диагностика и мониториране на простатен карцином.

SUMMARY

PCa is a common neoplasm and increasingly prevalent cause of cancer death among men. The molecular mechanisms underlying its clinicopathological behaviour and progression remain poorly understood. PCa is a heterogeneous disease that can be indolent for decades in some patients, or can be life-threatening and lethal in a short time in others. The most promising recently described genetic markers with benefits in PCa molecular diagnostics and subtyping are epigenetic fluctuations (*e.g.* *GSTPI* promoter hypermethylation), gene fusions (*e.g.* *TMPRSS2-ERG* gene fusion), and mRNA alterations (*e.g.* *PCA3* overexpression).

The aim of the study was to make a comparison between the molecular profile and the clinicopathological parameters obtained in prostate cancer (PCa) patients, in order to develop better cancer diagnostics and management of the disease. The following molecular markers were investigated: *PCA3* overexpression, *GSTPI* promoter hypermethylation, *TMPRSS2-ERG* gene fusions, IVS1-27G>A polymorphic variant in the *KLF6* gene, *AR(CAG)*n** repeats and mutations in androgen receptor (*AR*) gene.

A total of 150 patients were analyzed divided in four clinical groups: 18 aggressive PCa, 83 non-aggressive PCa, 25 BPH and 24 chronic inflammatory diseases.

An association between *TMPRSS2-ERG* positive status and moderate to poorly differentiated prostate tumors, higher tumor stage was established. This molecular marker correlates with additional clinico-pathological findings for life-threatening PCa, as perineural and perivascular infiltration, androgen insensitivity, metastasis formation. The appearance of PCa specific markers into the blood is associated with unfavorable prognosis, as *T2-ERG* positive probands are more susceptible to metastasis formation. No somatic mutations were detected in the *AR* gene and all patients showed normal genotype in respect to the IVS1-27G>A polymorphism.

41% of all patients with PCa were detected with shorter *AR* CAG lengths (*e.g.*, ≤ 22 repeats), which suggests an inborn predisposition to the development of PCa.

Positive *GSTPI* promoter hypermethylation seems to be highly specific and the earliest epigenetic change in the prostate gland, which indicates the beginning of the pathological process. *GSTPI* promoter hypermethylation was determined as a long-lasting epigenetic marker in blood samples of PCa patients, which makes it suitable as a marker for treatment follow-up.

The appearance of positive molecular markers in blood was considered as a predictor of PCa dissemination.

The optimization of a diagnostic approach to the PCa was achieved in the current study. It can be used for early diagnostics, distinction between indolent and metastatic PCa and monitoring of the disease. In this way were characterized 101 Bulgarian probands with PCa and was given them a chance for individualized treatment.

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