I.O.S.U.D. - Universitatea de Vest ”Vasile Goldiș” din Arad
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Arad, 2018

TEZĂ DE DOCTORAT

Evaluarea utilității clinice a biomarkerilor standard şi moleculari, în diagnosticul şi prognosticul cancerului de prostată

Conducător de doctorat: **Prof. univ. dr. Ioan Ioiart**

Doctorand: **Alin-Ioan Greluş**

PhD THESIS

Clinical relevance of standard and molecular biomarkers, in diagnosis and prognosis of prostate cancer

Scientific supervisor: **Prof.univ.dr. Ioan Ioiart**

PhD Student: **Alin-Ioan Greluş**

Motto :

‘Adevarata ştiinţă este cunoştinţa prin cauze, iar cine studiază cauzele secundare este forţat de însăşi logica ştiinţifică să se ridice până la cauza primă, adică până la Dumnezeu.’- Prof.DR. N. C. Păulescu (1869-1931)

‘În lupta cu boala în general şi cu cancerul în special, nu este vorba de a adăuga ani vieţii, ci viaţă anilor.’ – Autor necunoscut

Mulțumiri:

Mulţumesc domnului Profesor Dr. Ioiart Ioan pentru exigenţa sa în calea abordării ştiinţei şi actului medical, doamnei Conferenţiar Popescu Cristina, pentru tenacitatea şi prosperitatea acordată pe parcursul îndrumării acestei lucrări de doctorat şi nu în ultimul rând, colegilor din Clinica de Urologie Arad, pentru sprijinul practic al studiului.

Prezenta activitate de cercetare, s-a desfăşurat în cadrul Grantului cu numărul PN-II-RU-TE-2014-4-285, finanţat de Unitatea Executivă pentru Finanţarea Învăţământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării şi Inovării – UEFISCD, împreună cu Universitatea de Vest 'Vasile Goldiş' din Arad.

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII ÎN DOMENIU	2
MOTIVAŢIA TEMEI	3
IPOTEZA DE LUCRU/SCOP/OBIECTIVE	4
MATERIALE ŞI METODE	7
DESIGN-UL STUDIULUI	7
REZULTATE	9
CONCLUZII	28
BIBLIOGRAFIE	31
LISTA DE PUBLICAŢII	32

INTRODUCERE

La nivel mondial cancerul de prostată are o incidență generală: 30/100.000 bărbați, este cel mai frecvent cancer în sfera patologiei genito-urinare masculine, iar peste vârsta de 50 de ani, acest cancer este al II-lea ca frecvență, după cancerul pulmonar și a III-a cauză de deces, după cancerul pulmonar și digestiv.[1]

Cancerul face parte dintr-un grup heterogen de boli, care din punct de vedere clinic, histologic şi molecular, prezintă celule cu caracteristici biologice diferite faţă de celulele sănătoase din organism, fiind caracterizate prin creştere şi diviziune necontrolată, invazie și adesea metastazare. [2]

Etimologia cuvântului 'cancer' provine din grecescul 'carcinos' sau 'carcinom' (traducere-crab), folosit de Hippocrate, care in timpul disecțiilor, a observat structura radială a vaselor de sânge în jurul zonelor canceroase, asemenea picioarelor unui crab. [3]

Consecvenţa studiilor admite că celulele canceroase necesită acapararea mai multor caracteristici cheie, în vederea tranziţiei de la o celulă normală la tumoră malignă. Aceste caracteristici includ (1) instabilitate genetică şi epigenetică, (2) creştere autonomă, (3) senszitivitate scazută la semnale antiproliferative interne şi externe, (4) rezistenţă la apoptoză, (5) diviziune celulară cu potenţial nelimitat, (6) abilitatea de a induce angiogenează (7) comportament de invazie locală, care diferenţiază tumorile benigne de cele maligne (8) evaziunea sistemului imunitar. În final, multe cancere dezvoltă un atribut adiţional letal, anume abilitatea de a părăsi situl primar al tumorii şi de a coloniza organe sau ţesuturi distante. [2]

Deşi s-au făcut progrese în descifarea mecanismelor etiopatogenice ale procesului neoplazic, astăzi se urmăreşte identificarea unor biomarkeri moleculari, care vor genera cunostințe pentru dezvlotarea unei variabile paraclinice, cu specificitate şi senzitivitate crescută față de biomarkerii standard, în vederea obţinerii diagnosticului precoce şi a unui factor de prognostic de mare acurateţe, în cancerul de prostată.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII IN DOMENIU

Caracterul heterogen al cancerului de prostată, este afirmat prin complexitatea mecanismelor sale de apariție. Zestrea genetică congenitală personalizată, se modifică în timp, sub acţiunea speciilor reactive de oxigen sau nitrogen, induse de radiațiile externe ionizante şi nonionizante, xenobiotice (insecticide, fungicide, plasticide, medicamente, etc.) şi inflamația cronică din bolile prostatei, mediată de limfocite T, B, mastocite si macrofage. Toți acești factori induc dezechilibre morfo-funcționale, cu repercursiuni, asupra tuturor componentelor celulare în special a proteinelor, lipidelor şi ADN-uli, cauzând modificări epigenetice şi genetice alterate.[4]

Numeroase studii au evidenţiat rolul mecanismelor epigenetice în dezvoltarea şi aparaţia diferitelor patologii prostatice, context în care utilitatea clinică a diverşilor biomarkeri epigenetici — metilarea ADN-ului, modificarea histonelor şi microARN-urile — în diagnosticarea şi monitorizarea evoluţiei acestor boli, este un topic de larg interes în cercetarea medicală.

Metilarea 5 'carbonului (5-metilcitozina, 5mC) la dinucleotidele CpG este un process epigenetic dinamic, care este critic pentru inactivarea transcripțională a genei prin represia elementelor transpozabile. O altă formă importantă de metilare a ADN–ului, 5 - hidroximetilcitozina (5hmC) – este esențială pentru demetilarea activă a ADN-ului și pare a fi un semn distinctiv asociat cu transcripția genei active. [5]

Conversia 5mC la 5 hmC duce automat la scăderea nivelelor de 5 mC la orice poziţie din nucleotid sau chiar la nivelul întregului genom, constituind un prim pas pe calea de demetilare a ADN-ului. Scăderea nivelului de demetilare (5 hmC), creat prin defect de oxidare a 5 mC, poate inversa balanţa în favoarea unei stări de hipermetilare la nivelul insulelor CpG, cât şi la nivel global al genomului. În cancer nivelele de 5 hmC sunt semnificativ reduse la nivel tumoral, în concordanţă cu ţesutul normal din vecinatate. [6]

Aceşti biomarkeri epigenetici pot fi cuantificaţi şi pot prezenta relevanţă clinică în diagnosticul şi prognosticul diferitelor neoplazii, printre care şi cancerul de prostată.

Motivaţia temei

Deşi există tot mai multe dovezi care confirmă sau au validat aplicabilitatea și utilitatea unor biomarkeri moleculari de diagnostic şi prognostic, protocoalele clinice curente i-au în considerare în mod rezervat, evenimente moleculare în managementul terapeutic al pacienților cu cancer de prostată. Cu paşi timizi, Ghidul European de Urologie a introdus biomarkeri genetici şi epigenetici, în protocolul de diagnostic al cancerului de prostată din 2018, pentru a sprijini PSA-ul seric, în acurateţea diagnosticului. Teste ca 'Progensa' (PCA3) şi 'PHI', au primit aprobarea FDA-ului, dar '4K', 'ConfirmMDX' şi 'SelectMDX' se află deocamdată sub supravegherea 'Clinical Laboratory Improved Amendments' (CLIA). Biomarkerii ADN şi ARN, permit un diagnostic timpuriu în raport cu biomarkerii standard, prin posibilitatea de a identifica leziuni la nivel molecular, înainte ca boala să se manifeste la nivel tisular, oferind astfel noi ţinte terapeutice şi rate crescute de succes terapeutic. Totodată sunt necesari pentru a identifica pacienții care prezintă un risc ridicat de boală și pentru a distinge pacienții cu cancer agresiv, de cei cu cancere latente. [52]

Protocolul actual de diagnostic și urmarire al pacientului cu cancer de prostată din Romania, se centralizează pe dozarea biomarkerilor standard, și anume a PSA-ului cu formele sale derivate (PSAf, PSA V, PSA D). Protocolul actual de diagnostic al cancerului de prostată este limitat din urmatoare rațiuni: examenul clinic şi tuşeul rectal omit stadiul T1, de asemena substadializează leziunea; ecografia transrectală prezintă o deficiență în diferențierea leziunilor de adenocarcinom de cele focale benigne; PSA-ul rămâne un biomarker imperfect prin prisma faptului că este organo-specific şi nu cancer specific, puncția biopsie de prostată în 1 din 4 cazuri, oferă rezultate fals negative, deasemena se poate solda cu complicații ca: inflamație, hemoragie, sepsis, etc; Frica de cancere oculte duce la o rată crescută a rebiopsierilor, astfel constituie o problemă serioasă de diagnostic și management terapeutic. [66]

Astăzi se urmăreşte identificarea unor biomarkeri moleculari, care vor genera cunostințe pentru dezvlotarea unei variabile paraclinice, cu specificitate şi senzitivitate crescută, față de biomarkerii standard, în vederea obţinerii diagnosticului precoce şi a unui factor de prognostic de mare acurateţe, în cancerul de prostată.

Ipoteza, scopul şi obiectivele cercetării

Ipoteză

Pornind de la premisa bazată pe evidențe medicale publicate, care susţine că dezvoltarea procesului malign depinde atât de modificări genetice, cât şi de cele epigenetice, s-a demonstrat că metilarea ADN este un indicator al activității genice, precum şi al organizării întregului genom. Aceste evenimente epigenetice au rol în inițierea neoplaziilor şi prezintă o caracterisitcă deosebită, deoarece preced şi dictează modificările genetice, nu influenţează morfologia genei, mai mult pot fi reversibile.

Majoritatea cercetărilor efectuate până în prezent care investighează aplicabilitatea acestor markeri epigenetici în cancerul de prostată s-au axat pe metilarea genelor specifice, din probele de țesut prostatic și fluidele corporale (sânge, plasma, ser, urină și spermă). Excepţie făcând un studiu recent, care examinează metilarea globală și / sau hidroximetilarea ADN-ului în cancerul de prostată, utilizând ADN genomic tumoral sau ADN-ul circulant. [67]

În schimb, ADN-ul din leucocite (WBC-White Blood Cells) constituie o sursă bogată de ADN calitativ, care poate fi obținută cu ușurință prin metode neinvazive și ușor de manipulat pentru prelucrarea în laborator și utilizarea clinică [68].

Cu toate acestea, niciun studiu până în prezent nu a examinat conținutul de 5mC şi 5hmC al ADN-ului din WBC în cancerul de prostată sau orice alt tip de cancer.

Scopul cercetării

Prin intermediul studiului dorim să cuantificăm performanţa biomarkerilor epigentetici 5metil-citozina şi 5 hidroximmetil-citozina, extraşi din ADN-ul leucocitar, în comparaţie cu parametrii standard, în vederea utilităţiilor ca factori de diagnostic şi prognostic în cancerul de prostată.

Obiectivele cercetării

➢ **Selecția și constituirea grupului de studiu**

• Obținerea aprobărilor necesare derulării studiului, cu respectarea normelor de etică și deontologie

• Întocmirea fișei de evidență și colectare a datelor

• Precizarea criteriilor de selecție a pacienților

• Întocmirea și aplicarea consimțământului informat de participare în studiu pentru fiecare pacient în parte

• Colectarea datelor de anamneză și colectarea probelor biologice (sânge) la momentul includerii în studiu

• Constituirea grupului de studiu, de minim 50 pacienți diagnosticați cu cancer de prostată, minim 150 de pacienţi diagnosticaţi cu leziuni premaligne şi benigne de prostată pentru studiu comparativ

➢ **Evaluarea pacienților prin aplicarea protocoalelor standard de investigaţii clinice şi paraclinice la momentul diagnosticului**

• Efectuarea anamnezei pacienților

• Efectuarea ecografiei abdominale

• Efectuarea examenului clinic general, și a tușeului rectal

• Recoltarea probelor de sânge

• Stadializarea pacienţiilor cu cancer de prostată

• Corelarea parametriilor standard : Vârstă, PSA total, scor Gleason, grad de inflamaţie cronică, volum prostatic, stadiu clinic tumoral determiant la tuşeul rectal, în vederea obţinerii unui factor de prognostic la diagnostic.

➢ **Evaluarea gradului de metilare şi hidroxymetilare globală al pacienților selectați în studiu**

• Extracția ADN din fluide biologice;

• Evaluarea global 5mC şi 5hmC prin tehnica ELISA folosind kituri specifice;

• Evaluarea variaţiilor de metilare şi hidroxymetilare între diferitele tipuri de patologii prostatice;

• Corelarea PSA-ului seric cu gradul de metilare şi hidroxymetilare pentru studiu comparativ;

• Corelarea gradului de metilare şi hidroxymetilre cu scorul Gleason în vederea stabilirii prognosticului ;

• Întocmirea graficelor de evoluție a bolii pe baza profilului epigenomului, de la momentul diagnosticului în evoluţie, sub tratament hormonal.

MATERIALE ȘI METODE DE LUCRU UTILIZATE ÎN CERCETĂRILE PERSONALE

Selecția grupului de studiu

În perioada decembrie 2015 - iunie 2017, au fost consultaţi 200 de pacienţi cu patologie prostatică în cadrul Clinicii de Urologie a SCJUA. Pacienţii au fost împărţiţi în grupe de studiu în funcţie de patologia prostatică pentru analiză comparativă. Grupele de studiu au fost constituite pe baza examenelor clinice, paraclinice și a examenelor histopatologice.

Criteriile de includere în studiu:

- pacienți de sex masculin,
- semnarea consimțământului informat,
- vârsta peste 50 de ani,
- Pacienti diagnosticati cu cancer de prostată sub tratament hormonal
- Pacienţi diagnosticaţi cu hipertrofie benignă de prostată
- Pacienţi dianosticaţi cu leziuni premaligne de prostată (ASAP)
- Subiecţi sănătoşi pentru studiu comparativ;

Criterii de excludere din studiu:

- pacienți cu alte antecedente neoplazice;

Design-ul studiului

Studiul a fost de tip prospectiv, desfăşurat în perioada decembrie 2015 - iunie 2017. În studiu au fost înscrişi 190 de pacienţi, conform criterilor de participare, cu urmatoarea distribuţie în funcţie de patologia prostatică: adenom de prostată (BPH, n=100), leziuni premaligne (HGPIN, ASAP, n= 11), cancer de prostată (PC, n= 60) şi control (CT, n=19). Pacienţii din momentul diagnosticului (T_0) au fost urmariţi timp de un an de zile, cu efectuarea a 4 controale (T_1,T_2,T_3,T_4) repetate la 3 luni de zile, conform designului experimental.

Metode de lucru

Înaintea derulării programului de cercetare s-au obținut toate aprobările pentru desfăşurarea studiului cu respectarea normelor de etică și deontologie. S-a întocmit fișa de evidență și colectare a datelor cu precizarea criteriillor de selecție a pacienților. S-a întocmit consimțământul informat de participare în studiu și fișa de informare a pacienților despre derularea studiului.

Toți pacienții au fost evaluați prin următoarele metode de lucru:

- Clinice:
  - anamneză ,
  - examen clinic general,
  - tușeu rectal.
- Paraclinice:
  - Investigații imagistice: ecografie abdominală (pentru evaluarea aspectului și dimensiunilor prostatei, aspectul vezicii urinare, absenţa sau prezenţa ureterohidronefrozei);
  - Evaluarea biomarkerilor standard: recoltare probe biologice (sânge venos periferic) pentru dozare PSA total;
  - Evaluarea biomarkerilor ADN: recoltarea de probe biologice (sânge venos periferic) pentru evidențierea markerilor de metilare globală (tehnici ELISA pentru determinarea 5mC, 5hmC);
  - Puncţie biopsie de prostată, la pacienţii cu suspiciune de cancer de prostată.

Rezultate

Studiul a fost de tip prospectiv, desfăşurându-se în perioada decembrie 2015 - iunie 2017. Înaintea derulării programului de cercetare s-au obținut toate aprobările pentru desfăşurarea studiului cu respectarea normelor de etică și deontologie. S-a întocmit fișa de evidență și colectare a datelor, cu precizarea criteriillor de selecție a pacienților. S-a semnat consimțământul informat de participare în studiu și fișa de informare a pacienților despre derularea studiului.

În prezentul studiu au fost înscrişi 190 de subiecţi, conform criteriilor de participare, toți pacienții au fost evaluați clinic prin:

- Anamneză - care oferă date de importanţă despre vărstă, antecedente personale patologice şi antecedente heredocolaterale de caricnom prostatic;
- examen clinic general, care a presupus evaluarea posibilelor adenopatii şi obligatoriu efectuarea tușeului rectal, în vederea diagnosticului diferenţial.

Dupa efectuarea examenului clinic, pacienţii au fost supuşi unor investigaţii paraclinice: ecografia abdominală care evaluează aspectului și dimensiunile prostatei, aspectul vezicii urinare, prezenţa ureterohidronefrozei unilaterale sau bilaterale. Mai departe s-a recurs la recoltarea de probe biologice (sânge venos periferic), pentru evaluarea biomarkerilor standard (PSAt) şi evaluarea biomarkerilor ADN (tehnici ELISA pentru determinarea 5mC, 5hmC); Ulterior pacienţilor cu suspiciune de cancer de prostată, s-a efectuat puncţie biopsie de prostată, în vederea definitivării diagnosticului.

Pacienţii diagnosticaţi cu cancer de prostată, au fost stadializaţi conform ghidului EAU 2018, ulterior în colaborare cu clinica de Oncologie a SCJUA, s-a iniţiat tratament specific, de blocadă androgenică totală, datorită stadiului inoperabil al bolii.

Concluzionarea diagnosticelor, a afişat următoarea distribuţie în funcţie de patologia prostatică: adenom de prostată (BPH, n=100), leziuni premaligne (ASAP, n= 11), cancer de prostată (PC, n= 60) şi control (CT, n=19). Pacienţii au fost urmăriţi din momentul diagnosticului (T_0) pe o perioadă de un an de zile, cu efectuarea a 4 controale (T_1, T_2, T_3, T_4) repetate la interval de 3 luni de zile, conform designului experimental. (Figura 2.)

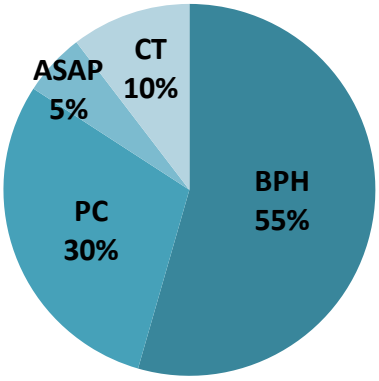

Figura 2. Distribuţia pacienţiilor în funcţie de patologia prostatică

Legendă. Control (CT), n=19; adenom de prostată (BPH), n=100; leziuni premaligne (HGPIN/ASAP), n= 11; cancer de prostată (PC), n= 60.

Distribuţia pacienţilor în funcţie de patologia prostatică, relevă o incidenţă ridicată a patologiei maligne a pacienţilor care au participat la acest studiu, 30% din pacienţii inclusi in studiu au fost diagnosticaţi cu cancer de prostată.

Tabel 6. Valoarea PSA-ului seric în funcţie de vârsta şi patologia prostatică

Patologie prostatică	Vârstă (ani)	PSA (ng/mL)
CT	65 (61, 68)	0,89 (0,29, 1,53)
BPH	70 (65, 75)	2,05 (0,52, 5,33)
ASAP	68 (62, 79)	7,61 (6,44, 9,39)
PC	68 (60, 75)	34,01 (12,81, 116,02)

Legendă. CT - lot martor; BPH - adenom de prostată; ASAP - leziuni premaligne; PC - cancer de prostată. Valorile sunt prezentate ca valoare mediană cu quartilă inferioară (parte stângă, paranteze) şi quartilă superioară (parte dreaptă, paranteze)

Valoarea PSA-ului seric a tins să crească odată cu severitatea patologiei prostatice (Tabel 6, Figura 3). Mai mult, pacienții diagnosticați cu PC au prezentat niveluri ridicate ale PSA peste 10ng/mL în marea majoritate a cazurilor (Tabel 6, Figura 3), de asemenea, a fost remarcată tendinţa de scădere a heterogenităţii valorilor măsurate ale PSA-ului seric, odată cu creşterea vârstei pacienţilor (Figura 3).

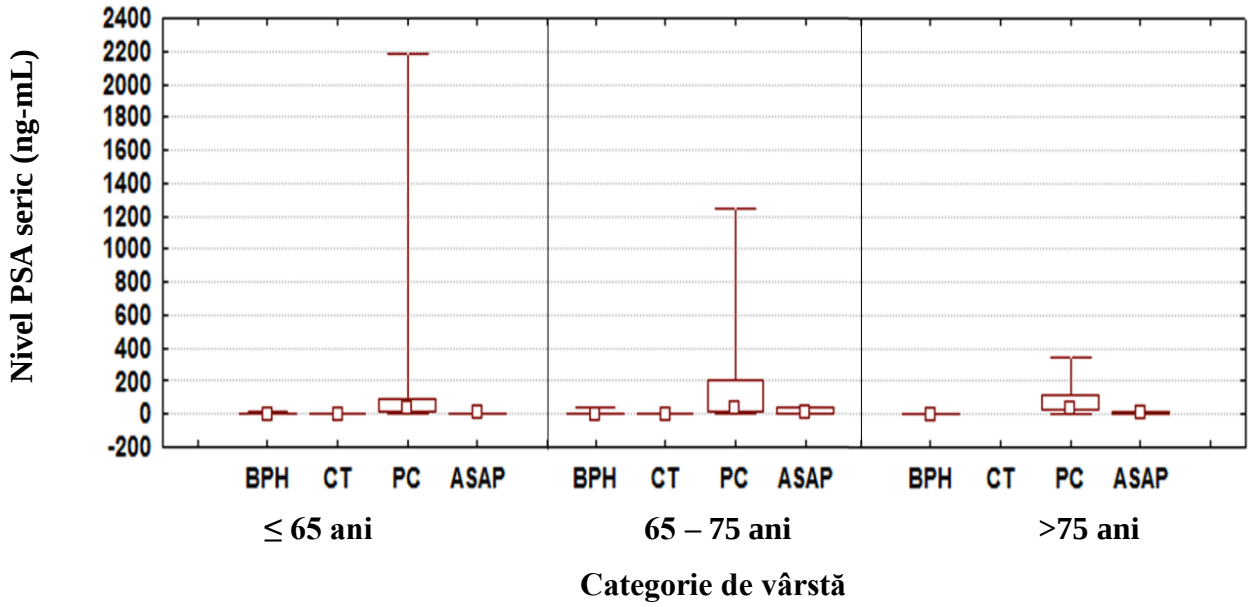

Figura 3. Incidenţa diferitelor tipuri de patologii prostatice
în funcţie de categoria de PSA şi vârstă.

Legendă. Pe axa X este reprezentată categoria de vârstă; BPH – pacienţi cu hiperplazie benignă de prostată; CT - pacienţi sănătoşi (grup control); PC - pacienţi cu cancer de prostată; ASAP – pacieţi cu leziuni premaligne. Pe axa Y este reprezentată valoarea PSA seric. Valorile sunt prezentate ca valoare mediană (pătrăţel) cu quartila inferioară şi superioră (căsuţă) şi valorile minime şi maxime (bară).

În cadrul studiului nostru, PSA-ul seric în ciuda organo-specificităţii sale, a îndeplinit funcţia de 'gold standard' al biomarkerilor de diagnostic al cancerului de prostată, relevând suspiciune de carcinom prostatic, în 100% din cazurile ulterior diagnosticate pozitiv cu cancer de prostată, pacienţii au înregistrat o valoare a PSA-ului seric > 4 ng/ml. Deasemena nivelul PSA-ului seric scade cu creșterea vârstei paceinților cu cancer de prostată.

Corelarea parametriilor standard la pacienţii cu cancer de prostată la momentul diagnosticului

Vârsta, PSAt, scorul Gleason, grad de inflamaţie asociat focarelor de cancer determinat histologic, volum prostatic determinat ecografic şi stadiu clinic tumoral determinat la tuşeul rectal, constiuie parametrii cu valoare în vederea obţinerii unui factor de prognostic la diagnostic.

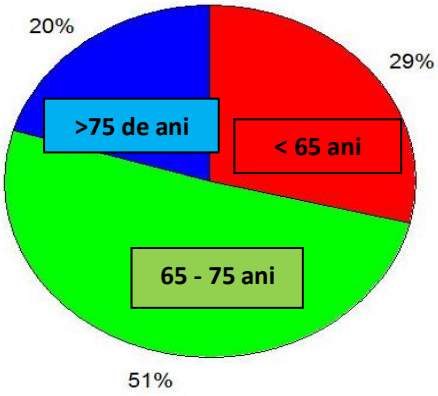

Figura 4. *Repartiția pacienţiilor cu cancer de prostată pe grupe de vârstă*

Legendă. **Verde, vârsta 65 - 75 de ani; roşu, vârsta < 65 de ani; albastru, vârsta >75 de ani.**

În cadrul studiului de faţă, vârsta medie a pacienţilor a fost 68 de ani, numărul dominant de pacienţi, au avut vârsta cuprinsă între 65 şi 75 de ani, urmaţi de pacienţii cu vârsta < 65 de ani şi respectiv de cei cu vârsta < 75 de ani (Figura 4).

Tabel 7. Repartiția pacienţilor cu cancer de prostată în funcție de stadiul clinic tumoral identificat la tuşeul rectal

Stadiu clinic tumoral	Nr. pacienţi	%
T3	50	83
T4	10	17

Majoritatea pacienţilor cu cancer de prostată incluşi în studiu (50 de cazuri, reprezentând 83% din numărul total de pacienţi) au prezentat cancer de prostată în stadiul clinic tumoral T3 determinat prin tuşeul rectal (Tabel 7). Restul pacienţilor (10 de cazuri, reprezentând 17% din numărul total de pacienţi) au avut au prezentat cancer de prostată în stadiul clinic tumoral T4 determinat prin tuşeul rectal.

Tabel 8. Repartiția pacienţiilor cu cancer de prostată în funcție de volumul prostatic

Volum prostatic	Nr. pacienţi	%
<40 cm^3	18	31
40-70 cm^3	35	59
>70 cm^3	7	10

Cea mai mare proporţie de pacienţi cu cancer de prostată incluşi în studiu (35 de pacienţi, reprezentând 59% din numărul total de pacienți), au avut un volum prostatic mediu (40-70 cm^3; Tabel 9). De asemenea, a fost identificat un număr redus de pacienţi (6 pacienţi, reprezentând 10% din numărul total de pacienți) care au prezentat o prostată cu volum > 70 cm^3 (Tabel 8).

Tabel 9. Valorile măsurate ale PSA-ului seric, în funcţie de scorul Gleason

Scor Gleason	Nr. pacienţi	PSA seric (ng/ml)	
4 (2+2)	2	34,36	(8,72; 60)
5 (2+3)	6	18,95	(16; 30,20)
6 (3+3)	2	44	(28; 60)
7 (3+4)	23	34	(11,21; 224)
7 (4+3)	18	31,70	(18; 169)
8 (3+5)	2	521,5	(43; 1000)
8 (4+4)	3	93,70	(39; 110)
9 (4+5)	3	109	(99,17; 300)

Legendă. Valorile sunt prezentate ca mediană cu quartilă inferioară şi quartilă superioară (paranteze).

Toţi pacienţii cu cancer de prostată participanţi la studiu, au înregistrat valoarea PSA-ului seric peste 4 ng/mL, în timp ce numărul dominant de pacienţi au prezentat nivelulul PSA-ului seric peste 10 ng/mL (88%) (Tabel 9). Deasemena pacienţii au prezentat scor Gleason variabil cuprins între 4 şi 9, cele mai multe cazuri de PC au înregistrat un scor Gleason egal cu 7, mai precis 69% din cadrul pacienţilor analizaţi. Din numărul total al pacienţilor cu scor Gleason 7, un procent de 56% dintre pacienţii investigaţi, au prezentat suma Gleason (3+4), iar restul de 44%, au avut suma Gleason (4+3). Cea mai mică frecvenţă a fost înregistrată în cazul pacienţilor cu PC cu risc scăzut (Tabel 9).

Tabel 10. Repartiția pacienţiilor cu cancer de prostată în funcţie de gradul de inflamaţie, determinat histologic

Grad de inflamaţie	Nr. pacienţi	%
Grad 1	26	44
Grad 2	17	29
Grad 3	17	27

Procentul cel mai mare de pacienţi cu cancer de prostată incluşi în studiu au avut gradul 1 de inflamaţie asociat cu prezenţa PC (44%). Restul pacienţilor au prezentat procentaje mai mici, dar similare ca valoare, respectiv 29% dintre cazuri au avut gradul 2 de inflamaţie, iar 27% gradul 3 de inflamaţie cronică (Tabel 10).

Tabel 11. Analiza corelaţională neparametrică a asocierii scorului Gleason cu valoarea PSA-ului seric, volumul prostatic, tuşeul rectal şi vârsta pacienţilor

	Gleason	PSA	Volum prostatic	Grad inflamaţie	Stadiu clinic(TR)	Vârsta
Gleason						
PSA	0,070					
Volum prostatic	-0,024	**0,258**				
Grad inflamaţie	0,188	**0,310**	0,163			
Stadiu clinic (TR)	0,152	0,202	**0,418**	0,148		
Vârsta	-0,053	-0,050	0,006	0,218	-0,027	

Legendă. Valorile bolduite indică asocieri semnificative pt $p < 0,05$.

Analiza neparametrică cu ajutorul coeficientul de *corelaţie* a rangurilor ρ (rho) *Spearman* a relevat lipsa unei asocieri statistic semnificative între scorul Gleason şi restul variabilelor analizate (vezi Tabel 11). Totuşi, a fost identificată existenţa unor asociaţii slabe, dar statistic semnificative între PSA şi volum prostatic şi respectiv între PSA şi gradul de inflamaţie determinat histologic. Stadiul clinic tumoral identificat la tuşeul rectal a prezentat o asociere medie semnificativă cu volumul prostatic.

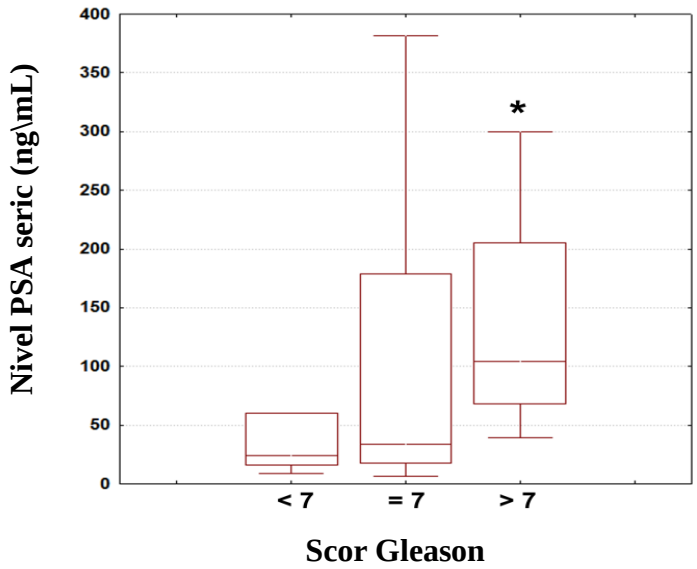

Figura 5. Nivelul PSA-ului seric în funcţie de clasele de agresivitate ale cancerului de prostată

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare mediană (linie) cu interval al valorilor fără outlieri (bară) şi intervalul din quartiala inferioară şi cea superioară (căsuţă). Coloanele marcate cu (*) denotă diferenţa semnificativă in comparaţie cu grupul referinţă – pacienţii cu cancer de prostată cu risc scăzut test (Mann-Whitney, $p \leq 0.05$).

Per ansamblu, a fost observată o tendinţă de creştere a valorii absolute a PSA-ului sangvin odată cu agresivitatea cancerului de prostată. Analiza neparametrică a pacienţilor stratificaţi în funcţie de agresivitatea cancerului de prostată a indicat diferenţe semnificative între grupurile examinate (testul Medianei, p = 0,006). Comparând pacienţii cu cancer de prostată cu scor Gleason < 7, analiza statistică neparametrică a relevat valori semnificativ mai mari ale PSA-ului seric în cazul subiecţilor cu cancer de prostată cu scor Gleason > 7 (test Mann-Whitney, p = 0.008; Figura 4), dar nu în cazul subiecţilor cu scor Gleason total egal cu 7 (test Mann-Whitney, p = 0.418; Figura 4).

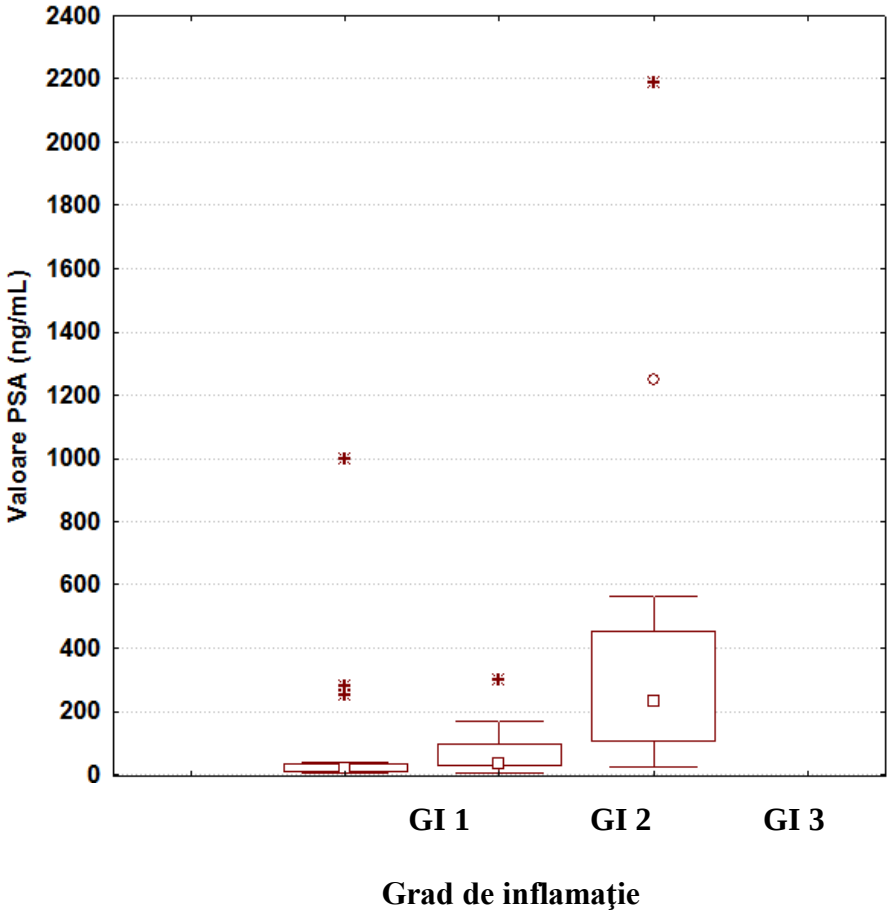

Figura 6. Categoria de *PSA în funcţie de gradul de inflamaţie*

Legendă. Pe axa X: GI 1 – grad de inflamaţie 1, GI 2 – grad de inflamaţie 2, GI 3 – grad de inflamaţie 3. Pe axa Y este reprezentată valoarea absolută a PSA. Valorile sunt prezentate ca valoare mediană (linie) cu intervalul din quartiala inferioară şi cea superioară (căsuţă), interval al valorilor fără outlieri (bară), outlieri (cerc) şi valori extreme (steluţă).

În cadrul prezentei investigaţii prospective, a fost identificat un trend semnificativ de creştere a a valorii PSA-ului seric odată cu creşterea gradului de inflamaţie (testul Medianei, $p \leq 0{,}001$). Majoritatea subiecţilor au avut un PSA cu o valoare sub 60 ng/mL. Valorile măsurate în cazul pacienţilor cu valori grad 2 de inflamaţie prostatică au fost semnificativ mai mari ca cele determinate pentru pacienţii cu grad 1 de inflamaţie prostatică (test Mann-Whitney, $p = 0.006$; Figura 5). Această diferenţă a fost şi mai mare atunci când au fost comparaţi pacienţii cu grad 3 de inflamaţie prostatică cu cei având grad 1 de inflamaţie prostatică (test Mann-Whitney, $p \leq 0{,}001$; Figura 5).

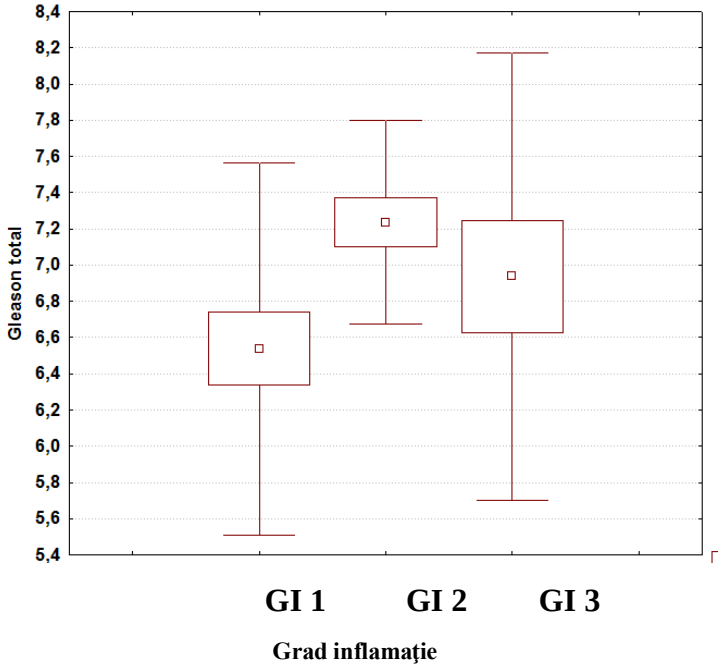

Figura 7. Scorul Gleason *în funcţie gradul de inflamaţie determinat histologic*

Legendă. Pe axa X: GI 1 – grad de inflamaţie 1, GI 2 – grad de inflamaţie 2, GI 3 – grad de inflamaţie 3. Pe axa Y este reprezentată valoarea scorului Gleason total. Valorile sunt prezentate ca valoare medie (pătrăţel) cu deviaţie standard (bară) şi eroare standard (căsuţa).

Mai mult, a fost detectat un trend general de creştere a severităţii cancerului de prostată, estimat pe baza scorului Gleason, odată cu gradul de inflamaţie (Figura 7). Acest trend a fost semnificativ în cazul comparaţiei între subiecţii cu grad 2 de inflamaţie prostatică şi subiecţii cu grad 1 de inflamaţie prostatică (test Fisher LSD, $p = 0.027$; Figura 6), dar nu şi în cazul comparaţiei între subiecţii cu grad 3 de inflamaţie prostatică şi subiecţii cu grad 1 de inflamaţie prostatică (test Fisher LSD, $p = 0.208$; Figura 6).

De asemenea, valoarea mediană a PSA-ul sangvin a crescut odată cu volumul prostatic (Figura 8). Mai mult, este de notat heterogenitatea mult mai mare valorilor măsurate ale PSA, în

cadrul bărbaţilor cu volum prostatic mediu între 40 cm^3 şi 70 cm^3 , comparativ cu celălalte două categorii analizate (Figura 8). Aplicarea analizei neparametrice a indicat diferenţe semnificative între indivizii aparţinând diferitelor categorii de volum prostatic, în ceea ce priveşte valoarea PSA-ului sangvin (testul Medianei, p = 0,045). Valorile măsurate au fost în mod semnificativ mai mari atunci când au fost comparaţi subiecţii cu volum prostatic mai mare sau egal ca 70 cm^3 (test Mann-Whitney, p = 0.047; Figura 8) cu restul categoriilor de volum, dar nu şi în cazul celor cu volum prostatic între 40 cm^3 şi 70 cm^3 (test Mann-Whitney, p = 0.075; Figura 8) cu cei prezentând volum prostatic mai mic sau egal cu 40 cm^3.

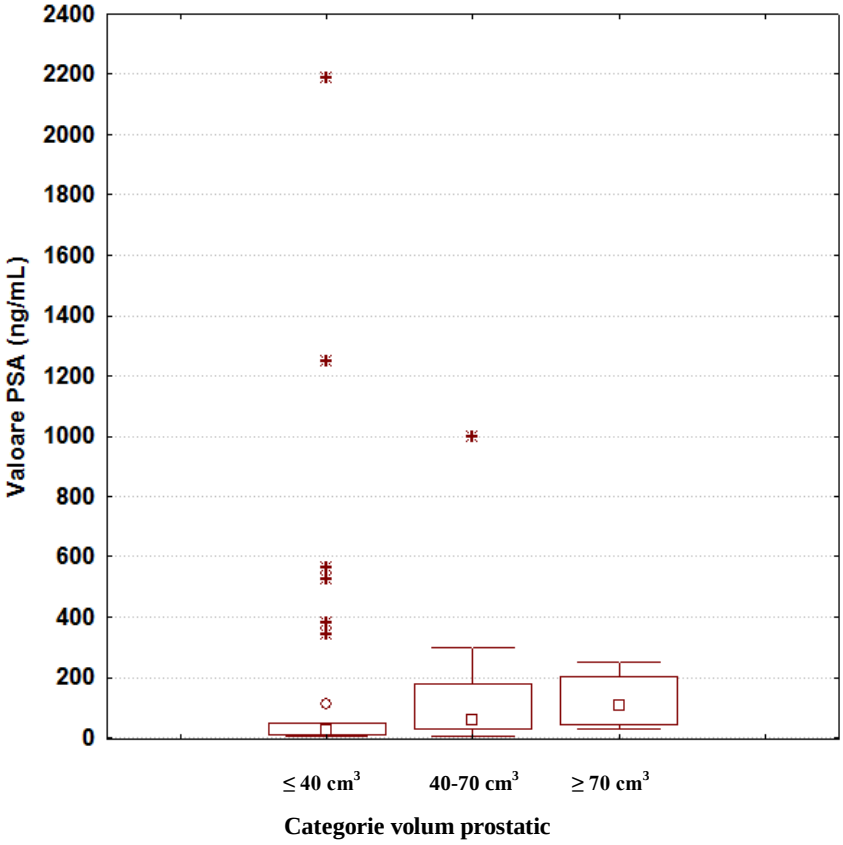

Figura 8. *Valoarea PSA sangvin în funcţie de volumul prostatic.*

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare mediană (linie) cu intervalul din quartiala inferioară şi cea superioară (căsuţă), interval al valorilor fără outlieri (bară), outlieri (cerc) şi valori extreme (steluţă).

În prezentul studiu nu au fost observată o relaţie clară în ceea ce priveşte severitatea cancerului de prostată şi vârsta pacienţilor, ci mai degrabă o omogenitate a acestuia în cadrul categoriilor de vârstă luate în analiză. Astfel, nu au fost observate diferenţe semnificative între valorea a medie a scorului Gleason între diferitele categorii de vârstă examinate (test ANOVA, p = 0.578; Figura 9).

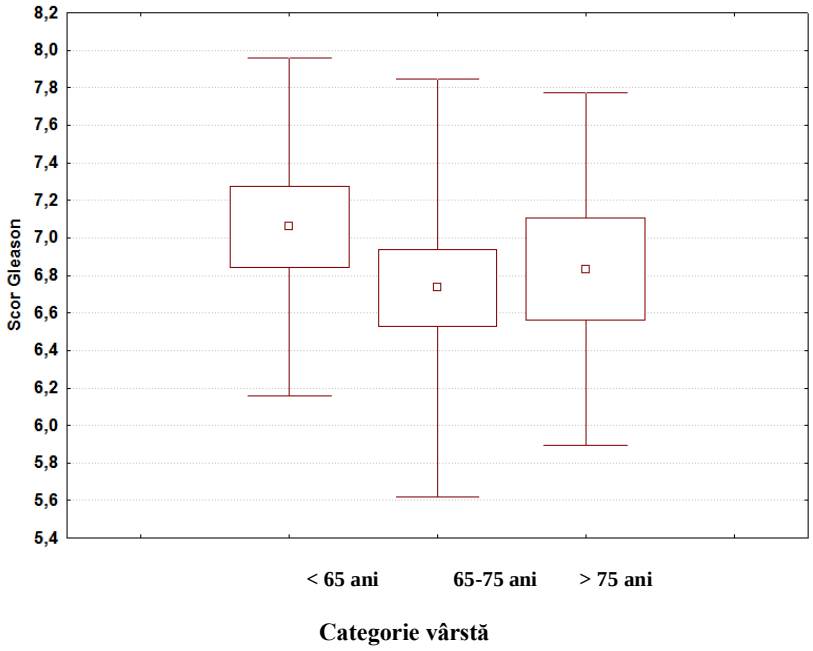

Figura 9. Categoria de scor Gleason *în funcţie de vârstă.*

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare medie (linie) cu deviaţie standard (bară) şi eroare standard (căsuţă).

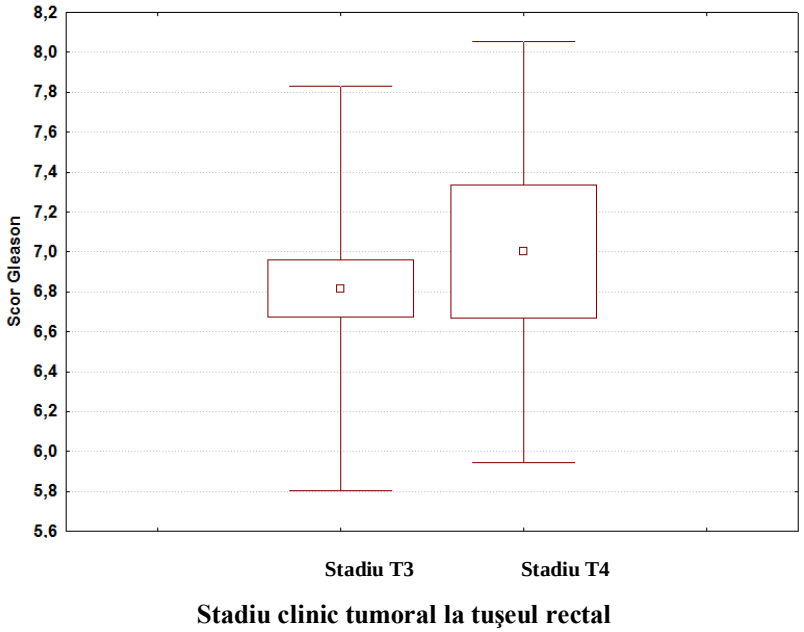

Figura10. *Stadiul clinic tumoral identificat la tuşeul rectal şi scorul Gleason.*

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare medie (linie) cu deviaţie standard (bară) şi eroare standard (căsuţa).

La tuşeul rectal cei mai mulţi *pacienţi* (50, 83%) au fost descoperiţi în stadiul T3, marea majoritate a acestora (respectiv 33, 66%) prezentând un scor Gleason mediu (7). În cadrul prezentei investigaţii, scorul Gleason a fost mai mare în cazul pacienţilor în stadiu clinic tumoral T4, comprativ cu cei cu cancer în stadiul T3, dar aceste diferenţe nu au fost semnificative din punct de vedere statistic (test t, $p = 0.605$; Figura 10).

Majoritatea pacienţilor incluşi în acest studiu, au prezentat gradul 1 de inflamaţie determinat histologic, indiferent de volumul prostatic, cu cele mai ridicate valori ale gradului de inflamaţie, înregistrându-se la pacienţii cu volum prostatic mediu (40-70 cm^3). Mai mult, deşi nu au fost observate diferenţe semnificative între grupurile analizate (test ANOVA, p = 0.311; Figura 11), a fost evidenţiat un trend evident de creştere a volumului prostatic odată cu creşterea gradului de inflamaţie (Figura 11). Pe aceaşi direcţie a fost, de asemenea, observată o creştere a gradului de heterogenitate a valorilor măsurate (Figura 11).

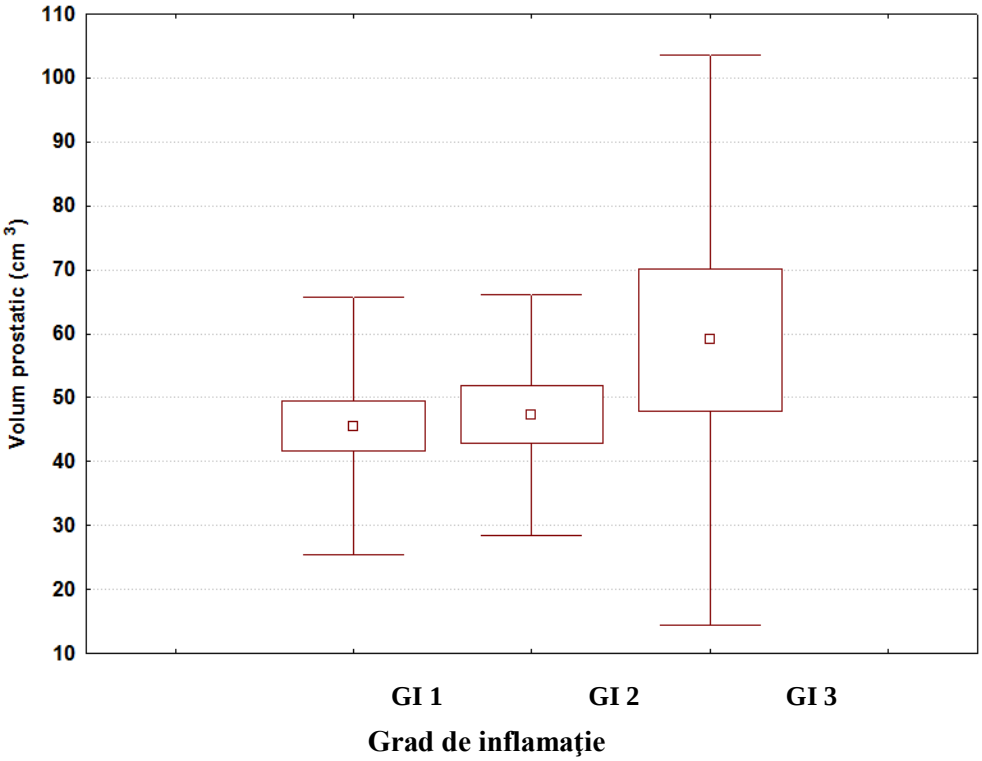

Figura 11. Distribuţia volumului prostatic *în funcţie de gradul de inflamaţie asociat focarelor de cancer de prostată determinat histologic.*

Legendă. Pe axa X: GI 1 – grad de inflamaţie 1, GI 2 – grad de inflamaţie 2, GI 3 – grad de inflamaţie 3. Valorile sunt prezentate ca valoare medie (linie) cu deviaţie standard (bară) şi eroare standard (căsuţa).

Analiza evenimentelor epigenetice de metilare (5mC) şi hidroximetilare (5hmC) globală în bolile prostatice

În urma recoltării sangelui venos periferic, prin metode de laborator s-a evaluat gradul de metilare şi hidroximetilare globală, al pacienţilor incluşi în studiu, urmărindu-se variaţiile acestor parametrii la fiecare timp de control (T0, T1, T2, T3, T4), în vederea corelării datelor de evaluare cu cele clinice şi întocmirea modelelor de evoluție a bolii pe baza profilului epigenomului de la momentul diagnosticului. Deasemenea s-a urmărit variaţia acestor parametrii la pacienţii cu cancer de prostată aflaţi sub tratament hormonal.

5 - metilcitozina (5 mC) reprezintă nivelul de metilare globală şi este creată într-o reacţie enzimatică postreplicativă, în care una din cele 4 ADN metiltransferaze (DNMTs I, IIIA, III B si III L) transferă o grupare metil, de la *S-adenosilmetionina* la carbonul din poziţia a 5-a a citosinei, cu precădere la nivelul insulelor CpG.

5 - hidroximetilcitosina (5 hmC) reprezintă produsul de oxido - reducere a *5 – metilcitozinei*, obţinut în urma unor reacţii enzimatice catalizate de familia Ten – Eleven Translocation (TET 1,2 3). Nivelele de 5 hmC variază substanţial la nivel celular şi tisular, găsindu-se în cantităţi mai mari în creier, în particular în neuroni. Conversia 5 mC la 5 hmC duce automat la scăderea nivelelor de 5 mC la orice poziţie din nucleotid sau chiar la nivelul întregului genom, constituind un prim pas pe calea de demetilare a ADN-ului. [53]

Scăderea nivelului de demetilare (5 hmC), creat prin defect de oxidare a 5 mC, poate inversa balanţa în favoarea unei stări de hipermetilare la nivelul insulelor CpG, cât şi la nivel global al genomului. În cancer nivelele de 5 hmC sunt semnificativ reduse la nivel tumoral, în raport cu ţesutul normal din vecinatate. [54]

Analiza evenimentelor epigenetice de metilare (5mC) globală în bolile prostatice

În cazul timpului T0, s-a observat că valorile măsurate pentru diferitele categorii de pacienţi au fost heteroscedastice (test Levene, $p < 0{,}001$). Dispersia mare a valorilor a fost observată în cazul pacienţilor BPH, PC şi ASAP, dar nu pentru indivizii martor. Analiza ANOVA a demonstrat existenţa unor diferenţe foarte semnificative între diferitele tipuri de patologii prostatice (Welch ANOVA, $p < 0{,}001$). Astfel, pacienţii din grupul BPH au avut niveluri semnificativ mai mari de 5mC în sânge comparativ cu pacienţii din grupurile PC (test Newman-Keuls, $p = 0{,}040$), ASAP (test Newman-Keuls, $p = 0{,}046$) şi CT (test Newman-Keuls, $p = 0{,}009$). În schimb, restul comparaţiilor post-hoc au evidenţiat valori similare între grupurile comparate (test Newman-Keuls, $p \geq 0{,}408$).

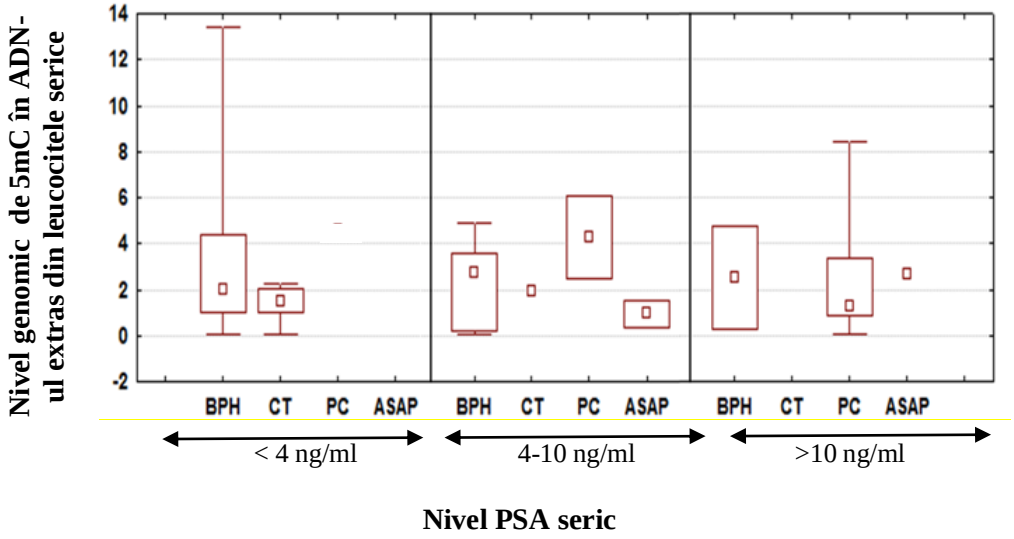

Figura 12. Valorile medii ale 5 mC la în funcţie de categoria de patologie prostatică şi nivelul PSA-ului seric.

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare mediană (linie) cu interval al valorilor fără outlieri (bară) şi intervalul din quartiala inferioară şi cea superioară (căsuţă). BPH – pacienţi cu hiperplazie benignă de prostată; CT - pacienţi sănătoşi (grup control); PC - pacienţi cu cancer de prostată; ASAP – pacieţi cu leziuni premaligne.

Când pacienţii au fost stratificaţi pe baza categoriei de PSA, numărul limitat de cazuri, a făcut nefezabilă realizarea unor analize statistice detaliate (Figura 12). Totuşi este de remarcat o tendinţă de scădere a cantităţii de 5mC din ADN-ul leucocitar al pacienţilor cu cancer de prostată

odată cu creşterea PSA, în timp ce la pacienţii cu BPH cantiatea de 5mC tinde să rămâne constantă (Figura 12).

Conținutul global de 5mC nu a fost corelat semnificativ cu nivelul PSA seric atât atunci când această analiză a fost efectuată pe datele cumulate pentru ambele variabile (ρ = - 0,03, p> 0,05) cât şi atunci când această analiză a fost efectuată doar pe datele corespunzătoare grupului PC (ρ = - 0,01, p > 0,05).

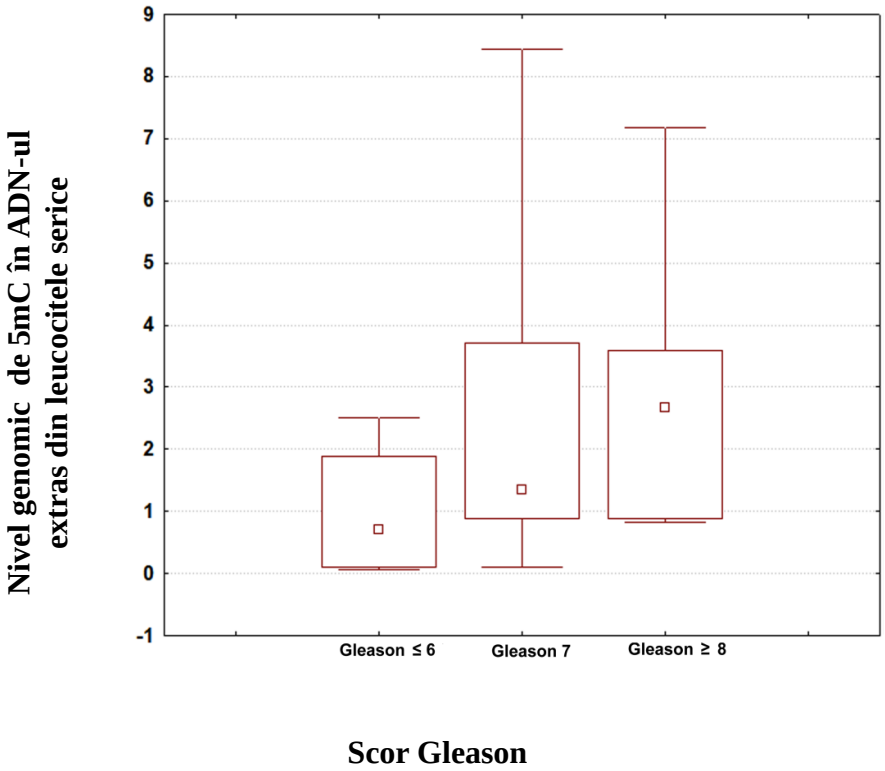

Figura 13. Nivelul de metilare globală (5mC) în funcţie de agresivitatea cancerului de prostată.

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare mediană (linie) cu interval al valorilor fără outlieri (bară) şi intervalul din quartiala inferioară şi cea superioară (căsuţă).

Evaluarea nivelurilor de 5mC în funcție de clasa de scor Gleason sugerează existența unui trend de creștere a metilării globale odată cu agresivitatea cancerului de prostată (Figura 13).

Analiza în evoluție a pacienților din grupurile de studiu a indicat clar existenţa tendinței de scădere a gradului de metilare inițial, de la diagnostic (T0) in evolutie la T1- 3 luni si T2- 6 luni, în special la pacienţii cu cancer de prostată aflaţi sub tratament hormonal, comparativ cu grupurile control, adenom de prostată şi leziuni premaligne (Figura 14).

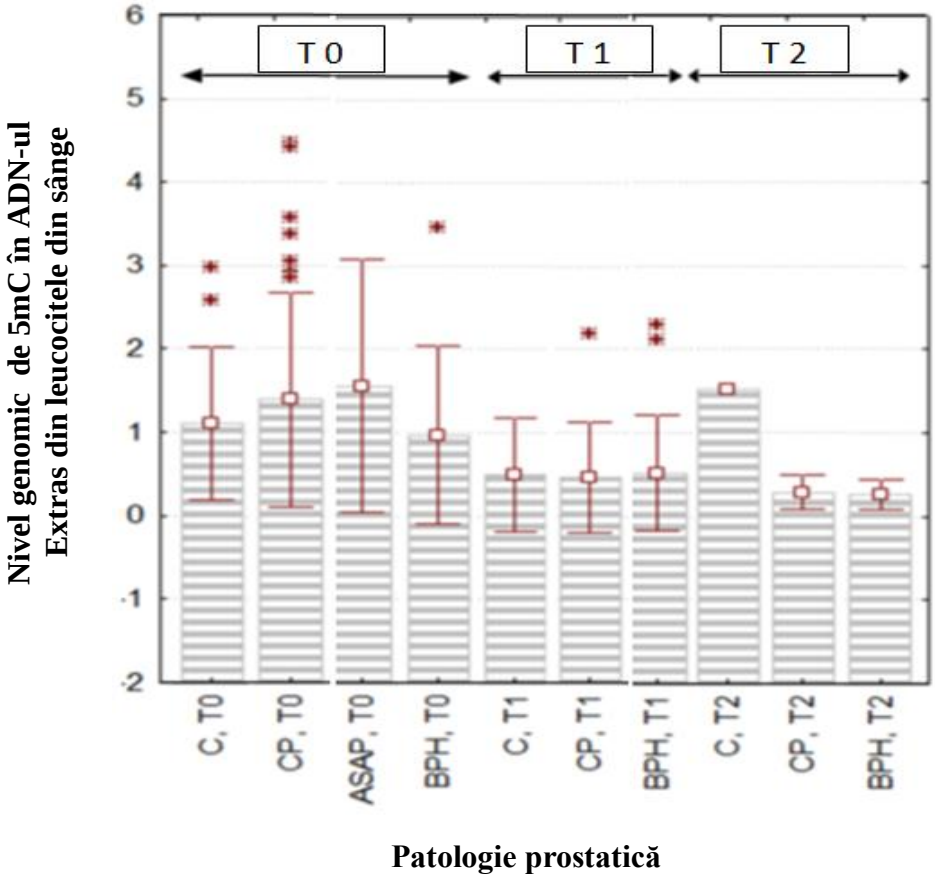

Figura 14. Evoluţia temporală a nivelului de metilare globală (5mC) în funcţie de patologia prostatică.

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare medie (coloană) cu o deviaţie standard (bară) şi valori extreme (steluţe). BPH – pacienţi cu hiperplazie benignă de prostată; C - pacienţi sănătoşi (grup control); CP - pacienţi cu cancer de prostată; ASAP – pacieţi cu leziuni premaligne, CPs - pacienţi suspecţi de cancer de prostată (fără confirmare histologică).

Deasemenea analiza în evoluție a pacienților cu cancer de prostată aflaţi sub tratament hormonal, a arătat clar tendința de scădere a gradului de metilare inițial de la diagnostic (T0) în evoluţie la T1- 3 luni şi respectiv T2- 6 luni (Figura 15).

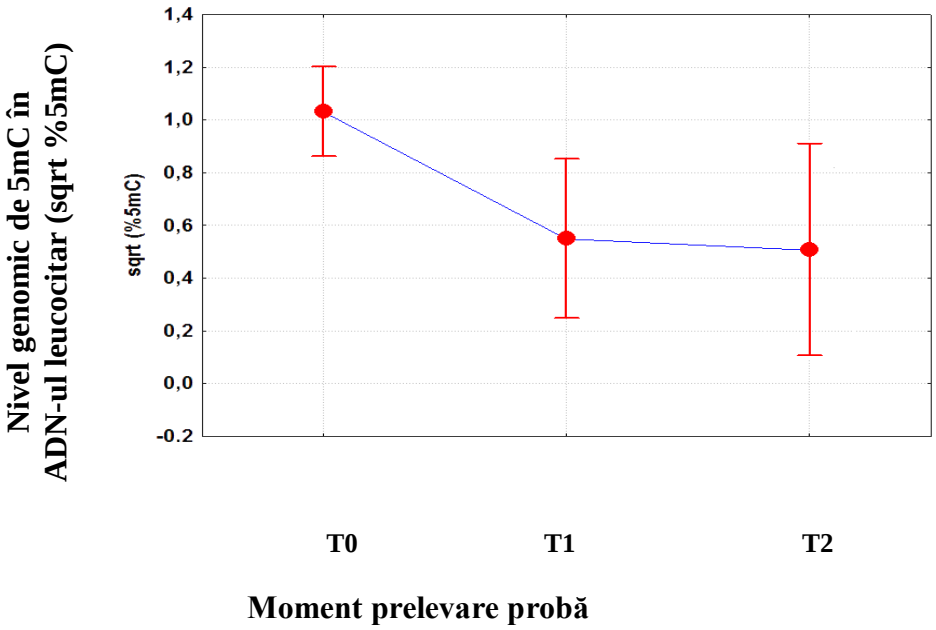

Figura 15. Evoluţia temporală a nivelului de metilare globală (5mC) la pacienţii cu cancer de prostată sub tratamant hormonal - BAT (blocadă androgenică completă).

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare medie (punct) cu o deviaţie standard (bară). CP- cancer de prostată ; T0 – moment diagnostic (0 luni); T1- 3 luni ; T2 – 6 luni.

Analiza evenimentelor epigenetice de hidroximetilare (5hmC) globală în bolile prostatice

Nivelurile medii de 5hmC în ADN-ul leucocitar au variat între 0,02% şi 0,12%. Valorile măsurate au fost uşor crecute la pacienţii cu cancer de prostată (grup PC) comparativ cu grupul control (Figura 16). În contrast, nivelurile globale de hidroximetilare determinate în ADN-ul subiecţilor având hiperplazie benignă de prostată (grup BPH) şi leziuni premaligne (grup ASAP) au prezentat valori mult mai crescute comparativ cu lotul martor (Figura 16). În această direcţie, analiza ANOVA a demonstrat existenţa unor diferenţe foarte semnificative între diferitele tipuri de patologii prostatice în ceea ce priveşte nivelul total de ADN hidroximetilat din leucocitele sangvine (test Welch ANOVA, $p < 0{,}001$). Astfel, a fost determinat faptul că pacienţii din grupul ASAP au prezentat niveluri semnificativ mai mari de 5hmC comparativ cu pacienţii din grupurile PC (test Newman-Keuls, $p = 0{,}040$), BPH (test Newman-Keuls, $p = 0{,}046$) şi CT (test Newman-Keuls, $p = 0{,}009$), dar nu au fost identificate diferenţe semnificative în cadrul celorlalte analize realizate (test Newman-Keuls, $p \geq 0{,}067$).

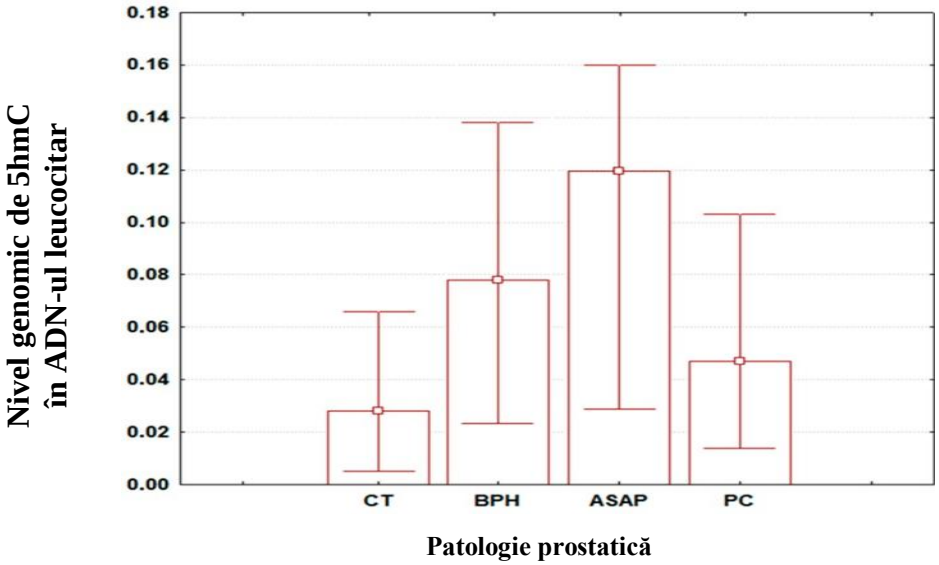

Figura 16. Nivelul de hidroximetilare globală (5hmC) în ADN-ul leucocitar la pacienţii cu diferite patologii prostatice

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare mediană (coloană) cu intervalul dintre quatila inferioară şi cea superioară (bară). BPH – pacienţi cu hiperplazie benignă de prostată; CT - pacienţi sănătoşi (grup control); PC - pacienţi cu cancer de prostată; ASAP – pacieţi cu leziuni premaligne de prostată..

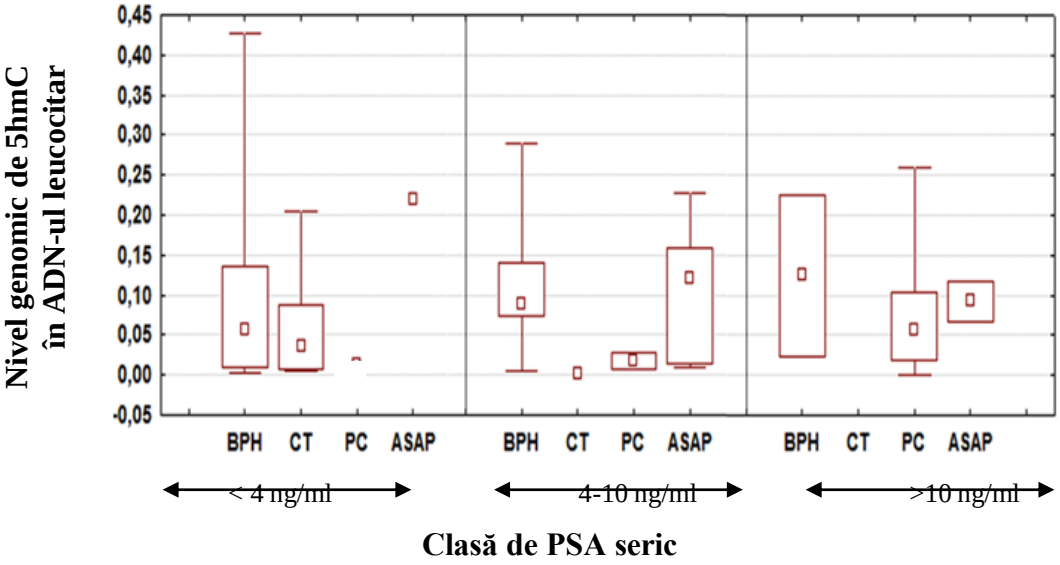

Figura 17. Nivelul de hidroximetilare globală (5hmC) în ADN-ul leucocitar la pacienţii cu diferite patologii prostatice stratificaţi în funcţie de clasa de PSA

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare mediană (linie) cu interval al valorilor fără outlieri (bară) şi intervalul din quartiala inferioară şi cea superioară (căsuţă). BPH – pacienţi cu hiperplazie benignă de prostată; CT - pacienţi sănătoşi (grup control); PC - pacienţi cu cancer de prostată; ASAP – pacieţi cu leziuni premaligne de prostată.

Când pacienţii au fost stratificaţi în funcţie de clasa de PSA seric, trendurile observate mai sus în ceea ce priveşte variaţia valorii 5hmC în cadrul diferitelor patologii prostatice comparativ cu lotul martor s-au menţinut, indiferent de clasa PSA luată în calcul (Figura 17). Clasificarea pacienţilor cu nivele ridicate de ADN hidroximetilat şi pacienţi cu nivele scăzute de ADN hidroximetilat, utilizând quartila superioară a valorilor măsurate în cadrul grupului martor drept cut-off point (Tabel 12) şi analiza statistică a datelor astfel obţinute, a relevat diferenţe semnificative în distribuţia pacienţilor cu nivele scăzute de 5hmC în funcţie de patologia prostatică (test chi^2, $p = 0.043$).

Tabel 12. Distribuţia nivelului de hidroximetilare globală (5hmC) şi PSA în funcţie de patologia prostatică

Patologie prostatică	**Nivelul de hidroximetilare globală**		**PSA**			**Corelaţie 5hmc-PSA**
	Mic	**Mare**	**Mic**	**Mediu**	**Mare**	
CT	77,78%	22,22%	88,89%	11,11%	0,00%	0,18 (0,62)
BPH	42,50%	57,50%	60,00%	35,00%	5,00%	0,22 (0,15)
ASAP	30,00%	70,00%	10,00%	70,00%	20,00%	0,12 (0,73)
PC	66,67%	33,33%	3,70%	7,41%	88,89%	0,23 (0,24)

Legendă. Valorile corelaţiilor sunt prezentate ca valoare absolută a corelaţiei Spearman cu prag de semnificaţie statitistică (în paranteză). BPH – pacienţi cu hiperplazie benignă de prostată; CT – subiecţi sănătoşi (grup control); PC - pacienţi cu cancer de prostată; ASAP – pacieţi cu leziuni premaligne de prostată.

De asemenea, utilizarea unei abordări similare în cazul PSA (vezi Material şi Metodă, Analiză statistică; Tabel 12) a condus la identificarea unor diferenţe semnificative în distribuţia PSA-ului seric în funcţie de patologia prostatică (test chi^2, $p < 0.001$), cu niveluri scăzute fiind identificate la subiecţii sănătoşi şi cei cu hiperplazie benignă de prostată (grup BPH), valori medii la subiecţii cu leziuni premaligne de prostată (grup ASAP) şi, de departe, valorile cele mai crescute fiind osbservate la subiecţii cu cancer prostată (grup PC). Totuşi, analiza corelaţională nu a identificat asociere semnificativă între PSA-ul seric şi nivelul de 5hmC din ADN-ul leucocitar al pacienţilor, indiferent de patologia prostatică analizată.

În ceea ce priveşte relaţia dintre agresivitatea cancerului de prostată şi nivelul de hidroximetilare globală, nu au fost identificate diferenţe semnificative statistic între grupurile analizate (Kruskall Wallis, p = 0,234), şi mai mult chiar nivelurile mediane măsurate au fost relativ similare în cadrul acestor loturi (Figura 18).

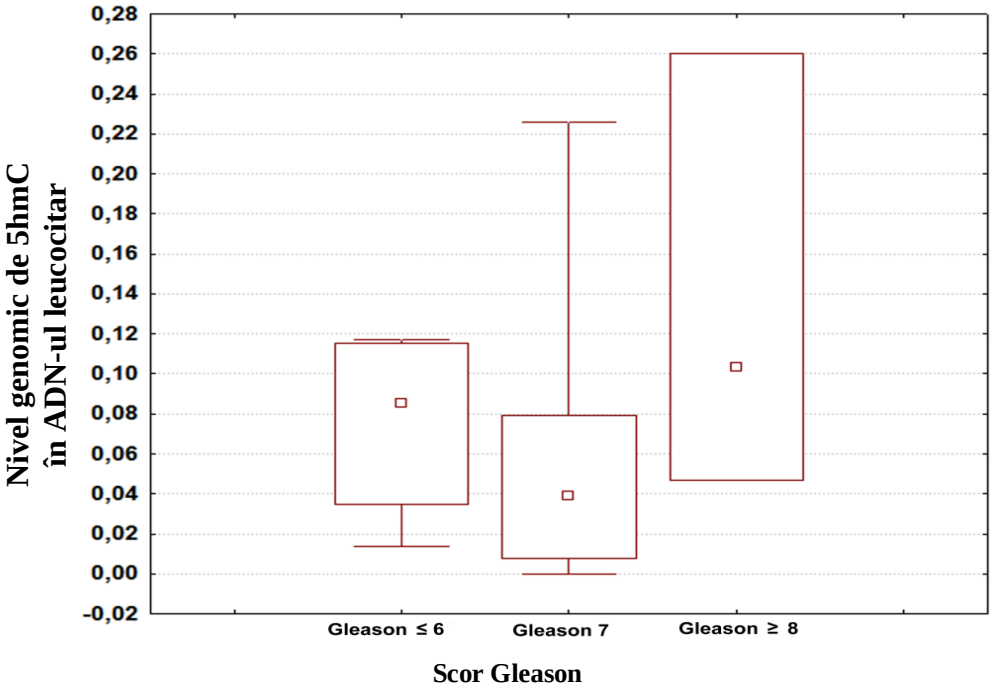

Figura 18. Nivelul de hidroximetilare globală (5hmC) în ADN-ul leucocitar în funcţie de gradul de agresivitate al cancerului

Legendă. Valorile sunt prezentate ca valoare mediană (linie) cu interval al valorilor fără outlieri (bară) şi intervalul din quartiala inferioară şi cea superioară (căsuţă).

Concluziile analizei corelaţionale a parametriilor standard utilizaţi în diagnosticul şi prognosticul cancerlui de prostată

Valoarea PSA-ului seric creşte în funcţie de severitatea patologiei prostatice, pacienţii cu cancer de prostată dispunand de cele mai mari valori.

Valoarea PSA-ului seric scade odată cu creşterea vârstei pacienţilor.

Gradul de inflamaţie cronică determinat histologic, s-a corelat pozitiv cu nivelul PSA-ului seric.

PSA-ul seric se corelează pozitiv cu volumul prostatic.

Pacienţi diagnosticaţi cu cancer de prostată agresiv, au dezvoltat boala la vârstă mai tânără decât restul grupelor de vârstă.

Volumul prostatic, s-a corelat pozitiv cu stadiul clinic tumoral identificat la tuşeul rectal.

Scolul Gleason s-a corelat pozitiv cu nivelul PSA-ului seric.

Concluziile studiului molecular

Niveluri detectabile de 5mC și 5hmC au fost observate în fiecare grup de patologie prostatică.

Modele de metilare şi hidroximetilare variabile, au fost obținute în funcţie de patologia prostatică, agresivitatea cancerului de prostată şi în comparaţie cu PSA-ul seric.

Cele mai mari niveluri de metilare globală (5mC) s-au identificat la pacienții cu adenom de prostată.

Nivelul de metilare globală (5mC) se corelează pozitiv cu agresivitatea cancerului de prostată.

Conținutul global de 5mC nu a fost corelat semnificativ cu nivelul PSA seric, indiferent de patologia prostatei sau pe datele corespunzătoare grupului PC.

Gradul de metilare globală (5mC) scade sub influența tratamentului hormonal la pacienții cu cancer de prostată.

Cele mai scazute niveluri de hidroximetilcitozină s-au identificat la pacientii cu cancer de prostată în raport cu restul patologiilor prostatice.

Nu s-a constatat nici o asociere semnificativă între nivelul de hidroximetilare globală (5hmC) și nivelul PSA-ului seric în funcţie de severitatea patologiei prostatice.

Nu s-a constatat nici o asociere semnificativă între nivelul de hidroximetilare globală (5hmC) și gradul de agresivitate al cancerului de prostată.

CONCLUZII GENERALE

Potrivit cunştinţelor noastre, acesta este primul studiu care a investigat relevanţa clinică a metilarii şi hidroximetilării globale a ADN-ului leucocitar, la pacienţii cu diferite patologii prostatice, inclusiv cancer de prostată.

PSA-ul seric în ciuda organo-specificităţii sale, a îndeplinit funcţia de 'gold standard' al biomarkerilor de diagnostic al cancerului de prostată.

Corelaţia parametrilor standard prezintă valoare, în vederea obţinerii unui factor de prognostic la momentul diagnosticului cancerului de prostată.

Niveluri detectabile de 5mC și 5hmC au fost observate în fiecare grup de patologie prostatică.

Modele de metilare şi hidroximetilare variabile, au fost obținute în funcţie de patologia prostatică, agresivitatea cancerului de prostată și în comparaţie cu PSA-ul seric.

Considerăm că datele prezentate merită susţinute în observaţie cu studii ulterioare, în vederea utilităţii lor clinice complementare PSA-ului seric, oferind astfel un panel epigenetic de referinţă, în diagnosticul şi prognosticul cancerului de prostată.

BIBLIOGRAFIE

1. Ioirat I, Muresanu H., Urologie ed a 2-a, rev.,' Vasile Goldis' University press, Arad 2014; Pag 183.

2. Chowdhury B., Cho I.H., Irudayaraj J. Technical advances in global DNA methylation analysis in human cancers. J. Biol. Eng. 2017;11:10.

3. Patricia A. Thompson,[*] Mahin Khatami,[1] Carolyn J. Baglole,[2] Jun Sun,[3], Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk, Carcinogenesis. 2015 Jun; 36(Suppl 1): S232–S253., Published online 2015 Jun 19.

4. Kurdyukov S., Bullock M. DNA methylation analysis: Choosing the right method. Biology. 2016;5:3

5. Branco MR, şi colab. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. Nat Rev Genet 13(1):7–13 (2012) ;

6. Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer n Lett* 2009; 282: 125–136;

7. Gupta-Elera G, Garrett AR, Robison RA, O'Neill KL. The role of oxidative stress in prostate cancer. *Eur J Cancer Prev*2012; 21: 155–162;

8. Smeets E., Lynch A.G., Prekovic S., The role of TET-mediated DNA hydroxymethylation in prostate cancer. Mol. Cell. Endocrinol. 2017 doi: 10.1016/j.mce.2017.08.021.

9. Campbell-Walsh Urology, Tenth Edition, cap 18 pag 559;

10. Campbell-Walsh Urology, Tenth Edition, Cap 18 Pg.536, 537;

11. Campbell-Walsh Urology, Tenth Edition, cap 18 pag 535, 536

12. Ambert V., Actualităţi în diagnosticul cancerului de prostată; Revistă Medicală Romană – vol. LVIII, Nr. 4, 2011;

……

NUMAR TOTAL DE REFERINŢE ÎN TEXT 124

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

Articole ISI

1. **Alin Grelus**,[1,2,†] Dragos V. Nica,[1,†] Imola Miklos,[1,2] Valerica Belengeanu,[1] Ioan Ioiart,[1,2] and Cristina Popescu[1,3,] Clinical Significance of Measuring Global Hydroxymethylation of White Blood Cell DNA in Prostate Cancer: Comparison to PSA in a Pilot Exploratory Study, Int J Mol Sci. 2017 Nov; 18(11): 2465. Published online 2017 Nov 20. doi: 10.3390/ijms18112465, *International Journal of Molecular Sciences* - Impact Factor 3.687

Articole BDI

1. ***Alin Grelus**, Imola Miklos, Dragoş Botezatu, Horia Mureşanu, Ioan Ioiart,* Correlation between Standard Parameters in newly diagnosed Prostate Cancer patients, in Arad County, *in-press* Rom J Urol nr 1:2018 ISSN: 1223-0650 CNCSIS: B-486
2. **Alin Greluş**, Miklos Imola, Botezatu Dragoş, Mureșanu Horia, Crișan Adrian, Ioan Ioiart, Correlation Between PSA Level And Gleason Score In Newly Diagnosed Prostate Cancer Patients In Arad County, Jurnal Medical Aradean (Arad Medical Journal) Vol. XX, issue 3, 2017, pp. 34-39:2017
3. Imola Donath-Miklos, **Alin Greluş**, Horia Mureșanu, Ioan Ioart IPSS Score Proves His Clinical Relevance In Benign Prostate Hypertrophy Diagnosis And Follow-up – *in-press* Rom J Urol nr 1:2018 ISSN: 1223-0650 CNCSIS: B-486
4. Imola Miklos, **Alin Greluş**, Dragoş Botezatu, Horia Mureșanu, Adrian Crișan, Paul Deme, Ioan Ioiart Prevalence Of Prostate Diseases In A Cohort Study Conducted In Radioactive Contaminated Areas In Arad County, Jurnal Medical Aradean (Arad Medical Journal) Vol. XXI, issue 1, 2018, pp. 16-20
5. Adrian Crisan, Imola Miklos, **Alin Greluş**, Horia Mureșan, Paul Deme, Ioan Ioiart, Materials And Methods In Evaluation Of Castrate Resistant Prostate Cancer Patients, Jurnal Medical Aradean (Arad Medical Journal) Vol. XX, issue 3, 2017, pp. 27-29: 2017