



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

Διευθυντής ΠΜΣ :κ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΟΓΔΑΝΟΣ

Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τίτλος διπλωματικής εργασίας:

"Μελέτη γενετικών παραλλαγών γονιδίων που εμπλέκονται στην
αυτοφαγία σε ασθενείς με καρκίνο προστάτη"

Τίτλος στα αγγλικά:

"Study of genetic variants of genes involved in autophagy in prostate
cancer patients"

ΕΛΕΝΗ Ι. ΜΑΡΑΓΚΟΥΛΗ

ΙΑΤΡΟΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ Α.Π.Θ.

Λάρισα, 2025

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2025

"Βεβαιώνω ότι η παρούσα διπλωματική εργασία είναι αποτέλεσμα δικής μου δουλειάς και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά και όπου απαιτείται έχω παραθέσει τις πηγές τους στο τμήμα της βιβλιογραφίας".

Υπογραφή

.....

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

Τριμελής επιτροπή:

1. κ. Μαρία Σαμαρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία (Επιβλέπουσα)
2. κ. Δημήτριος Μπόγδανος, Καθηγητής Παθολογίας και αυτοάνοσων νοσημάτων
3. κ. Ελένη Ειρήνη Θώδου, Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής». Υπεύθυνη και επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας ήταν η κ. Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα. Υπό την καθοδήγησή της και παρά το ιδιαίτερα φορτωμένο πρόγραμμά της, υπήρξε πάντα πρόθυμη να βοηθήσει και να μεταδώσει τις γνώσεις της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κ. Ελένη Ειρήνη Θώδου και τον Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος κ. Δημήτριο Μπόγδανο, για τη στήριξη, τις πολύτιμες συμβουλές τους και τον χρόνο που αφιέρωσαν καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην διδάκτορα κ. Αφροδίτη Καλογιάννη, η οποία από την πρώτη στιγμή βρέθηκε δίπλα μου, καθοδηγώντας με σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες και υπενθυμίζοντάς μου την αξία της υπομονής και της επιμονής.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον φίλο και συνάδελφο κ. Ευάγγελο Μπουρνάκη, παθολόγο-ογκολόγο και Διευθυντή της Α' Ογκολογικής Κλινικής του Metropolitan General, για την προμήθεια υλικού βιοψιών και φακέλων ασθενών. Επίσης, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το άριστο και συνεργατικό κλίμα που καλλιεργείται στον χώρο μας.

Τέλος, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος για τις γνώσεις που μου μετέφεραν, καθώς και στην οικογένεια και τους φίλους μου για τη συνεχή στήριξη και την πίστη που έδειχναν σε εμένα σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ευχαριστώ πολύ!

Ελένη Μαραγκούλη

ΕΛΕΝΗ ΜΑΡΑΓΚΟΥΛΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2025

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

κ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΟΓΔΑΝΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: κ. Μαρία Σαμαρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σύμβουλος: κ. Ελένη Ειρήνη Θώδου, Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος: κ. Δημήτριος Μπόγδανος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων, Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Ο καρκίνος του προστάτη είναι η πρώτη πιο συχνή κακοήθεια στους άνδρες μετά η δεύτερη πιο συχνή στο σύνολο πληθυσμού με πρώτο τον καρκίνο μαστού. Το 98% των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη εμφανίζονται σε άτομα άνω των 50 ετών, αλλά όταν εμφανίζεται σε νεότερους άνδρες, μπορεί να είναι αρκετά επιθετικός. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, στην Ευρώπη, ο καρκίνος του προστάτη ήταν ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος το 2022 στο γενικό πληθυσμό και πρώτος σε άνδρες με ποσοστό 20%, και στην Ελλάδα ήταν ο πρώτος πιο συχνός καρκίνος σε άνδρες με ποσοστό 19,6%.

Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη περιλαμβάνουν την προχωρημένη ηλικία, την εθνικότητα, τους γενετικούς παράγοντες καθώς και το οικογενειακό ιστορικό. Το μονοπάτι διαμετάδοσης σήματος PI3K, εμπλέκεται σε πολλούς τύπους καρκίνου και στον προστάτη, και συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση και υψηλότερα GS. Η αυτοφαγία αποτελεί έναν ομοιοστατικό μηχανισμό, ο οποίος εμπλέκεται στις διαδικασίες της γήρανσης και της καρκινογένεσης. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν έναν διττό ρόλο του μηχανισμού αυτοφαγίας, που σχετίζεται με τον τύπο του καρκίνου, το στάδιο του όγκου και φυσικά τη θεραπεία που χορηγείται. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε σε 30 ασθενείς με καρκίνο προστάτη και συλλογή κλινικών δεδομένων, τους πολυμορφισμούς rs78835907 και rs8044820 των γονιδίων *ATG16L1* και *MAP1LC3B* αντίστοιχα, τα οποία συμμετέχουν στο μηχανισμό της αυτοφαγίας και ειδικότερα στην ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος, καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι προαναφερόμενοι πολυμορφισμοί φαίνονται να εμπλέκονται στον καρκίνο του προστάτη και να επηρεάζουν την έκβαση των ασθενών. Επιχειρήσαμε συσχέτιση με μεταξύ τους και με έκφραση PI3K μεταλλάξεων, που μελετήσαμε στους ίδιους ασθενείς. Ο μικρός αριθμός δείγματος δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, συμφωνεί όμως η εμφάνιση πολυμορφισμών των δύο γονιδίων σε Ελληνικό πληθυσμό, με τη διεθνή βιβλιογραφία. Φάνηκε επίσης τάση (Fisher's Exact Test, $p = 0,067$ $p < 0,067$) στην εμφάνιση του rs8044820 του γονιδίου *MAP1LC3B* σε ασθενείς με μικρότερη θνησιμότητα, και επίσης τάση για μεγαλύτερη ηλικία διάγνωσης στους ασθενείς που την έφεραν. Η εργασία μας παρέχει κάποιες πρώτες

ενδείξεις για την κατανομή των συγκεκριμένων πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό, θα χρειαστούν όμως περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Λέξεις κλειδιά: καρκίνος του προστάτη, πολυμορφισμός σε γονίδια αυτοφαγίας, PI3K μετάλλαξη

Abstract

Prostate cancer is the most common malignancy in men, and the second most common in the general population, after breast cancer. 98% of prostate cancer cases occur in men over 50 years of age, but when it occurs in younger men, it can be quite aggressive. According to the World Health Organization, in Europe prostate cancer is the most common cancer in 2022 with a rate of 20%, same in Greece it is the most common cancer in men with a rate of 19.6%. The main risk factors for developing prostate cancer are advanced age, ethnicity, genetic factors and family history.

The PI3K signaling pathway is involved in many types of cancer, including prostate, and is associated with worse disease and higher GS. Autophagy is a homeostatic mechanism involved in the processes of aging and carcinogenesis. According to previous studies, there is evidence supporting a dual role of the autophagy mechanism, which is related to the type of cancer, the stage of the tumor and of course the treatment administered. In the present study, we examined in 30 patients with prostate cancer the polymorphisms rs78835907 and rs8044820 of the ATG16L1 and MAP1LC3B genes, respectively, and collected clinical data. The polymorphisms we examined, participate in the mechanism of autophagy and in particular in the maturation of the autophagosome, as according to the literature the aforementioned polymorphisms seem to be involved in prostate cancer and affect the outcome of patients. We attempted to correlate them with each other and with the expression of PI3K mutations, which we studied in the same patients. The small sample size did not lead to statistically significant results, but the occurrence of polymorphisms of the two genes in the Greek population is consistent with the international bibliography. A trend was also seen (Fisher's Exact Test, $p = 0.067$) in the occurrence of rs8044820 of the MAP1LC3B gene in patients with lower mortality, and a trend for an older age at diagnosis in patients who carried it.

Our study provides some first indications for the distribution of these polymorphisms in the Greek population, but further studies will be needed with a larger number of patients.

Key words: prostate cancer, autophagia polymorphisms, PI3K mutations

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DRE = δακτυλική εξέταση

PSA = προστατικό αντιγόνο

T = τεστοστερόνη

DHEA= διυδροεπινδροστερόνη

LH= ωχρινοποιητική ορμόνη

GnRH= γοναδοτροπίνες

PC= καρκίνος προστάτη

SHBG = σφαιρίνη δέσμησης ορμόνης του φύλου

DHT= 5-Διυδροστερόνη

T3= υπομονάδα-ελεύθερης τεστοστερόνης

SRD5A2= γονίδιο 5α αναγωγής

KYP= Καλοήθης υπερπλασία προστάτη

BHP= Καλοήθης υπερπλασία προστάτη

LUTS= Δυσουρικά ενοχλήματα

ESMO= European Society of Medical Oncologists

TRUS= διορθικός υπέρηχος

GS= Gleason Score

MRI= μαγνητική τομογραφία

DNA= δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

CTCs= ελεύθερα καρκινικά κύτταρα

CtDNAs= κυκλοφορούν νεοπλασματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

NCI=Διεθνές Ίδρυμα Μελέτης Καρκίνου

CYP17= ένζυμο στο μεταβολισμό τεστοστερόνης (CYP17A1 cytochrome P450 17α-hydroxylase/17,20-lyase)

SNP=μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός Single-nucleotide polymorphism

BCL2=γονίδιο λευχαιμίας

EPHB2=γονίδιο

MYC =γονίδιο

PTEN= PTEN phosphatase and tensin homolog

PI3K phosphatidylinositol-3-kinase

PKA protein kinase A

PALB2=γονίδιο παγκρεατικού και οικογενούς καρκίνου μαστού

BRCA 1 k 2 =γονίδια καρκίνου μαστού
 ATM= γονίδιο αταξίας τηλεαγγειεκτασίας
 NCOA2=γονίδιο που εμπλέκεται σε σαρκώματα
 PCAT1= prostate cancer associated transcript 1
 STK11= serine threonine kinase
 BMI=ΔΜΣ=δείκτης μάζας σώματος
 PAH= Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
 PMS2=πρωτεΐνη συστήματος επιδιόρθωσης
 MSH2=πρωτεΐνη συστήματος επιδιόρθωσης
 MLH1=πρωτεΐνη συστήματος επιδιόρθωσης
 NKX3= μεταγραφικός παράγοντας
 ETS=Ενδοθηλιακή μετατροπή (erythroblasttransformation-specific)
 ERG= transcription factors ETS (ERG ,ETV1 ,ETV4 ,ETV5 ,andFLI1)
 PEA2=polyomavirus enhancer binding protein 2 (cDNA)
 RB1=γονίδιο ρετινοβλαστώματος
 TP53=ογκογονίδιο P53
 NEPC=νευροενδοκρινής καρκίνος προστάτη
 mTOR=mammalian target of rapamycin
 PIP3 phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
 PIP2 phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
 AR =androgen receptor=Ανδρογονικός υποδοχέας
 ATR= πρωτεάση ανδρογονικού υποδοχέα
 RAD51=yeast cyclin modulator
 CDK=κυκλινοεξαρτώμενηκινάση
 CHEK2=check point kinase2
 SQ/TQ=SCD=ένζυμαελέγχουαποκορεσμούστεάτων
 EMT=επιθήλιο μεσεγχυματική μεταλλαγή
 ISUP= Διεθνής ένωση Ούροπαθολογοανατόμων
 TURP=Διουρηθρικήπροστατεκτομή
 ADT=θεραπεία στέρησης ανδρογόνων
 AMPK= κινάσημονοφωσφορυλίωσης
 RNA=ριβονουκλεικό οξύ
 KLFS=Krüppel-like factors in tumors
 CMA= Chaperone-mediated autophagy

ULK1= Unc-51-like autophagy activating kinase 1 autophagy related 13 (ATG13)

ATG13=αδενογουανίνη 13

ER=ενδοπλασματικό δίκτυο

MHCII= μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας

DNM1=Dynamin 1 like

HIF 1A= παράγοντας υποξίας 1

FGFs=παράγοντες ανάπτυξης ενδοθηλίου

HSD17,34= ydr;ojsteroeid;h 17-β υδρογονάση

PKA=οδός πρωτεϊνικών κινασών

RTK receptor tyrosine kinase

PH domain of leucine repeat sequence-rich phosphatase

lncRNAs= Long non-coding RNAs

miRNA=micro RNA

cRNA=κυκλικό RNA

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	8
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	14
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	15
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
A. Προστάτης Αδένας.....	16
A.1 Ανατομία – Ιστολογία.....	16
A.2 Παθοφυσιολογία του προστάτη αδένα.....	17
A.3 Ενδοκρινολογία του προστάτη αδένα.....	18
B. Καρκίνος του προστάτη	20
B.1 Επιδημιολογικά στοιχεία	20
B.2 Διάγνωση	22
B.2.1 Διαγνωστικές εξετάσεις	23
B.3 Παράγοντες κινδύνου	26
B.3.1 Ηλικία	27
B.3.2 Εθνικότητα και φυλετικές διαφοροποιήσεις.....	28
B.3.3 Διατροφή-Παχυσαρκία.....	29
B.3.4 Αγγειεκτομές [Vasectomy]	30
B.3.5 Κάπνισμα	31
B.3.6 Φλεγμονές του προστάτη	31
B.3.7 Οικογενειακό ιστορικό	32
B.4 Γενετική του καρκίνου του προστάτη	32
B.4.1 Οικογένειες γονιδίων σχετιζόμενες με καρκινογένεση προστάτη	34
B.4.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια	35
B.4.3 Γονίδια που σχετίζονται με τη σηματοδότηση του ανδρογονικού υποδοχέα (AR)	36
B.4.4 Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί DNA	37

B.5 Ιστοπαθολογία του όγκου	39
B.6 Βαθμός κακοήθειας (Gleason score)	43
B.7 Σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη κατά TNM (Tumor-Node-Metastasis)	45
B.8 Κλινικά συμπτώματα	48
B.9 Θεραπεία.....	49
Γ. Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί και γονίδια επιδιόρθωσης.....	51
Γ.1 Ο ρόλος των επιδιορθωτικών μηχανισμών	51
Γ.2 Επιδιορθωτικά μονοπάτια και καρκινογένεση	53
Γ.2.1 Πολυμορφισμοί στα γονίδια της αυτοφαγίας και καρκίνος του προστάτη.....	54
Γ.2.2 Είδη Αυτοφαγίας	56
Γ.2.3 Η διαδικασία της αυτοφαγίας.....	57
Γ.2.4 Ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο του προστάτη	58
Δ. PI3CA and AR σηματοδότηση.....	63
Η ΔΙΚΙΑ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ	66
1. ΣΚΟΠΟΣ66	
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	66
2.1 Υπό μελέτη πληθυσμός.....	66
2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από FFPET ιστικά δείγματα...	67
2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα.....	69
2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός γενωμικού DNA - Φωτομέτρηση.....	71
2.5 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης	71
2.6 Επιλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	72
2.7 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων.....	74
2.8 Καθαρισμός δειγμάτων για ανάλυση της αλληλουχίας.....	76
2.9 Αλληλούχηση κατά Sanger.....	77
2.10 Στατιστική ανάλυση	81
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	82
3.1 Κλινικά δεδομένα.....	82
3.2 Συσχέτιση των κλινικών δεδομένων με την μετάλλαξη του γονιδίου <i>PIK3CA</i>	82

3.3	Συσχέτιση της παρουσίας καρκίνου του προστάτη με τους πολυμορφισμούς rs8044820 του γονιδίου <i>MAP1LC3B</i> και rs78835907 του γονιδίου <i>ATG16L1</i>	85
3.4	Συσχέτιση των κλινικών δεδομένων με τους πολυμορφισμούς rs8044820 και rs78835907 των γονιδίων <i>MAP1LC3B</i> και <i>ATG16L1</i>	86
3.5	Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων στο γονίδιο <i>PIK3CA</i> με τους πολυμορφισμούς rs8044820 και rs78835907 των γονιδίων <i>MAP1LC3B</i> και <i>ATG16L1</i>	89
3.6	Κλινικά δεδομένα ασθενών που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>PIK3CA</i> και ετεροζυγωτία στους πολυμορφισμούς rs8044820 και rs78835907 των γονιδίων <i>MAP1LC3B</i> και <i>ATG16L1</i>	91
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	93
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	97

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.	Θερμικός Κυκλοποιητής τύπου Eppendorf.	73
Εικόνα 2.	Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για τον πολυμορφισμό rs78835907 του γονιδίου <i>ATG16L1</i> σε πήκτωμα αγαρόζης 3% σύστασης. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας (M) γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους 100 bp (Nippon Genetics). S1-S15: Δείγματα ασθενών με καρκίνο προστάτη, NTC: Non template control, μάρτυρας για έλεγχο επιμολύνσεων. Μέγεθος PCR προϊόντων: 232 ζεύγη βάσεων.	75
Εικόνα 3.	Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για τον πολυμορφισμό rs8044820 του <i>MAP1LC3B</i> σε πήκτωμα αγαρόζης 3% σύστασης. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας (M) γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους 100 bp (Nippon Genetics). S1-S14: Δείγματα ασθενών με καρκίνο προστάτη, NTC: Non template control, μάρτυρας για έλεγχο επιμολύνσεων. Μέγεθος PCR προϊόντων: 379 ζεύγη βάσεων.	76
Εικόνα 4.	Χρωματογράφημα αλληλούχησης για τον πολυμορφισμό rs8044820 του <i>MAP1LC3B</i> γονιδίου, στη θέση που επισημαίνεται με κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η θέση που εδράζεται ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός. Το δείγμα που απεικονίζεται φέρει το παραλλαγμένο αλληλόμορφο A σε	

ομοζυγωτία, όπως απεικονίζεται η κορυφή με πράσινο χρώμα (διάβασμα της αλληλουχίας με τον πρόσθιο εκκινητή). 79

Εικόνα 5. Χρωματογράφημα αλληλούχησης για τον πολυμορφισμό rs8044820 του MAP1LC3B γονιδίου, στη θέση που επισημαίνεται με κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η θέση του πολυμορφισμού. Το δείγμα εδώ φέρει το παραλλαγμένο αλληλόμορφο A σε ετεροζυγωτία. Απεικονίζονται στην ίδια θέση δύο κορυφές που αντιστοιχούν στο αλληλόμορφο A (παραλλαγμένο, πράσινο χρώμα) και στο αλληλόμορφο G (αναφοράς, μαύρο χρώμα) (διάβασμα της αλληλουχίας με τον πρόσθιο εκκινητή). 79

Εικόνα 6. Χρωματογράφημα αλληλούχησης για τον πολυμορφισμό rs78835907 του ATG16L1 γονιδίου, στη θέση που επισημαίνεται με κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η θέση που εδράζεται ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός. Το δείγμα που απεικονίζεται φέρει σε ομοζυγωτία το αλληλόμορφο C (αναφοράς, μπλε χρώμα) (διάβασμα της αλληλουχίας με τον ανάστροφο εκκινητή). 80

Εικόνα 7. Χρωματογράφημα αλληλούχησης για τον πολυμορφισμό rs78835907 του ATG16L1 γονιδίου, στη θέση που επισημαίνεται με κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η θέση που εδράζεται ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός (διπλή κορυφή). Το δείγμα που απεικονίζεται φέρει σε ετεροζυγωτία το αλληλόμορφο (C). (αναφοράς, μπλε χρώμα) και το αλληλόμορφο T (παραλλαγμένο, κόκκινο χρώμα) (διάβασμα της αλληλουχίας με τον ανάστροφο εκκινητή). 80

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs8044820G>A του γονιδίου MAP1LC3B στις ομάδες των ασθενών και στα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου). 85

Διάγραμμα 2. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs78835907G>A του γονιδίου ATG16L1 στις ομάδες των ασθενών και στα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου). 86

Διάγραμμα 3. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs8044820G>A του γονιδίου MAP1LC3B στα άτομα με φυσιολογικό και μεταλλαγμένο PIK3CA γονίδιο. 90

Διάγραμμα 4. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs78835907G>A του γονιδίου ATG16L1 στα άτομα με φυσιολογικό και μεταλλαγμένο PIK3CA γονίδιο.....	90
---	----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ταξινόμηση του καρκίνου του προστάτη κατά TNM (AJCC, 2018).	47
Πίνακας 2. Ο ρόλος της αυτοφαγίας και ο διπλός μηχανισμός δράσης στον καρκίνο του προστάτη. [Ανασκόπηση [128]]	61
Πίνακας 3. Αλληλουχίες εκκινήτων (EurofinsGenomics) για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων ATG16L1 και MAP1LC3B που περιλαμβάνουν τους πολυμορφισμούς rs78835907 και rs8044820, αντίστοιχα.	73
Πίνακας 4. Ποσότητες των αντιδραστηρίων της PCR αντίδρασης ανά δείγμα για κάθε πολυμορφισμό.	73
Πίνακας 5. Συνθήκες διεξαγωγής PCR αντίδρασης για τους πολυμορφισμούς ATG16L1- rs78835907 και MAP1LC3B- rs8044820 στον θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf.....	74
Πίνακας 6. Τα κλινικά δεδομένα των ασθενών που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο PIK3CA.	84
Πίνακας 7. Τα κλινικά δεδομένα των ασθενών σε συνάρτηση με τον πολυμορφισμό rs8044820 του MAP1LC3B γονιδίου.	87
Πίνακας 8. Τα κλινικά δεδομένα των ασθενών σε συνάρτηση με τον πολυμορφισμό rs78835907 του ATG16L1 γονιδίου.	88
Πίνακας 9. Κλινικά δεδομένα ασθενών που έφεραν μεταλλάξεις στο PIK3CA γονίδιο και είχαν σε ετεροζυγωτία στους πολυμορφισμούς rs8044820 και rs78835907.....	92

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Προστάτης Αδένας

A.1 Ανατομία – Ιστολογία

Ο προστάτης αδένας απαντά αποκλειστικά στα άρρενα άτομα και εντοπίζεται στην ελάσσονα πύελο. Έχει σχήμα και μέγεθος σαν κάστανο και μαζί με το πέος, τις σπερματοδόχες κύστεις και τους όρχεις συγκροτεί το αναπαραγωγικό σύστημα του άρρενος. Είναι ένα αδενομυώδες όργανο με πολλά αδένια κατανεμημένα συγκεντρικά, οι πόροι των οποίων εκβάλλουν στην προστατική μοίρα της ουρήθρας. Εξωτερικά περιβάλλεται από μια λεπτή, ινώδη κάψα που δομείται από πυκνό, ακανόνιστο κολλαγόνο συνδετικό ιστό, είναι πλούσια σε αγγεία και περιέχει διάσπαρτες λείες μυϊκές ίνες. Αναπτύσσεται κατά την εφηβεία και μεγαλώνει σε όλη τη διάρκεια της ζωής του άρρενος ατόμου. Στα νεαρής ηλικίας άρρενα άτομα το βάρος του είναι περίπου 15-20 γραμμάρια, ενώ σε περιπτώσεις υπερτροφίας μπορεί να φτάσει και τα 100-200 γραμμάρια. Η ονομασία του πηγάζει από τη θέση που εντοπίζεται (*προϊσταται*, βρίσκεται δηλαδή μπροστά και κάτω από την ουροδόχο κύστη), καθώς βρίσκεται μπροστά από το ορθό και πίσω από την ηβική σύμφυση.

Ο προστάτης αδένας αποτελεί άθροισμα 30 έως 50 επιμέρους συνθέτων σωληνοκυψελοειδών αδένων, τα οποία διατάσσονται συγκεντρικά σε τρεις διακριτές στιβάδες: βλεννογόνια, υποβλεννογόνια και κύρια. Κάθε επιμέρους αδένας διαθέτει εκφορητικό πόρο, μέσω του οποίου το εκκριτικό προϊόν του διοχετεύεται στην προστατική ουρήθρα. Οι αδένες που απαντούν στην βλεννογόνια στιβάδα είναι κοντά στην ουρήθρα και είναι οι πιο βραχείς. Οι υποβλεννογόνιοι αδένες είναι πιο περιφερικά και έχουν μεγαλύτερο μήκος. Οι περισσότεροι και μεγαλύτεροι σε μήκος αδένες βρίσκονται περιφερικά και αποτελούν την κυρίως μάζα του προστάτη [1].

Ο προστάτης αδένας σχηματίζεται από τον δεξιό και τον αριστερό λοβό, οι οποίοι διαχωρίζονται μέσω μίας αύλακας κατά μήκος της οπίσθιας επιφάνειας του αδένα και από τον ισθμό ή μέσο λοβό. Διακρίνεται σε τέσσερις ζώνες και πέντε λοβούς, σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (National Cancer Institute, NCI): ο πρόσθιος λοβός εντοπίζεται μπροστά από την ουρήθρα και δεν περιέχει αδένες, σε αντίθεση με τον μέσο λοβό που έχει σφηνοειδές-κωνικό

σχήμα, περιέχει πολλούς αδένες και βρίσκεται μεταξύ της ουρήθρας και των εκσπερματικών πόρων. Οι πλευρικοί λοβοί (δεξιά και αριστερά) περιέχουν επίσης πολλούς αδένες και σχηματίζουν την κύρια μάζα του αδένα. Απαντούν εκατέρωθεν της ουρήθρας και διαχωρίζονται με μία κάθετη αύλακα της οπίσθιας επιφάνειας του προστάτη. Ο οπίσθιος λοβός βρίσκεται πίσω από την ουρήθρα, περιέχει αδένες και μπορεί να ψηλαφηθεί μέσω του ορθού, κατά τη διάρκεια της δακτυλικής εξέτασης του προστάτη (DRE), η οποία αποτελεί την κύρια κλινική εξέταση για τη διάγνωση κακοήθειας για τουλάχιστον 15 έτη, χωρίς τη σύγχρονη ανάπτυξη και χρήση της πολυπαραμετρικής MRI του προστάτη [2].

A.2 Παθοφυσιολογία του προστάτη αδένα

Στον προστάτη αδένα απαντούν τρία είδη κυττάρων: τα βασικά, τα εκκριτικά και τα νευροενδοκρινή [3]. Ο προστάτης αδένας παράγει και εκκρίνει ένα γαλακτώδες, πυκνό, ελαφρώς αλκαλικό υγρό το οποίο αποτελεί το 20-30% του σπέρματος, το οποίο περιέχει όξινη φωσφατάση, πρωτεολυτικά ένζυμα, λιπίδια, ινωδολυσίνη και κιτρικό οξύ. Το προστατικό έκκριμα μαζί με τα σπερματοζωάρια που παράγονται από τους όρχεις και το υγρό των σπερματοδόχων κύστεων συνιστούν το σπέρμα.

Η φυσιολογική λειτουργία του είναι να συμβάλλει στον εμπλουτισμό του σπέρματος με τα απαραίτητα συστατικά, στη σωστή λειτουργία της εκσπερμάτισης και στον έλεγχο της ούρησης. Επιπρόσθετα, στον προστάτη αδένα παράγεται και η πρωτεΐνη που ονομάζεται ειδικό προστατικό αντιγόνο (Prostate Specific Antigen - PSA) και μετατρέπει το σπέρμα σε υγρό.

Ο διαχωρισμός του προστάτη σε ζώνες κατά τον John McNeal το 1984 μας βοήθησε να καταλάβουμε καλύτερα την παθοφυσιολογία του αδένα. Κατά τον McNeal, στο εσωτερικό του προστάτη αδένα υπάρχουν τρεις κύριες ανατομικά και ιστολογικά διακριτές περιοχές, οι οποίες περιλαμβάνουν ένα ινομυώδες στρώμα (απουσία αδένων) που περιβάλλει το όργανο και δύο αδενικές περιοχές που αποτελούν την περιφερική και την κεντρική ζώνη. Σύμφωνα με τον McNeal υπάρχει και μία τρίτη, μικρότερη περιοχή, η οποία περιβάλλει την προστατική ουρήθρα και καλείται μεταβατική [4].

Η περιφερική ζώνη ανατανακλά τα τμήματα του αδένου που βρίσκονται πίσω ή πλάγια. Συνιστά το 70-75% του αδενικού τμήματος του προστάτη και περιέχει αδένες που εκβάλλουν στην προστατική ουρήθρα από το σπερματικό λοφίδιο ως την κορυφή του αδένου. Στη ζώνη αυτή αναπτύσσεται έως και το 80% των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη, αλλά και της χρόνιας προστατίτιδας. Στην περιφερική ζώνη βρίσκεται επίσης ο προ-προστατικός σφιγκτήρας που αποτελεί το 5% της συνολικής μάζας του προστάτη. Πρόκειται για ένα κυλινδρικό περίβλημα από λείες μυϊκές ίνες, το οποίο εκτείνεται από τη βάση της ουροδόχου κύστης έως το σπερματικό λοφίδιο. Στην περιφερική ζώνη το συνδετικό υπόστρωμα είναι πιο χαλαρό, το σύστημα των πόρων απλούστερο και οι σακκοειδείς σχηματισμοί με τα διαφράγματα λιγότερο αναπτυγμένοι, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ζώνες κατά McNeal.

Η κεντρική ζώνη συνιστά το 25% περίπου του αδενικού τμήματος του προστάτη, έχει σφηνοειδές σχήμα και τα αδενία της εκβάλλουν πλάγια στην ουρήθρα, προς τη βάση του προστάτη. Στην ζώνη αυτή οι εκσπερματικοί πόροι είναι πιο συμπαγείς συγκριτικά με την περιφερική ζώνη. Στην κεντρική ζώνη δημιουργούνται συχνά φλεγμονές και αναπτύσσεται περίπου το 10% - 15% των κακοηθών νεοπλασιών.

Η μεταβατική ζώνη καταλαμβάνει περίπου το 5-10% του αδενικού τμήματος του προστάτη, σχηματίζεται από τους δύο πλάγιους λοβούς του προστάτη, βρίσκεται πιο κεντρικά από το σπερματικό λοφίδιο, εκατέρωθεν της ουρήθρας και εκτείνεται μέχρι τον σφιγκτήρα. Η μεταβατική ζώνη και οι περιουρηθρικοί αδένες αποτελούν κύρια εστία ανάπτυξης του προστατικού αδενώματος. Η ιστολογική διάκριση μεταξύ των ζωνών του προστάτη σε περίπτωση καρκίνου του προστάτη δεν είναι εύκολη καθώς τα ανατομικά τους όρια χάνονται.

A.3 Ενδοκρινολογία του προστάτη αδένου

Τα ανδρογόνα είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη και τις λειτουργικές δραστηριότητες του προστάτη αδένου. Το βασικό ανδρογόνο στα άρρενα άτομα είναι η τεστοστερόνη (Τ), η οποία παράγεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% στους όρχεις, ενώ το υπόλοιπο 5% περίπου προέρχεται από τα επινεφρίδια [5]. Και στα δύο όργανα, η συνθετική οδός η οποία οδηγεί στην παραγωγή ανδροστενδιόνης και Τ, είναι η κυρίαρχη οδός, ενώ η οδός που οδηγεί στη σύνθεση της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA) και της

ανδροστενοδιόλης αποτελεί δευτερεύουσα οδό. Το μεγαλύτερο μέρος της DHEA απενεργοποιείται, ενώ ένα μικρό κλάσμα μετατρέπεται σε ανδροστενοδιόνη και στη συνέχεια σε Τ (τεστοστερόνη), στους περιφερειακούς ιστούς και στον προστάτη. Η στεροειδογένεση που γίνεται στους όρχεις από τα κύτταρα Leydig, ρυθμίζεται κυρίως από την ωχρινοτρόπο ορμόνη LH, ενώ η παραγωγή ανδρογόνων στα επινεφρίδια ελέγχεται από τη φλοιοπινεφριοδιωτρόπο ορμόνη ACTH. Στους υγιείς άνδρες, τα ανδρογόνα που παράγονται στα επινεφρίδια συμβάλλουν ελάχιστα στη λειτουργία του προστάτη, ωστόσο μετά από ορχεκτομή ή μετά από θεραπεία με GnRH ανάλογα, αυτή η πηγή ανδρογόνων μπορεί να γίνει καίρια στην ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη [5].

Η Τ3 συνδέεται στην κυκλοφορία με πρωτεΐνες ορού, κυρίως με τη σφαιρίνη δέσμευσης ορμονών φύλου (SHBG), την αλβουμίνη και τη σφαιρίνη δέσμευσης κορτικοστεροειδών. Μικρό ποσοστό, της τάξης του 2-3% της Τ3 παραμένει σε ελεύθερη μορφή [6]. Η SHBG έχει την υψηλότερη συγγένεια για την Τ3 και έχει σημαντικό αντίκτυπο στη ρύθμιση της ποσότητας της ελεύθερης Τ3, που είναι διαθέσιμη στους ιστούς-στόχους. Σε όργανα όπως ο προστάτης, η Τ3 μετατρέπεται στο ισχυρότερο από τα ένζυμα 5-αναγωγάσες ανδρογόνο, την 5-διυδροτεστοστερόνη (DHT). Έχουν αναφερθεί δύο 5α-αναγωγάσες, εκ των οποίων η αναγωγή τύπου I απαντά στους περισσότερους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, ενώ η αναγωγή τύπου II είναι το κυρίαρχο ισοένζυμο στους ιστούς των γεννητικών οργάνων, συμπεριλαμβανομένου και του προστάτη [6–8]. Πρόσφατες μελέτες, ωστόσο, έχουν αναφέρει την έκφραση της 5-α αναγωγάσης τύπου I και στα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη. Όταν η φιναστερίδη, ένας ειδικός αναστολέας της 5-α αναγωγάσης τύπου II, χορηγήθηκε σε άνδρες για τη θεραπεία της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη (ΚΥΠ), η DHT ορού κατεστάλη κατά 70% και η DHT του προστάτη κατά 85-90%. Η εναπομέναν στον προστάτη DHT προκύπτει πιθανώς από τη δράση του ισοενζύμου τύπου I. Δύο μεγάλες διεθνείς πολυκεντρικές μελέτες απέδειξαν την ασφαλή και αποτελεσματική χρήση της φιναστερίδης στη θεραπεία της ΚΥΠ. Η ενδοκυττάρια DHT μεταβολίζεται ταχέως σε 3α, 17β - ανδροστενδιόλη (3-διόλη), η οποία μπορεί να μετατραπεί ξανά σε 3α [6].

Η πολύπλοκη ανατομία του προστάτη σε συνδυασμό με τη σύνθετη παθοφυσιολογία του καθιστούν αναγκαία τη συστηματική μελέτη και κατανόηση

κάθε ζώνης του αδένα. Η περιφερική ζώνη, στην οποία εκδηλώνεται το ποσοστό καρκίνων και φλεγμονών, αποτελεί πεδίο έρευνας για τη διάγνωση και τη θεραπεία [7]. Η κεντρική και η μεταβατική ζώνη παρουσιάζουν διαφορετικές προκλήσεις, που συνδέονται με τη δομή και λειτουργία τους. Αυτά τα ευρήματα έχουν οδηγήσει σε στοχευμένες μεθόδους θεραπείας, συνυφασμένες με τα χαρακτηριστικά της κάθε ζώνης.

Οι νευροδιαβιβαστικές ουσίες, που προέρχονται από περιοχές έξω από τον υποθάλαμο, ρυθμίζουν την απελευθέρωση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH). Η τελευταία διεγείρει την έκκριση των ορμονών της υπόφυσης και συγκεκριμένα της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης FSH και της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH [8,9]. Η LH διεγείρει τα κύτταρα Leydig των όρχεων για την παραγωγή τεστοστερόνης, η οποία στη συνέχεια δρα στα κύτταρα Sertoli. Η αλληλεπίδραση όλων αυτών των ορμονών, από τον υποθάλαμο μέχρι την παραγωγή ανδρογόνων, ελέγχεται από ένα κύκλωμα αρνητικής ανάδρασης (negative feedback control loop). Καθημερινά παράγονται 3-10 ng τεστοστερόνης, ενώ η φυσιολογική συγκέντρωση στο πλάσμα είναι αισθητά μικρότερη και υπολογίζεται στα 0,3- 0,2 ng/ml αίματος. Η DHT είναι υπεύθυνη για την διαφοροποίηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του άρρενος φύλου [3]. Ο ανδρογονικός υποδοχέας (Androgen Receptor, AR) έχει μεγαλύτερη ειδικότητα για την διϋδροτεστοστερόνη συγκριτικά με την τεστοστερόνη [3]. Σε μεγαλύτερης ηλικίας άρρενα άτομα, κυρίως μετά τη μέση ηλικία, η ανάπτυξη αδενώματος είναι συχνή, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει απόφραξη της ουρήθρας, δυσκολία στην ούρηση και ενδεχόμενη κατακράτηση ούρων (καλοήθης υπερπλασία του προστάτη - BHP), σε συνδυασμό με δυσουρικές ενοχλήσεις(LUTS).

B. Καρκίνος του προστάτη

B.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος του προστάτη κυριαρχεί στον δυτικό κόσμο, αποτελεί παγκοσμίως τη δεύτερη συχνότερη κακοήθεια στα άρρενα άτομα, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα και είναι πέμπτος σε συχνότητα όσον αφορά τη θνησιμότητα. Το 2020 νόσησαν παγκοσμίως 1,4 εκατομμύρια άτομα, αριθμός που αντιστοιχεί στο 15,14% του συνόλου των καρκίνων στους άρρενες τη

χρονιά αυτή, διπλασιάζοντας το ποσοστό του καρκίνου προστάτη που είχε καταγραφεί 2 χρόνια νωρίτερα (το 2018 το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 7,4%) [12,13]. Το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης και συγκεκριμένα το 70% των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη απαντά στις αναπτυγμένες χώρες σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Έρευνας του Καρκίνου Διεθνούς Χρηματοδότησης (World Cancer Research Fund International). Η πλειοψηφία των περιπτώσεων με καρκίνο του προστάτη (98%) εμφανίζεται σε άτομα άνω των 50 ετών, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η εμφάνιση σε νεότερης ηλικίας άτομα με εμφανώς πιο επιθετική συμπεριφορά. Τα ποσοστά επιπολασμού είναι χαμηλότερα στους Αφρικανούς, αλλά οι θάνατοι από το νόσημα σημαντικά αυξημένοι, γεγονός που αποδίδεται κυρίως στις διαφορές των συστημάτων υγείας μεταξύ του Δυτικού και του αναπτυσσόμενου κόσμου. Σε ορισμένους ασθενείς η νόσος παρουσιάζει επιθετική συμπεριφορά, εξελίσσεται και δίνει μεταστάσεις, ενώ σε άλλους ασθενείς η νόσος εμφανίζει πιο ήπια συμπεριφορά και μικρή πιθανότητα μετάστασης [10].

Σύμφωνα με το GLOBOCAN το 2018 προκλήθηκαν 358.989 θάνατοι και εκτιμάται ότι μέχρι το 2040 θα υπάρχουν 2.293.818 νέα περιστατικά με μικρή διακύμανση της θνησιμότητας τους. Είναι εμφανές ότι τόσο η επίπτωση όσο και η θνησιμότητα από τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου συνδέονται άμεσα με την ηλικία, καθώς μεγαλύτερη επίπτωση (60%) παρουσιάζεται στα άρρενα άτομα άνω των 65 ετών. Το 1992 ξεκίνησαν οι μετρήσεις του PSA, γεγονός που συνέβαλε στη μείωση των ποσοστών θανάτου από καρκίνο του προστάτη [15]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ο καρκίνος του προστάτη είναι ο δεύτερος συχνότερος καρκίνος, που αντιπροσωπεύει το 17,4% και το 2022 καταγράφηκαν 255.782 νέες περιπτώσεις. Σύμφωνα με μελέτες η φυλή φαίνεται να παίζει ρόλο στην εκδήλωση του εν λόγω καρκίνου, καθώς οι Αφροαμερικανοί τείνουν να έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη και είναι πιθανότερο να αναπτύξουν καρκίνο του προστάτη πιο νωρίς στη ζωή τους σε σύγκριση με άλλες φυλετικές ομάδες [11]. Ανάλογα δεδομένα υπάρχουν για τα άρρενα άτομα στην Καραϊβική, καθώς επίσης για τους άρρενες που ανήκουν στη μαύρη φυλή και κατοικούν στην Ευρώπη, γεγονός που υποδεικνύει την εμπλοκή ενός κοινού γενετικού υποβάθρου. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη σε Αφροαμερικανούς ήταν 40 φορές υψηλότερα από εκείνα των ανδρών στην

Αφρική, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία της νόσου [12]. Ο καρκίνος του προστάτη είναι λιγότερο συχνός σε άνδρες Ασιατικής και Ισπανικής καταγωγής σε σύγκριση με τους λευκούς [14]. Στην Ευρώπη, τα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι ο καρκίνος του προστάτη, είναι ο πρώτος σε συχνότητα καρκίνος για το 2022, σε ποσοστό της τάξης του 20%. Το ίδιο έτος (2022) στην Ελλάδα καταλαμβάνει επίσης την πρώτη θέση στα άρρενα άτομα με ποσοστό της τάξης του 17,6% και 7.036 νέες περιπτώσεις.

B.2 Διάγνωση

Ο καρκίνος του προστάτη στην πλειοψηφία των περιπτώσεων έχει αργή ανάπτυξη. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για την εξέλιξη και την έκβαση η έγκαιρη διάγνωσή του, ώστε να επιτευχθεί εάν είναι δυνατόν και ίαση. Τα άρρενα άτομα θα πρέπει στην ηλικία των 50 ετών και άνω να ελεγχθούν μέσω μέτρησης του ειδικού προστατικού αντιγόνου PSA στον ορό του αίματος, δακτυλικής εξέτασης DRE και διορθικού υπερηχογραφήματος του προστάτη (transrectal ultrasound TRUS), ώστε να ελέγξουν το μέγεθος, τη συνοχή και τα όρια του προστάτη αδένα. Εάν το αποτέλεσμα είναι θετικό, ακολουθεί επιβεβαίωση μέσω βιοψίας και ιστολογικής εξέτασης [13,14]. Πλέον πριν την ιατρική απόφαση χειρισμού γίνεται διαγνωστικά μαγνητική τομογραφία (MRI), CT scan και Bone scan, εξετάσεις οι οποίες επιτρέπουν τη σταδιοποίηση της νόσου, την εκτίμηση της τοπικής εξάπλωσης και τη λήψη θεραπευτικής απόφασης, καθώς επίσης και έλεγχο μεταστάσεων, θεραπευτική και συμπτωματική αντιμετώπιση [21,22].

Μεγάλος αριθμός ασθενών με καρκίνο του προστάτη ενδέχεται να είναι ασυμπτωματικοί, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η διάγνωση και αντίστοιχα η θεραπεία. Επομένως, τακτικοί ιατρικοί έλεγχοι, όπως οι εξετάσεις PSA και οι εξετάσεις προστάτη, είναι απαραίτητοι καθώς αυξάνεται η ηλικία [13]. Τα πιο συνηθισμένα συμπτώματα σε άνδρες με καρκίνο του προστάτη είναι τα συμπτώματα του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος (LUTS). Τα LUTS μπορούν να χωριστούν σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες: α) συσσώρευση (συχνότητα, επιτακτικότητα, νυκτουρία, κ.λπ.), β) ούρηση (κακή ροή, ακτίνα ούρησης, στάξιμο, κ.λπ.) και γ) μετά την ούρηση (ατελής κένωση). Η συχνότητα των διαταραχών αυτών αυξάνεται με την ηλικία, και σχετίζεται κυρίως με

εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη, ενώ η συσχέτισή της σε προχωρημένες μορφές της νόσου δεν έχει ακόμη εντοπιστεί [23,24]. Οι ασθενείς με LUTS θα μπορούσαν να έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη σε πρώιμο στάδιο, με καλύτερα αποτελέσματα θεραπείας για τους ασθενείς που διαγιγνώσκονται με τη νόσο από συμπτώματα κατώτερου ουροποιητικού. Δεν υπάρχει κανένα σύμπτωμα που να σχετίζεται αποκλειστικά με τη νόσο. Όλα σχεδόν τα συμπτώματα εκδηλώνονται και στους ασθενείς που πάσχουν από διόγκωση του προστάτη λόγω καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη (ΚΥΠ) ή προστατίτιδας, δηλαδή φλεγμονής του προστάτη [15].

B.2.1 Διαγνωστικές εξετάσεις

B.2.1.1 DRE- Δακτυλική εξέταση

Μέσω της δακτυλικής εξέτασης από το ορθό ο γιατρός μπορεί να ψηλαφήσει και να διαπιστώσει τυχόν σκληρές περιοχές ή ανωμαλίες στο μέγεθος και το σχήμα του προστάτη, που προκλήθηκαν ενδεχομένως από κάποια καρκινωματώδη αλλοίωση. Η εξέταση DRE δεν δύναται να αναγνωρίσει όγκους μικρού μεγέθους, ούτε να διαφοροποιήσει έναν καλοήγη από έναν κακοήγη όγκο. Σε περίπτωση που επιβεβαιωθεί ο καρκίνος του προστάτη, η εξέταση αυτή μπορεί να δείξει εάν ο όγκος είναι μονόπλευρα ή αμφοτερόπλευρα και εάν τυχόν έχει επεκταθεί. Ωστόσο σήμερα, η εξέταση εκλογής και πριν το ριζικό χειρισμό είναι η πολυπαραμετρική MRI του προστάτη [22].

B.2.1.2 Ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA)

Το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) παράγεται από φυσιολογικά κύτταρα του προστάτη [26]. Πρόκειται για μία γλυκοπρωτεΐνη, οι υψηλές τιμές της οποίας υποδεικνύουν την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη. Ωστόσο η συγκεκριμένη εξέταση δεν είναι ειδική καθώς υψηλές τιμές PSA απαντούν και σε περιπτώσεις καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη ή άλλες παθολογικές και μη καταστάσεις και αντιστρόφως. Αυξημένα επίπεδα PSA (> 4 ng/mL) στις αιματολογικές εξετάσεις αποτελούν πιθανό βιοδείκτη. Η εξέταση PSA, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Εταιρία Κλινικής Ογκολογίας (ESMO), είναι

ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του προστάτη σε νεαρή ηλικία (άνω των 40 ετών). Οι περισσότεροι υγιείς άντρες έχουν επίπεδα PSA <4 ng/mL στο αίμα. Ωστόσο, λόγω χαμηλής ευαισθησίας του συγκεκριμένου δείκτη τα χαμηλά επίπεδα PSA (κάτω από 4mg/mL), δεν αποτελούν ένδειξη αποκλεισμού καρκίνου του προστάτη. Το εύρος τιμών των επιπέδων του PSA σύμφωνα με το American Cancer Society (ASCO) είναι 4-10ng/mL. Σε περίπτωση που οι τιμές PSA είναι μεγαλύτερες από 10 ng/mL, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα (πάνω από 50%) το άτομο να εμφανίσει καρκίνο του προστάτη. Όπως προαναφέρθηκε, η ειδικότητα της συγκεκριμένης εξέτασης είναι χαμηλή και η διάγνωση του καρκίνου του προστάτη τίθεται μόνο μετά από βιοψία, καθώς αυξημένα επίπεδα PSA απαντούν και σε καλοήθεις καταστάσεις του ουροποιογεννητικού. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά τους κινδύνους που απορρέουν λόγω της χαμηλής ειδικότητας του συγκεκριμένου δείκτη χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα στα πλαίσια του προσυμπτωματικού ελέγχου [27].

B.2.1.3 Διορθικό ή Διαπρωκτικό υπερηχογράφημα του προστάτη (transrectal ultrasound TRUS)

Το διορθικό υπερηχογράφημα του προστάτη αποτελεί μία τεχνική απεικόνισης των ανατομικών στοιχείων του προστάτη αδένα. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του μεγέθους και του σχήματος του προστάτη. Το TRUS δεν ανιχνεύει τον όγκο, αλλά κατευθύνει τη στόχευση για βιοψία σε παθολογικά απεικονιζόμενες με τον υπέρηχο περιοχές και μπορεί να διαγνώσει την ύπαρξη ή μη καρκίνου του προστάτη [20].

B.2.1.4 Βιοψία προστάτη

Η διάγνωση καρκίνου του προστάτη επιβεβαιώνεται μόνο μέσω βιοψίας και μικροσκοπικής εκτίμησης ιστικού δείγματος του προστάτη (συστηματική βιοψία 12 πυρήνων. Η διαδικασία της βιοψίας περιλαμβάνει τη συλλογή 12 ιστοτεμαχίων με τη βοήθεια διορθικού υπερήχου. Τα ιστοτεμαχίδια εκτιμώνται μικροσκοπικά και αποδίδεται μία κύρια και μία δευτερεύουσα βαθμολογία Gleason, κυμαινόμενες από το 1 έως το 5, βάσει του πιο κοινού και του υψηλότερου ιστολογικού προτύπου αντίστοιχα. Αυτές οι βαθμολογίες

βασίζονται στην εμφάνιση των κυττάρων. Ο συνδυασμός αυτών των βαθμολογιών παράγει μια συνολική βαθμολογία από 2 έως 10, η οποία επιτρέπει τον χαρακτηρισμό επικινδυνότητας της νόσου. Συγκεκριμένα, βαθμολογίες Gleason έως και 6 υποδεικνύουν χαμηλό έως πολύ χαμηλό κίνδυνο, αναλόγως εάν ο όγκος είναι σταδίου T1c ή T1-T2b. Ο ενδιάμεσος κίνδυνος προκύπτει από βαθμολογία Gleason 7 σε όγκους σταδίου T2b-T2c, ενώ οι ομάδες υψηλού έως πολύ υψηλού κινδύνου έχουν βαθμολογία Gleason 8-10, αλλά διαφοροποιούνται ως προς το στάδιο του όγκου, με τους πρώτους να έχουν στάδιο T3a και τους δεύτερους στάδιο T3b-T4 [29].

Η βαθμολογία Gleason και το PSA, αποτελούν τα κύρια στοιχεία για την πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη. Άλλωστε και η βιοψία που αποτελεί κύρια διαγνωστική μέθοδος επί σειρά ετών, ενδέχεται να παρουσιάζει ανακρίβειες ως προς την ταξινόμηση του καρκίνου [30]. Για τον λόγο αυτό είναι αναγκαίες νέες διαγνωστικές προσπελάσεις.

B.2.1.5 Βιοψία με στόχευση μαγνητικής τομογραφίας (MRI targeted Biopsy)

Το πρόβλημα που διαπιστώθηκε στη συστηματική βιοψία είναι ότι λαμβάνει δείγματα από τον ιστό του προστάτη συστηματικά, χωρίς να υπάρχει τρόπος στόχευσης για συγκεκριμένες θέσεις καρκινικού ιστού στον ασθενή, κάτι που μπορεί να θεωρηθεί ως μειονέκτημα αυτής της μεθόδου βιοψίας [16,17]. Οι βιοψίες με τη χρήση μαγνητικής τομογραφίας βοηθούν στην επιλεκτική και στοχευμένη ύποπτων περιοχών, χρησιμοποιώντας μαγνητική καθοδήγηση (MRI). Αρχικά, ο ασθενής απεικονίζεται μέσω αυτής της τεχνικής και οι εικόνες ερμηνεύονται από έναν ακτινολόγο, ο οποίος θα εντοπίσει τις βλάβες που θα στοχεύσουν για συλλογή δειγμάτων κατά τη διάρκεια της βιοψίας [18]. Οι Ahdoor et al. [19] διεξήγαγαν συγκριτική μελέτη μεταξύ κλασικών συστηματικών βιοψιών και βιοψιών καθοδηγούμενων από μαγνητική τομογραφία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι καθοδηγούμενες βιοψίες υπερτερούσαν έναντι των απλών, συστηματικών βιοψιών, καθώς είχαν σημαντικά χαμηλότερες διαγνώσεις καρκίνων βαθμού 1 και σημαντικά υψηλότερες διαγνώσεις σε καρκίνους βαθμού 3-5. Επιπρόσθετα, έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα

αναφορικά με τη διάγνωση πιο επιθετικών σταδίων καρκίνου σε άνδρες που υποβλήθηκαν σε ριζική προστατεκτομή.

B.2.1.6 Υγρή Βιοψία

Οι δύο προηγούμενοι τύποι βιοψιών αποτελούν επεμβατικές τεχνικές στις οποίες πολλοί άνδρες αρνούνται να υποβληθούν. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει στραφεί στην αναζήτηση όσο το δυνατόν λιγότερο επεμβατικών μεθόδων που θα επιτρέψουν την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου. Μία τέτοια μέθοδος είναι η υγρή βιοψία που στοχεύει σε εξωκυτάρια κυστίδια που απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα στην κυκλοφορία [18]. Οι υγρές βιοψίες λύνουν το πρόβλημα της επεμβατικότητας των δύο προηγούμενων διαγνωστικών προσεγγίσεων και μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση αλλαγών στον όγκο σε πραγματικό χρόνο χάρη στην κυκλοφορία των βιοδεικτών μέσα στα σωματικά υγρά [18]. Εκτός από τη χρήση εξωκυττάρων κυστιδίων, άλλοι βιοδείκτες όπως το ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA (cell free circulating tumor DNA, cfctDNA) ή τα ελεύθερα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells, CTCs) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες υγρής βιοψίας στη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη [20,21]. Τα εξωκυτάρια κυστίδια φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενα και να υπερτερούν έναντι των υπολοίπων κυκλοφορούντων βιοδεικτών, αρκεί να αναπτυχθούν εξαιρετικά ευαίσθητες και ειδικές τεχνικές για τον εντοπισμό και την απομόνωσή τους [37].

B.3 Παράγοντες κινδύνου

Ο καρκίνος του προστάτη είναι πολυπαραγοντική νόσος. Τα ακριβή αίτια που σχετίζονται με τη νόσο, αν και έχουν αποτελέσει αντικείμενο μακροχρόνιας έρευνας παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστα συγκριτικά με άλλους τύπους καρκίνου. Θεωρητικά, ένας εν δυνάμει παράγοντας κινδύνου αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ενός συγκεκριμένου τύπου καρκίνου, αλλά η παρουσία ενός ή περισσοτέρων παραγόντων κινδύνου δεν οδηγεί πάντοτε στην ανάπτυξη καρκίνου. Σε ορισμένες περιπτώσεις άτομα με έναν ή περισσότερους παράγοντες κινδύνου δεν θα αναπτύξουν ποτέ καρκίνο, ενώ υπάρχουν

ασθενείς που νοσούν έχοντας ελάχιστους έως κανέναν από τους γνωστούς έως σήμερα παράγοντες κινδύνου [8,22]. Στους κύριους παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη συγκαταλέγονται η ηλικία (η πλειοψηφία των ανδρών σε μεγάλη ηλικία θα νοσήσουν από καρκίνο προστάτη), η εθνικότητα, ορισμένοι γενετικοί παράγοντες και το οικογενειακό ιστορικό. Επιπρόσθετα, υπάρχει πλήθος δευτερευόντων παραγόντων που συνδέονται κύρια με τον τρόπο ζωής [23].

B.3.1 Ηλικία

Ο παράγοντας κινδύνου που σχετίζεται περισσότερο με αυτή τη μορφή καρκίνου είναι η γήρανση. Όπως προαναφέρθηκε, η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη σε έναν άνδρα αυξάνεται δραματικά με την ηλικία, με τους άνδρες κάτω των 50 ετών να έχουν ποσοστό εμφάνισης μικρότερο από 1 ανά 100.000, ενώ προσεγγίζει το 100 μεταξύ 51 και 60 ετών και αυξάνεται ακόμη περισσότερο και αγγίζει το 500 ανά 100.000 σε άνδρες άνω των 60 ετών [9,24]. Σύμφωνα με το NCI (National Cancer Institute) οι άνδρες της λευκής φυλής χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του προστάτη έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μετά την ηλικία των 50 χρόνων, ενώ οι άνδρες της μαύρης φυλής ή όσοι έχουν οικογενειακό ιστορικό μπορεί να εμφανίσουν καρκίνο σχετικά νωρίς, από την ηλικία των 40 ετών. Όπως συμβαίνει με όλους τους καρκίνους, η ηλικία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου.

Η ανάπτυξη του καρκίνου είναι μια πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική διαδικασία κι ενδέχεται να περάσουν αρκετά έτη έως ότου εξελιχθεί πλήρως [25]. Καθώς μεγαλώνουμε, το ίδιο συμβαίνει και με τα κύτταρά μας, τα οποία γίνονται πιο ευάλωτα σε βλάβες από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν σε υψηλό αριθμό μεταλλάξεων [25,26]. Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός, αν και φαίνεται να οφείλεται στη γήρανση των κυττάρων και σε επακόλουθες αλλαγές στο DNA τους [22]. Η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου είναι τα 70 έτη, αν και θεωρείται ότι άνω των 80 ετών, οι 8 στους 10 άνδρες έχουν έστω και μικρές νεοπλασματικές εστίες στον προστάτη τους. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη αναπτύσσονται εξαιρετικά αργά, ενδέχεται να μην

εκδηλωθούν ποτέ τα συμπτώματα της νόσου, ή κάποιος να αποβιώσει από άλλο αίτιο πριν διαγνωσθεί ο καρκίνος του.

B.3.2 Εθνικότητα και φυλετικές διαφοροποιήσεις

Ο επιπολασμός του καρκίνου του προστάτη παρουσιάζει ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών φυλετικών ομάδων. Ως επιπολασμός (National Institute of Mental Health) ορίζεται το ποσοστό ενός πληθυσμού που φέρει ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό σε μία δεδομένη χρονική περίοδο. Το υψηλότερο ποσοστό επίπτωσης σημειώνεται στους Αφροαμερικανούς και σε μικρότερη ηλικία συγκριτικά με τις υπόλοιπες φυλετικές ομάδες. Τα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι ο καρκίνος του προστάτη, απαντά συχνότερα σε περιοχές όπως η Βόρεια Αμερική, η Βορειοδυτική Ευρώπη και η Αυστραλία, ενώ στην Κεντρική και Νότια Αμερική, την Αφρική και την Ασία τα ποσοστά εμφάνισης είναι μικρότερα [12]. Η εθνικότητα επηρεάζει κι αυτή, σε μικρότερο βέβαια βαθμό, την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη και οι Αφρικανοί άνδρες διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο. Οι άνδρες της μαύρης φυλής παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου προστάτη έναντι των ανδρών της λευκής φυλής, ακόμη και στις αναπτυγμένες χώρες. Σε αυτό μπορεί να συμβάλουν λόγοι όπως βιολογικοί παράγοντες αλλά και κοινωνικο-οικονομικές συνθήκες (χαμηλότερης ποιότητας υγειονομική περίθαλψη και μειωμένη πρόσβαση σε διαγνωστικό έλεγχο δείκτη PSA) [27].

Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι τα μικρότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη που καταγράφονται σε περιοχές όπως η Αφρική και η Σαχάρα μπορεί να οφείλονται σε περιορισμένο προσυμπτωματικό έλεγχο, άγνοια του κινδύνου ή και έλλειψη υγειονομικής περίθαλψης [28,29]. Δύο μελέτες, που έλαβαν χώρα ανεξάρτητα η μία από την άλλη, εντόπισαν μία περιοχή στο χρωμόσωμα 8q24 που συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του προστάτη, κυρίως στους Αφρικανούς άνδρες [30,31]. Ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) στο γονίδιο CYP17 (rs743572) έχει καταγραφεί ότι συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του προστάτη στους Αφρικανούς άνδρες [32]. Παράλληλα, μία μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο εκτίμησε στα πλαίσια της πρωτοβάθμιας περίθαλψης περισσότερους από 700.000 άνδρες και κατέγραψε τα επίπεδα

PSA μεταξύ ανδρών διαφορετικών εθνικοτήτων [33]. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη οι Αφρικανοί άνδρες έτειναν να έχουν υψηλότερα επίπεδα PSA από οποιαδήποτε άλλη εθνικότητα, ειδικά σε ηλικίες άνω των 60 ετών. Η ίδια μελέτη ανέδειξε υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη κατά το έτος που ακολούθησε στους Αφροικανούς έναντι των υπολοίπων εθνικοτήτων. Αντιθέτως οι Ασιάτες είχαν τα χαμηλότερα επίπεδα PSA και τα λιγότερα διαγνωσμένα περιστατικά συγκριτικά με τις υπόλοιπες εθνικότητες.

Άλλες μελέτες καταδεικνύουν ότι οι Αφροαμερικανοί παρουσιάζουν ψηλό ποσοστό παραλλαγών σε γονίδια όπως το *BCL2*, που ρυθμίζει την απόπτωση των κυττάρων, καθώς και σε γονίδια όπως το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *EphB2* [34,35]. Οι Koga et. al [36] μελέτησαν τις γενετικές αλλαγές που καταγράφονται στους Αφρικανούς και φαίνεται να σχετίζονται με την ανάπτυξη του εν λόγω καρκίνου και έδειξαν υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *ZFH3*, διαγραφές στο γονίδιο *ETV3* και ενισχύσεις στο γονίδιο *MYC*, αλλά σημειώνονται λιγότερο συχνές μεταλλάξεις στα γονίδια *PTEN* και *TPR22*. Γονίδια όπως τα *PALB2*, *BRCA2* και *ATM* παρουσιάζουν υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων επίσης σε Αφρικανούς άνδρες [52,53].

B.3.3 Διατροφή-Παχυσαρκία

Τα διατροφικά πρότυπα μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα κινδύνου ενός ατόμου σχετικά με τον καρκίνο του προστάτη. Οι Shin et al. [37] συνέκριναν πρόσφατα τρία διαφορετικά διατροφικά πρότυπα: Παραδοσιακό, Δυτικό και Συνετό. Η παραδοσιακή διατροφή βασίζεται στην ιαπωνική κουλτούρα και περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες κοτόπουλου, θαλασσινών, τουρσιών και σάκε. Αντίθετα, η συνετή διατροφή αποτελείται από λαχανικά, ψάρια, φρούτα και όσπρια, ενώ η Δυτική διατροφή εστιάζει στο κόκκινο κρέας και τα λιπαρά. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι τα άτομα που ακολουθούν το Δυτικό διατροφικό πρότυπο εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ασθενειών, ενώ μια συνετή διατροφή μειώνει τον κίνδυνο νόσησης. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν προκύψει και από άλλες μελέτες, γεγονός που υποδεικνύει ότι η Δυτικού τύπου διατροφή με τροφές υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά αυξάνει το κίνδυνο για καρκίνο του προστάτη [38–40].

Οι Richman et al. [41] κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η πρόσληψη χολίνης συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο επιθετικού καρκίνου του προστάτη. Οι κρόκοι των αυγών έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε χολίνη, γεγονός που υποδηλώνει ότι μία διατροφή πλούσια σε αυγά ενδέχεται να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο υψηλού ρίσκου καρκίνου του προστάτη. Άλλες τροφές που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για αυτή την ασθένεια είναι τα επεξεργασμένα κόκκινα κρέατα [42], τα γαλακτοκομικά προϊόντα [43] και τα κορεσμένα λιπαρά [44]. Αντιθέτως, τροφές όπως τα ψάρια [45], η σόγια [46], τα λαχανικά, τα όσπρια όπως οι φακές [47] και τα ροφήματα, όπως το τσάι και ο καφές, έχουν συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο καρκίνου του προστάτη [48,49].

Η παχυσαρκία συνδέεται κατά κανόνα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νόσων. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα άτομα με παχυσαρκία παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης προχωρημένου καρκίνου του προστάτη και χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με τα μη παχύσαρκα άτομα [53]. Πρόσφατα, οι Vidal et al. [54] εκτίμησαν το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας σε άνδρες με παχυσαρκία έναντι ανδρών με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος. Η συγκεκριμένη μελέτη εξερεύνησε επίσης εάν η έκβαση της νόσου διέφερε μεταξύ παχύσαρκων ανδρών στις διαφορετικές φυλές. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός παραγόντων κινδύνου, όπως η εθνικότητα και η παχυσαρκία, δεν αύξησε τον κίνδυνο θνησιμότητας από καρκίνο. Ωστόσο, ένα άτομο με υψηλό δείκτη μάζας σώματος (BMI) διατρέχει μεγαλύτερο κίνδυνο καρκίνου του προστάτη σε σύγκριση με ένα άτομο με χαμηλό BMI [55,56]. Επιπλέον, η μειωμένη σωματική δραστηριότητα αυξάνει επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου [57].

B.3.4 Αγγειεκτομές [Vasectomy]

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τις αγγειεκτομές και την πιθανή τους σχέση με την ανάπτυξη καρκίνου. Μία μελέτη από τη Δανία έδειξε ότι οι άνδρες που υποβλήθηκαν σε αγγειεκτομή είχαν 15% περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο έναντι εκείνων που δεν υποβλήθηκαν σε αγγειεκτομή [50]. Οι Xu et al. [51] στα πλαίσια μίας μεταανάλυσης 58 εργασιών ταξινόμησαν, αξιολόγησαν και προσπάθησαν να προσδιορίσουν εάν υπήρχε σύνδεση μεταξύ των αγγειεκτομών και του αυξημένου κινδύνου καρκίνου.

Σύμφωνα με την εν λόγω μεταανάλυση υπάρχει δυνητικά 6-12% μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης όλων των σταδίων καρκίνου σε άνδρες που υποβλήθηκαν σε αγγειεκτομή έναντι εκείνων που δεν υποβλήθηκαν, χωρίς, ωστόσο, να μεταβάλλεται το ποσοστό θνησιμότητας στις δύο ομάδες. Επομένως, οι αγγειεκτομές φαίνεται ότι συνδέονται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη, αλλά δεν συσχετίζονται με την ανάπτυξη επιθετικότερων μορφών καρκίνου.

B.3.5 Κάπνισμα

Το κάπνισμα αποτελεί κύριο παράγοντα κινδύνου για τους περισσότερους καρκίνους και η έκθεση στον καπνό, παθητική ή ενεργητική, θεωρείται καρκινογόνος. Ωστόσο, δεν έχει επιβεβαιωθεί ότι σχετίζεται συγκεκριμένα με την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη [52,53]. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι οι άνδρες καπνιστές έχουν υψηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης και μειωμένα επίπεδα οιστραδιόλης, η οποία υπό κανονικές συνθήκες θα μπορούσε να ρυθμίσει τα ορμονικά επίπεδα. Επομένως, με βάση το γεγονός αυτό μπορεί να συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη [37].

Επιπρόσθετα, ο καπνός περιέχει πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH), οι οποίοι είναι καρκινογόνες χημικές ουσίες η έκθεση σε αυτούς μπορεί να οδηγήσει σε υπερδιέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [54]. Η έκθεση σε αυτές τις χημικές ουσίες ενδέχεται να παίζει σημαντικό ρόλο στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη, καθώς οι PAH μπορούν να δράσουν ως αγωνιστές στον ανδρογονικό υποδοχέα.

B.3.6 Φλεγμονές του προστάτη

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες καταδεικνύουν ότι η προστατίτιδα, ένα είδος φλεγμονής του προστάτη, μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, καθώς η χρόνια φλεγμονή συνδέεται με παράγοντες, όπως είναι τα διάφορα προφλεγμονώδη προϊόντα, οι ιντερλευκίνες και οι χημειοκίνες. Η φλεγμονή προκαλεί γενετικές βλάβες και κυτταρικές αλλοιώσεις μέσω του οξειδωτικού μηχανισμού, καθώς και υψηλή πυκνότητα λευκοκυττάρων [55]. Σύμφωνα με προϋπάρχουσες μελέτες σε ορισμένες

περιπτώσεις ασθενών με επιθετικές μορφές καρκίνου του προστάτη και μεταστάσεις καταγράφηκε αυξημένη πυκνότητα λευκοκυττάρων [56]. Η χρόνια φλεγμονή του προστάτη γνωρίζουμε σήμερα ότι συνδέεται με ΡΙΑ (πολλαπλασιαστική φλεγμονώδη ατροφία) και μπορεί να εξελιχθεί σε ΡΙΝ (προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία) [57].

B.3.7 Οικογενειακό ιστορικό

Ο καρκίνος του προστάτη είναι σε μεγάλο ποσοστό κληρονομικός, περίπου το 57% των περιπτώσεων που παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες. Ένα ποσοστό της τάξης του 20% περίπου των ασθενών έχουν οικογενειακό ιστορικό, γεγονός που υποδεικνύει την συμβολή κοινών γονιδίων και όμοιων περιβαλλοντικών συνθηκών. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου διπλασιάζεται αν υπάρχει συγγενής πρώτου βαθμού με ιστορικό καρκίνου του προστάτη. Έχει παρατηρηθεί επίσης προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη, όταν στην οικογένεια έχουν ήδη νοσήσει από τη συγκεκριμένη νόσο ο πατέρας ή τα αδέρφια.

B.4 Γενετική του καρκίνου του προστάτη

Οι γενετικοί παράγοντες που σχετίζονται συχνά με τον καρκίνο του προστάτη ενδέχεται έχουν κληρονομικό χαρακτήρα και μπορεί να είναι απαλειφές, υποκαταστάσεις ή μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης. Μέχρι στιγμής, αρκετά γονίδια, τα οποία περιλαμβάνουν γονίδια επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών βάσεων, όπως το *post-meiotic segregation increased 2 (PMS2)*, το *MutS homolog 2 (MSH2)* και το *MutL protein homolog 1 (MLH1)*, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του ομόλογου ανασυνδυασμού, όπως το *partner and localiser of BRCA2 (PALB2)*, το *ataxia-telangiectasia mutated (ATM)* και τα γονίδια 1 και 2 του καρκίνου του μαστού (*BRCA1/2*) συνδέονται με κληρονομικές μορφές καρκίνου του προστάτη [58]. Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών βάσεων αποτελεί έναν ιδιαίτερα σημαντικό μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών του DNA [59]. Άτομα που φέρουν μεταλλάξεις της βλαστικής σειράς στα εν λόγω γονίδια παρουσιάζουν κατά 2-4% υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη έναντι των ατόμων που δε φέρουν μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα

γονίδια (wild-type) [60]. Όσον αφορά τα γονίδια *BRCA1/2*, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, άνδρες ηλικίας άνω των 65 ετών, που φέρουν κληρονομήσιμες μεταλλάξεις στα *BRCA* γονίδια, έχουν 4-8 φορές υψηλότερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του προστάτη [61,62].

Το *PALB2* είναι ένα γονίδιο που δρα ως συνδέτης μεταξύ των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2*, οδηγώντας στον σχηματισμό του συμπλέγματος *BRCA* [63]. Αν και σπάνιες, οι μεταλλάξεις βλαστικής σειράς στο εν λόγω γονίδιο συνδέονται κατά 0,6% με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου [64,65].

Το γονίδιο *ATM*, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 11, συμμετέχει επίσης στον μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών του DNA [66]. Τα άτομα που φέρουν σε ομοζυγωτία μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας για το γονίδιο *ATM*, έχουν το σύνδρομο αταξίας-τελαγγειεκτασίας [58]. Ωστόσο, σε φορείς μεταλλάξεων στο εν λόγω γονίδιο η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη αυξάνεται κατά 6% περίπου [67,68].

Στον κληρονομικό καρκίνο του προστάτη, μεταλλάξεις στα *NKX3.1*, *Myc* και *PTEN* γονίδια απαντούν σε υψηλή συχνότητα στον καρκίνο του προστάτη [7,69–71]. Το γονίδιο *NKX3.1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που καταστέλλει τον όγκο του προστάτη, καθιστώντας το έναν εξαιρετικό βιοδείκτη για την διερεύνηση ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη [69]. Εάν η έκφραση αυτού του γονιδίου χαθεί, αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη σύνθεση ή απουσία της αντίστοιχης ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης και τελικά σε ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη. Η απώλεια έκφρασης ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα μεθυλίωσης του υποκινητή, διαγραφών αλληλόμορφων ή μετα-μεταγραφικής σίγασης [72,73].

Η οικογένεια των γονιδίων *Myc* περιλαμβάνει τα γονίδια, *N-Myc*, *L-Myc* και *C-Myc* [74]. Το *C-Myc* κωδικοποιεί μία ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία, όταν υπερεκφράζεται, μπορεί να οδηγήσει στην έναρξη και εξέλιξη διαφόρων τύπων καρκίνου [75]. Η υπερέκφραση του γονιδίου *C-Myc* μπορεί να οφείλεται σε ενίσχυση ή μεταθέσεις του γονιδίου [75]. Επομένως, η έκφραση του γονιδίου *C-Myc* μπορεί να αποτελέσει έναν εξαιρετικό βιοδείκτη για την εξέλιξη και τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη.

Τέλος, οι διαγραφές του γονιδίου *PTEN*, ενδέχεται να οδηγήσουν στην απώλεια της λειτουργικότητάς του. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί το ομόλογο της φωσφατάσης και της τενσίνης (*PTEN*) [76]. Όταν χάνεται η συγκεκριμένη

ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη διαταράσσεται η σηματοδοτική οδός PI3K-AKT-mTOR, η οποία συνδέεται συχνά με προχωρημένα στάδια καρκίνου του προστάτη και κακή πρόγνωση [77]. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει η δυνατότητα για εξατομικευμένα θεραπευτικά πρωτόκολλα, που περιλαμβάνουν την αναστολή της οδού PI3K-AKT-mTOR, γεγονός που δείχνει δυνατότητες για τη θεραπεία του καρκίνου [77].

B.4.1 Οικογένειες γονιδίων σχετιζόμενες με καρκινογένεση προστάτη

Οι οικογένειες ETS (Erythroblast Transformation Specific) και MYC είναι εξέχουσες οικογένειες γονιδίων και εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη. Η οικογένεια ETS περιλαμβάνει μεταγραφικούς παράγοντες που προκύπτουν από την κωδικοποίηση 28 γονιδίων [78]. Το κύριο χαρακτηριστικό όλων των μεταγραφικών παραγόντων ETS είναι οι διατηρημένες περιοχές δέσμησης DNA του ETS [79]. Τα μέλη της οικογένειας ETS συμμετέχουν σε πλήθος λειτουργιών, μεταξύ των οποίων η ανάπτυξη κυττάρων του λεμφικού συστήματος, η κυτταρική διαφοροποίηση ή/και ο πολλαπλασιασμός και ο κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) [100]. Ορισμένοι παράγοντες ETS λειτουργούν είτε ως ογκογονίδια είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα μέλη των υποοικογενειών *PEA3* (*ETV5*, *ETV4* και *ETV1*) και *ERG* (*FEV*, *FLI1* και *ERG*) δρουν κυρίως ως ογκογονίδια [79]. Η ογκογόνος δράση των γονιδίων *ERG* και *PEA3* εμφανίζεται νωρίς κατά την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη και σύμφωνα με μελέτες συνδυάζεται με άλλους παράγοντες, όπως η απώλεια του *PTEN* γονιδίου [80,81].

Η οικογένεια των γονιδίων *MYC* (*L-Myc*, *N-Myc* και *C-Myc*) συνδέεται με πολλαπλές διεργασίες σε κυτταρικό επίπεδο, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός, η κυτταρική διαίρεση και ο κυτταρικός θάνατος [82]. Στον καρκίνο του προστάτη, μεγαλύτερη συμμετοχή έχει το γονίδιο *C-Myc*, το οποίο εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 8q24 και η έκφρασή του επάγεται από μιτογόνα σήματα. Στα καρκινικά κύτταρα, το συγκεκριμένο γονίδιο υπερεκφράζεται ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης του προστάτη αδένου [83,84]. Υπό κανονικές συνθήκες, το *C-Myc* γονίδιο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος εμπλέκεται

στη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας, συμπεριλαμβανομένων της ανάπτυξης, της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [84].

B.4.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Η φυσιολογική λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων [85]. Στα κυριότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια, που εμπλέκονται στον καρκίνο του προστάτη, συγκαταλέγονται τα γονίδια *PTEN*, *RB1* και *TP53*. Βλάβες στα προαναφερόμενα γονίδια οδηγούν σε διαταραχές του κυτταρικού κύκλου [86,87]. Η ανάλυση του μεταστατικού, ανθεκτικού στον ευνουχισμό καρκίνου του προστάτη, αποκάλυψε μία στενή συσχέτιση μεταξύ των ανθεκτικών καρκίνων του προστάτη και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων επισημαίνοντας τον σημαντικό τους ρόλο [88].

Το *TP53* κωδικοποιεί την ομώνυμη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες η αδρανοποίηση του γονιδίου αυτού είναι μεγαλύτερη στα τελευταία στάδια της νόσου και ο μεταστατικός, ανθεκτικός στον ευνουχισμό καρκίνος του προστάτη συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με βλάβες σε αυτό [89]. Ωστόσο, επιπρόσθετα στοιχεία κατέδειξαν ότι παραλλαγές του εν λόγω γονιδίου απαντούν επίσης στα πρώιμα στάδια του καρκίνου, αλλά και στον μεταστατικό καρκίνο που δεν έχει υποστεί ευνουχισμό [90,91].

Το *RB1* γονίδιο κωδικοποιεί επίσης την ομώνυμη pRB ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη [92]. Αδρανοποίηση του εν λόγω γονιδίου παρατηρείται συχνά σε έναν ιδιαίτερα σε έναν επιθετικό υποτύπο της νόσου, τον νευροενδοκρινή καρκίνο του προστάτη (NEPC) [93]. Η συνδυασμένη αδρανοποίηση των *RB1* και *TP53* γονιδίων συμβάλλει σημαντική στην ανάπτυξη του NEPC ιστολογικού υποτύπου [94,95]. Παραλλαγές των δύο γονιδίων συναντώνται τόσο στον νευροενδοκρινή υπότυπο (NEPC) όσο και στον ανθεκτικό στον ευνουχισμό καρκίνο του προστάτη. Ωστόσο στον NEPC οι μεταλλάξεις στο *RB1* γονίδιο καταγράφονται σε υψηλότερη συχνότητα έναντι του ευνουχοάντοχου καρκίνου του προστάτη [96].

Ένα άλλο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που συνδέεται με τον καρκίνο του προστάτη είναι το γονίδιο φωσφατάσης και τενσίνης *PTEN*. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του *PTEN* γονιδίου επιδρούν συχνά στην

σηματοδοτική οδό της φωσφοϊνοσιτόλης 3-κινάσης (PI3K) [81]. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN δρα στον μεταβολισμό του λιπιδίου PIP3 σε PIP2 [97]. Η PTEN πρωτεΐνη ανταγωνίζεται τα ένζυμα PI3K κατηγορίας I, τα οποία χρησιμεύουν για τη μετατροπή της PIP2 σε PIP3, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης κινάσης σερίνης/θρεονίνης RAC-α (AKT) και σε έναν καταρράκτη σηματοδότησης και ενεργοποίησης της ραπαμυκίνης (mTOR) [97]. Η παρουσία μεταλλάξεων που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του *PTEN* γονιδίου, εμποδίζει την μετατροπή της PIP3 σε PIP2, και τροποποίηση της οδού AKT-mTOR, με επιπτώσεις σε κύριες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση [98].

B.4.3 Γονίδια που σχετίζονται με τη σηματοδότηση του ανδρογονικού υποδοχέα (AR)

Ο ανδρογονικός υποδοχέας (AR) εντοπίζεται σε ποικίλους ιστούς, όπου και παραμένει εντός του κυτταροπλάσματος, συνδεδεμένος με πρωτεΐνες θερμικού σοκ όταν δεν συνδέεται με ένα μόριο ανδρογόνου [99]. Στους άνδρες, η σύνδεση των ανδρογόνων με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους καθορίζει τη σεξουαλική ανάπτυξη του ατόμου [99,100]. Στον προστάτη αδένα, ο AR υποδοχέας εκφράζεται τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα όσο και στα κύτταρα του στρώματος [101]. Στα καρκινικά κύτταρα η οδός σηματοδότησης του AR διαταράσσεται οδηγώντας σε υπερέκφραση του AR, χωρίς ωστόσο να έχει διαλευκανθεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης [101].

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη εξαρτάται από την τεστοστερόνη, η οποία μετατρέπεται σε διϋδροτεστοστερόνη (DHT) με τη δράση του ενζύμου 5-άλφα-αναγωγάση (ή 5α-ρεδουκτάση), που απομακρύνει έναν διπλό δεσμό από το μόριο τεστοστερόνης, σχηματίζοντας την DHT [102]. Η DHT συνδέεται με έναν AR υποδοχέα και η σύνδεση αυτή οδηγεί στην εσωτερίκευση του συμπλόκου DHT-AR και μεταφορά του στον πυρήνα, όπου δρα σε γονίδια στόχους και επηρεάζει τον ρυθμό μεταγραφής τους διεγείροντας τελικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [103]. Η ισχυρή συσχέτιση αυτού του καρκίνου με την AR

σηματοδότηση, έχει συμβάλλει στην ανάπτυξη θεραπειών στέρησης ανδρογόνων (ADT) για περιορισμό ανάπτυξης της νόσου. Ωστόσο, συχνά αναπτύσσεται αντίσταση στις εν λόγω θεραπείες με αποτέλεσμα την υποτροπή και εξέλιξη της νόσου. Τρεις κύριοι μηχανισμοί οδηγούν σε αντοχή στις ADT: α) η επανενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης AR, παρά τα ελάχιστα επίπεδα ανδρογόνων, μέσω υπερέκφρασης της πρωτεΐνης AR ή ενίσχυσης του αντίστοιχου γονιδίου, β) ο μηχανισμός παράκαμψης που επιτρέπει στις οδούς που εξαρτώνται από την AR σηματοδότηση να ενεργοποιούνται ανεξάρτητα και γ) η αποδιαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη σε κύτταρα NEPC, γεγονός που αλλάζει τη φυσική πορεία της νόσου. Η αντίσταση στις ADT θεραπείες οδηγεί σε υποτροπή και εξέλιξη της νόσου, με παράλληλη ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων, όπως λυτικές οστικές μεταστάσεις και κατάγματα ή συμπίεση του μυελού οστών και νευρολογική σημειολογία, που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα ζωής των ασθενών [110,115,116,117].

B.4.4 Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί DNA

Η πρωτεΐνη BRCA2 συμμετέχει στον μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού, που χρησιμοποιεί ως πρότυπο την αδελφή χρωματίδα για να επιδιορθώσει βλάβες στο DNA [104,105]. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του συγκεκριμένου γονιδίου επηρεάζουν τον μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού και κατ' επέκταση την επιδιόρθωση του DNA, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλάξεων που συνηγορούν υπέρ της καρκινογένεσης [104]. Εκτός από την BRCA2 πρωτεΐνη στον μηχανισμό επιδιόρθωσης μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού εμπλέκονται και άλλες πρωτεΐνες, όπως οι ATM και ATR, οι οποίες αναγνωρίζουν τα κατεστραμμένα τμήματα DNA και ενεργοποιούν την BRCA1, η οποία συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα που θα προκαλέσει την εκτομή των κατεστραμμένων τμημάτων DNA. Η RAD51, με τη βοήθεια των PALB2 και BRCA2 πρωτεϊνών, προσδένεται στην αλυσίδα του DNA, η οποία αλληλεπιδρά με την ομόλογη αλυσίδα στην αδελφή χρωματίδα, δίνοντας το έναυσμα για την επιδιόρθωση του DNA [106]. Η ελαττωματική δράση της BRCA2 πρωτεΐνης οδηγεί σε διαταραχή του μηχανισμού επιδιόρθωσης βλαβών του DNA μέσω

του ομόλογου ανασυνδυασμού, γεγονός που καθιστά το γονίδιο BRCA2 ως ένα πολλά υποσχόμενο βιοδείκτη για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών.

Το γονίδιο *CDK12* κωδικοποιεί την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση (CDK) 12, η οποία συνδέεται με την κυκλίνη K και δημιουργεί ένα σύμπλεγμα για τη ρύθμιση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA [107]. Τα κύτταρα που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDK12* έχουν μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα συγκριτικά με τα υγιή κύτταρα [108]. Σύμφωνα με μελέτες όγκοι με αδρανοποίηση του *CDK12* γονιδίου είναι πιο ευαίσθητοι στη θεραπεία μέσω χημειοθεραπευτικών παραγόντων όπως η σισπλατίνη, η καμπτοθεκίνη, η μιτομυκίνη C ή η ετοποσίδη [107,109].

Το γονίδιο *CHEK2* κωδικοποιεί την κινάση ελέγχου 2 (CHK2), η οποία είναι απαραίτητη για τις οδούς ATM-CHEK2-P53 [110,111]. Όταν το DNA υποστεί βλάβη, η πρωτεΐνη CHK2 φωσφορυλιώνεται από την ATM, γεγονός που οδηγεί στον διμερισμό της. Μέσω επακόλουθων φωσφορυλιώσεων της CHK2, προκαλούνται αλλαγές στη διαμόρφωση με αποτέλεσμα τα διμερή να διασπώνται σε ενεργά μονομερή [112]. Η ενεργός πρωτεΐνη CHK2 σχετίζεται με την επιδιόρθωση του DNA μέσω φωσφορυλίωσης των BRCA1 και 2, προκαλώντας ομόλογο ανασυνδυασμό θραυσμάτων δίκλωνου DNA [112,113].

Ένας άλλος μηχανισμός, μέσω του οποίου η πρωτεΐνη CHK2 εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA είναι η επιδιόρθωση με εκτομή βάσης. Οι κατεστραμμένες βάσεις του DNA ανακτώνται, μέσω ενεργοποίησης της FoxM1 (πρωτεΐνη ForkheadBox M1) από τη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη CHK2 και ενεργοποιείται η μεταγραφή της XRCC1, ενός παράγοντα επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης [114]. Οι Ta et al. [115] έδειξαν ότι η απώλεια λειτουργίας της CHK2 πρωτεΐνης σχετίζεται αρνητικά με τη δραστικότητα του υποδοχέα ανδρογόνων, με αποτέλεσμα τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτό δείχνει τον ρόλο που διαδραματίζει η CHK2 στη ρύθμιση του υποδοχέα ανδρογόνων και συνδέει την επιδιόρθωση βλαβών του DNA με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη μέσω της σηματοδοτικής οδού του ανδρογονικού υποδοχέα.

B.5 Ιστοπαθολογία του όγκου

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων με καρκίνο του προστάτη χαρακτηρίζονται ιστολογικά ως αδενοκαρκινώματα (>95%), σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI) των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής, καθώς προέρχονται από το αδενικό στοιχείο του προστάτη αδένα και εμφανίζουν χαρακτηριστική μορφολογία. Το υπόλοιπο 5% των περιπτώσεων ταξινομούνται ως καρκινώματα του πόρου (ductal type). Ο καρκίνος του προστάτη εμφανίζεται συχνότερα στην περιφερική ζώνη (περισσότερο από 70%). Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται αρχικά γύρω από τον προστάτη και στη συνέχεια μπορεί να εξαπλωθούν στους λεμφαδένες και στα οστά. Οι περισσότεροι καρκίνοι ξεκινούν από κυψελιδικά κύτταρα και οι αντίστοιχοι όγκοι χαρακτηρίζονται ως κυψελιδικά αδενοκαρκινώματα (acinar adenocarcinomas). Ορισμένοι αναπτύσσονται αργά και εξαπλώνονται δύσκολα, ενώ άλλοι μπορεί να έχουν αντίθετη συμπεριφορά. Ο κακοήθης μετασχηματισμός του προστάτη αδένα αρχίζει ως ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του προστάτη (Prostatic Intraepithelial Neoplasia, PIN), εξελίσσεται σε εντοπισμένο όγκο και καταλήγει σε διηθητικό αδενοκαρκίνωμα, το οποίο ενδέχεται να δώσει και μεταστάσεις.

Η PIN αποτελεί μια πρόδρομη κατάσταση και παρουσιάζει διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η υπερπλασία του κυλινδρικού επιθηλίου, η μείωση των βασικών κυττάρων, η διόγκωση των πυρήνων και των πυρηνίσκων, η κυτταροπλασματική υπερχρωμασία και η πυρηνική ατυπία. Στην PIN τα βασικά κύτταρα μειώνονται σε αριθμό, ενώ στον καρκίνο του προστάτη απουσιάζουν παντελώς. Σε γενικές γραμμές η PIN ταξινομείται σε τρεις βαθμούς: ήπια (PIN1), μέτρια (PIN2) και σοβαρή (PIN3). Η υψηλού βαθμού PIN (high-grade HGPIN) πληροί όλες σχεδόν τις προϋποθέσεις μιας προ-κακοήθους κατάστασης και είναι ευρέως αποδεκτή ως προκαρκινική αλλοίωση. Η μετρίου βαθμού PIN θεωρείται ως προ-καρκινική βλάβη και μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο του προστάτη με πιθανότητα έως και 50%. Στη σοβαρού βαθμού PIN παρατηρείται αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η εν λόγω αλλοίωση συνυπάρχει συχνά με καρκίνο του προστάτη σε ποσοστό 50-85% και ταυτίζεται με το ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα in situ.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) ο καρκίνος του προστάτη κατατάσσεται στους ακόλουθους κύριους ιστολογικούς τύπους:

- α) Νεοπλάσματα του αδενικού επιθηλίου (Glandular neoplasms),
- β) Ουροθηλιακό καρκίνωμα (urothelial carcinoma),
- γ) Πλακώδες νεόπλασμα (squamous neoplasm),
- δ) Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (basal-cell carcinoma)
- ε) Νευροενδοκρινείς όγκοι (neuroendocrine tumors) [143].

- **Νεοπλάσματα του αδενικού επιθηλίου**

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται τα αδenoκαρκινώματα των αδenoκυψελών (acinar adenocarcinomas) τα οποία αποτελούν την πλειοψηφία των αδenoκαρκινωμάτων. Τα εν λόγω αδenoκαρκινώματα αναπτύσσονται στα εξωτερικά αδενικά κύτταρα του προστάτη, είναι συχνά πολυεστιακά και ετερογενή ως προς τη διαφοροποίησή τους. Αποτελούνται από κυβοειδή κύτταρα διατεταγμένα σε κυψέλες και παρουσιάζουν μικρούς και ορισμένες φορές ενδιάμεσους αδένες με διηθητικό πρότυπο ανάπτυξης. Σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζονται αρκετά μεγάλοι αδένες με ανώμαλη ανάπτυξη και κατατάσσονται ως καρκίνος του προστάτη λόγω της απουσίας των βασικών κυττάρων.

Επιπρόσθετα μορφολογικά χαρακτηριστικά αποτελούν η διόγκωση και η υπερχρωμασία των πυρήνων, οι εμφανείς πυρηνίσκοι, το κοκκιώδες κυτταρόπλασμα, και οι ηωσινόφιλες άμορφες εκκρίσεις. Οι μιτώσεις είναι σπάνιες, εκτός εάν συνυπάρχει υψηλού βαθμού κακοηθείας όγκος. Σύμφωνα με τον WHO το 2016, αποσαφηνίστηκαν ως διακριτές οι ακόλουθοι ιστολογικοί υπότυποι: ατροφικό αδenoκαρκίνωμα, ψευδοϋπερπλαστικό, μικροκυστικό, βλεννώδες, αδenoκαρκίνωμα από κύτταρα «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου», αδenoκαρκίνωμα με μικροκενοτοπιώδες κυτταρόπλασμα, πλειόμορφο γιγαντοκύτταρο και σαρκωματοειδές καρκίνωμα. Οι τέσσερις πρώτες παραλλαγές (ατροφικό, ψευδοϋπερπλαστικό, μικροκυστικό, βλεννώδες αδenoκαρκίνωμα) ενδέχεται να μιμούνται τις καλοήθεις διεργασίες στον προστάτη.

- **Ενδοπορικό καρκίνωμα και Αδενοκαρκίνωμα των πόρων**

Το πορογενές αδενοκαρκίνωμα αποτελεί τον δεύτερο συχνότερο τύπο καρκίνου του προστάτη και ανιχνεύεται κυρίως σε ηλικιωμένους άνδρες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, συνυπάρχει με το αδενοκυψελιδικό αδενοκαρκίνωμα και σπάνια απαντά μεμονωμένα (0,2-0,4%). Τα αδενοκαρκινώματα αυτού του τύπου εντοπίζονται συχνά στην περιουρηθρική περιοχή, με κύριο σύμπτωμα την αιματουρία. Το πορογενές αδενοκαρκίνωμα εμφανίζεται ως εξωφυτική, πολυποειδής μάζα προκύπτουσα από το σπερματικό λοφίδιο. Μακροσκοπικά, μοιάζει με αδενοκυψελιδικό αδενοκαρκίνωμα με διογκωμένους πυρήνες, αλλά σχηματίζει συχνά ψευδο-στρωματοποιημένους πυρήνες και ποικίλο κυτταρόπλασμα (σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι διαυγές). Βάσει των μορφολογικών χαρακτηριστικών, το πορογενές αδενοκαρκίνωμα χαρακτηρίζεται με Gleason score 4 και δύναται να δώσει μεταστάσεις σε άλλα όργανα, όπως είναι το πέος, οι όρχεις και οι πνεύμονες.

- **Ουροθηλιακό καρκίνωμα**

Το ουροθηλιακό καρκίνωμα του προστάτη ανήκει στους υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκους και αναπτύσσεται μέσα στους προστατικούς πόρους και στα λοβίδια. Η απουσία του σχετίζεται συνήθως με ένα πρωτοπαθές καρκίνωμα στην ουρήθρα ή στην ουροδόχο κύστη. Τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζουν έντονο πυρηνικό πλειομορφισμό και πολυάριθμες μιτώσεις. Επίσης παρατηρείται νέκρωση τύπου φαγέσωρα (comedo).

- **Πλακώδες νεόπλασμα**

Πρόκειται για εξαιρετικά σπάνια περίπτωση με μέσο όρο ηλικίας τα 68 έτη. Αυτός ο τύπος καρκίνου αναπτύσσεται από επίπεδα κύτταρα που καλύπτουν τον προστάτη αδένα και τείνει να αναπτύσσεται πιο γρήγορα από τα αδενοκαρκινώματα. Το πλακώδες νεόπλασμα μπορεί να είναι πλακώδες καρκίνωμα ή αδενο-πλακώδες καρκίνωμα.

1. Πλακώδες καρκίνωμα

Τα πλακώδη καρκινώματα του προστάτη αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 0,6% των περιπτώσεων. Το 50% περίπου των περιπτώσεων αυτών εμφανίζονται μετά από ADT θεραπεία (ορμονικό ευνουχισμό). Προέρχονται πιθανώς από τους περιουριθρικούς αδένες, τα προστατικά λοβία ή το ενδοθήλιο των βασικών κυττάρων. Μπορούν να δώσουν οστικές μεταστάσεις, κυρίως οστεολυτικές και το μέγεθος των όγκων είναι συνήθως μεγάλο και προσεγγίζει τα 65 χιλιοστά.

2. Αδενο-πλακώδες καρκίνωμα

Εμφανίζεται σπάνια και ορίζεται από την συνύπαρξη υψηλού βαθμού κακοηθείας αδενοκυψελιδικού αδενοκαρκινώματος και πλακώδους καρκινώματος προστάτη.

• Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα

Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του προστάτη είναι εξαιρετικά σπάνιο. Το ιστολογικό πρότυπο ανάπτυξης του βασικοκυτταρικού καρκινώματος περιλαμβάνει αδενωματώδεις σχηματισμούς με κυστική ή ηθμοειδή μορφολογία και μικρές συμπαγείς κοκκιωματώδεις φωλεές. Παρουσιάζει υπερχρωματικούς πυρήνες, αυξημένη πυρηνική προς κυτταροπλασματική αναλογία και αυλούς που περιλαμβάνουν ηωσινόφιλα στοιχεία και δεσμοπλαστικό ή μυξοειδές στρώμα.

• Νευροενδοκρινείς όγκοι

- 1. Το αδενοκαρκίνωμα με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση** ορίζεται ως ένα τυπικό αδενοκυψελιδικό ή πορογενές αδενοκαρκίνωμα, χωρίς ανιχνεύσιμα νευροενδοκρινικά μορφολογικά χαρακτηριστικά.

2. Μικροκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα

Πρόκειται για ένα εξαιρετικά επιθετικό καρκίνωμα με αντοχή στη θεραπεία στερησης ανδρογόνων (ADT). Χαρακτηρίζεται από ελάχιστο κυτταρόπλασμα, υπερχρωματικούς πυρήνες, χωρίς εμφανείς πυρηνίσκους, συχνές μιτώσεις, ευθραυστότητα, πυρηνική ράβδωση και νέκρωση. Σε ένα ποσοστό της τάξης του 50% των περιπτώσεων συνυπάρχει με το αδenoκαρκίνωμα, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις το υπόλοιπο 50% είναι αμιγές.

3. Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα

Αφορά επίσης έναν επιθετικό και εξαιρετικά σπάνιο όγκο, ο οποίος παρουσιάζει ομοιότητες με το μικροκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα. Στην πλειοψηφία των ασθενών προϋπάρχει ένα αδenoκαρκίνωμα με ιστορικό μακροχρόνιας χρήσης ADT. Χαρακτηρίζεται από ευμεγέθη καρκινικά κύτταρα με πολύ κυτταρόπλασμα, τραχύ πυρήνα και εμφανή πυρηνίσκο.

Όταν ο καρκίνος διασπείρεται σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος, τότε αναφερόμαστε σε μεταστατικό καρκίνο του προστάτη, ο οποίος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Σημαντικό ρόλο στη διήθηση και μετάσταση του όγκου έχει η επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τις μεσοκυττάρειες συνδέσεις τους, τροποποιούν τον κυτταροσκελετό τους και αποκτούν μεσεγχυματικό φαινότυπο και υψηλό μεταστατικό δυναμικό [116,117]. Τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη διηθούν τους γειτονικούς ιστούς, βγαίνουν στην κυκλοφορία και μεταναστεύουν στα οστά, προκαλώντας διήθηση του μυελού των οστών [118,119].

B.6 Βαθμός κακοήθειας (Gleason score)

Εφόσον η ιστολογική εξέταση επιβεβαιώσει την ύπαρξη καρκίνου του προστάτη χρειάζεται να καθοριστεί περαιτέρω ο βαθμός επιθετικότητας της

νόσου με βάση την μορφολογική απόκλιση που παρουσιάζουν τα καρκινικά κύτταρα έναντι των φυσιολογικών κυττάρων του προστάτη. Το βασικό εργαλείο αξιολόγησης των ιστολογικών δειγμάτων είναι η βαθμολογία κατά Gleason. Η συγκεκριμένη κλίμακα βαθμονόμησης χ έχει σημαντική προγνωστική αξία και καθοδηγεί τους ειδικούς στην επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής.

Η βαθμολογία Gleason περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Donald Gleason τη δεκαετία του 1960. Το εν λόγω σύστημα χρησιμοποιεί μια βαθμολογική κλίμακα από το 1 έως το 5. Το 1 αντιπροσωπεύει την λιγότερο επιθετική μορφή και τα κύτταρα παρουσιάζουν αρχιτεκτονική ανάλογη με των φυσιολογικών κυττάρων, ενώ η βαθμολογία 5 υποδηλώνει μεγάλη απόκλιση των καρκινικών κυττάρων από το φυσιολογικό πρότυπο ανάπτυξης και απώλεια της αρχιτεκτονικής του προστατικού ιστού. Οι βαθμοί 2, 3 και 4 αντιπροσωπεύουν ενδιάμεσες καταστάσεις.

Οι όγκοι που αναπτύσσονται στον προστάτη αδένα είναι συχνά ετερογενείς και περιέχουν νεοπλασματικά κύτταρα με ποικίλους βαθμούς κακοηθείας, επομένως η βαθμολογία Gleason αθροίζει δύο επιμέρους βαθμούς κακοήθειας για κάθε ασθενή. Το Gleason score κυμαίνεται από 2 έως 10 και η αύξηση υποδηλώνει επιθετικότερο φαινότυπο. Η εκτίμηση περιλαμβάνει μια βαθμολογία για τα κύτταρα που καταλαμβάνουν τη μεγαλύτερη έκταση του όγκου και μία δεύτερη βαθμολογία για τα κύτταρα της αμέσως επόμενης μεγαλύτερης περιοχής. Ένα Gleason score $2+3 = 5$, παραδείγματος χάριν, υποδηλώνει ότι το μεγαλύτερο μέρος του όγκου είναι βαθμού 2 και το δεύτερο μεγαλύτερο τμήμα του όγκου είναι βαθμού 3. Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι ένα Gleason score μικρότερο από 6 υποδηλώνει μικρό βαθμό κακοηθείας και επομένως καλύτερη πρόγνωση και πιθανώς αργή εξέλιξη, ενώ ένα άθροισμα μεγαλύτερο από 7 είναι συνδεδεμένο με χειρότερη πρόγνωση.

Ένας όγκος ο οποίος έχει χαρακτηριστεί ότι έχει Gleason score 7 θεωρείται ενδιάμεσου κινδύνου και η κύρια βαθμολογία του όγκου είναι 3 ή 4. Αξίζει να σημειωθεί ότι όγκοι με κύρια βαθμολογία 3 και δευτερεύουσα 4 έχουν καλύτερη πρόγνωση έναντι εκείνων των όγκων με κύρια βαθμολογία 4 και δευτερεύουσα 3. Επιπρόσθετα, ένα Gleason score μεταξύ 8 και 10 περιγράφει υψηλού βαθμού επιθετικότητας καρκίνους, οι οποίοι εξελίσσονται συνήθως πιο γρήγορα [120].

Η Διεθνής Εταιρεία Ουρολογικής Παθολογίας (ISUP) πρότεινε (2014), ένα νέο σύστημα διαβάθμισης κατά Gleason, το οποίο υιοθετήθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) το 2016. Η σημαντικότερη αλλαγή ήταν η καθιέρωση μιας κλίμακας βαθμών I-IV, σύμφωνα με την οποία ο βαθμός I, αντιστοιχεί σε βαθμολογία κατά Gleason ≤ 6 . Ο βαθμός II, αντιστοιχεί σε Gleason score 7 (3+4) και το καρκίνωμα διατηρεί ορισμένες ομοιότητες με τον φυσιολογικό ιστό, ενώ ορισμένοι αδένες εμφανίζονται μεγαλύτεροι σε μέγεθος με ήπιες αλλοιώσεις. Στον βαθμό III, η βαθμολογία Gleason είναι 7 (4+3), η αρχιτεκτονική του ιστού διατηρείται ακόμη, αλλά παρουσιάζει εμφανείς διαταραχές. Ο βαθμός IV περιλαμβάνει την πιο ετερογενή κατηγορία κυττάρων ως προς την πρόγνωση της νόσου και παρουσιάζει βαθμολογία κατά Gleason 8 (4+4), (3+5), (5+3). Ο βαθμός V αντιστοιχεί σε Gleason score 9 ή 10 (4+5), (5+4), (5+5). Στην κατηγορία αυτή αναγνωρίζονται μόνο διηθητικά κύτταρα, ενώ η αρχιτεκτονική του ιστού δεν διατηρείται. Αυτή η κατάσταση είναι γνωστή ως φαγεσωρική νέκρωση (comedo [121]).

B.7 Σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη κατά TNM (Tumor-Node-Metastasis)

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη γίνεται κατά κύριο λόγο με το σύστημα TNM της AJCC (8η έκδοση, 2018), που εκτιμά το μέγεθος του όγκου (T), την διήθηση των λεμφαδένων (N) και την παρουσία μεταστάσεων (M). Η ταξινόμηση βασίζεται στη δακτυλική εξέταση (DRE), στις ενδείξεις του PSA και στον βαθμό διαφοροποίησης κατά Gleason και είναι αναγκαία για τη διάγνωση, την πρόγνωση και την επιλογή θεραπείας.

- **Στάδιο I** - Ο καρκίνος αναπτύσσεται αργά και περιορίζεται εντός του προστάτη αδένος (N0,M0). Ο όγκος δεν είναι αισθητός, το PSA είναι <10 ng/mL, ενώ η βαθμολογία κατά Gleason είναι ≤ 6 . Ο όγκος περιορίζεται στον ένα λοβό του προστάτη (δεξιά ή αριστερά) ή ακόμη και λιγότερο από αυτό (T2a). Συχνά τέτοιοι όγκοι αποτελούν τυχαίο εύρημα κατά την επέμβαση, η οποία εκτελείται για άλλους λόγους (T1a ή T1b). Τα καρκινικά κύτταρα είναι καλώς διαφοροποιημένα, προσομοιάζουν δηλαδή των φυσιολογικών υγιών κυττάρων.

- **Στάδιο II**– Ο όγκος είναι πιο προχωρημένος από το Στάδιο I, αλλά εξακολουθεί να περιορίζεται εντός του προστάτη αδένος (T1,T2,N0,M0). Τα επίπεδα PSA είναι χαμηλά ή μεσαία. Ο καρκίνος αυτού του σταδίου ενδέχεται να έχει αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αλλά και εξάπλωσης.
 - Στάδιο IIA**- Ο όγκος περιορίζεται στο ήμισυ του ενός λοβού του προστάτη ή και λιγότερο και δεν είναι ψηλαφητός. Τα επίπεδα PSA είναι μέτρια και τα καρκινικά κύτταρα διαφοροποιούνται καλώς. Αυτό το στάδιο περιλαμβάνει επίσης μεγαλύτερους όγκους οι οποίοι έχουν καλή διαφοροποίηση των κυττάρων τους, και περιορίζονται στον προστάτη. Οι περιπτώσεις που το Gleason score είναι 7 και το PSA μικρότερο του 20ng/mL, αλλά και οι περιπτώσεις όπου το Gleason score είναι ≤ 6 και το PSA 10-20ng/mL χαρακτηρίζονται ως T1, N0, M0. Για Gleason score ≤ 7 και PSA <20 ng/mL, τότε έχουμε T2a ή T2b, N0, M0.
 - Στάδιο IIB**: Ο όγκος εξακολουθεί να περιορίζεται στον προστάτη και μπορεί να είναι αρκετά μεγάλος, ώστε να γίνει αισθητός κατά τη διάρκεια του DRE. Τα επίπεδα PSA είναι ενδιάμεσα και ο βαθμός διαφοροποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων είναι T1,T2,N0,M0.
 - Στάδιο IIC**: Ισχύουν τα παραπάνω, με τη διαφορά ότι ο όγκος ενδέχεται να είναι αρκετά μεγάλος, ώστε να γίνει αισθητός κατά τη διάρκεια του DRE. Τα επίπεδα PSA είναι μεσαία και τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μέτρια ή φτωχή διαφοροποίηση.
- **Στάδιο III**: Τα επίπεδα PSA είναι υψηλά, ο όγκος διηθεί εκτός του προστάτη και θεωρείται υψηλού κινδύνου καρκίνος. Όλα αυτά δείχνουν έναν τοπικά προχωρημένο καρκίνο που είναι πιθανό να αναπτυχθεί και να εξαπλωθεί.
 - Στάδιο IIIA**: Εξάπλωση του όγκου στους γύρω ιστούς, πιθανώς υψηλά επίπεδα PSA και μετάσταση στις σπερματοδόχους κύστες (T3, N0,M0).
 - Στάδιο IIIB**: Ο όγκος έχει αυξηθεί και διηθεί τους γύρω ιστούς.
 - Στάδιο IIIC**: Τα καρκινικά κύτταρα διαφοροποιούνται ελάχιστα.
- **Στάδιο IV**: Ο καρκίνος έχει βγει εκτός του προστάτη αδένος.
 - Στάδιο IVA**: Ο όγκος έχει δώσει μεταστάσεις σε έναν ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες (N1).
 - Στάδιο IVB**: Ο όγκος έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένους λεμφαδένες, σε άλλα μέρη του σώματος ή στα οστά (M1).

Πίνακας 1. Ταξινόμηση του καρκίνου του προστάτη κατά TNM (AJCC, 2018).

Prostate cancer TNM prognostic stage groups AJCC UICC 8th edition

When T is...	And N is...	And M is...	And PSA is...	And Grade Group is...	Then the stage group is...
cT1a-c, cT2a	N0	M0	<10	1	I
pT2	N0	M0	<10	1	I
cT1a-c, cT2a, pT2	N0	M0	≥10 <20	1	IIA
cT2b-c	N0	M0	<20	1	IIA
T1-2	N0	M0	<20	2	IIB
T1-2	N0	M0	<20	3	IIC
T1-2	N0	M0	<20	4	IIC
T1-2	N0	M0	≥20	1-4	IIIA
T3-4	N0	M0	Any	1-4	IIIB
Any T	N0	M0	Any	5	IIIC
Any T	N1	M0	Any	Any	IVA
Any T	Any N	M1	Any	Any	IVB

NOTE: When either PSA or Grade Group is not available, grouping should be determined by T category and/or either PSA or Grade Group as available.

TNM: tumor, node, metastasis; AJCC: American Joint Committee on Cancer; UICC: Union for International Cancer Control; PSA: prostate-specific antigen.

Used with permission of the American College of Surgeons, Chicago, Illinois. The original source for this information is the AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition (2017) published by Springer International Publishing. Corrected at 4th printing, 2018.

Πρωτοπαθής Όγκος –T (Tumor)	
Tx	Όγκος που δεν μπορεί να αξιολογηθεί
T0	Μη ανιχνεύσιμος όγκος
T1	Κλινικά μη εμφανής όγκος, ο οποίος δεν μπορεί να ψηλαφηθεί.
T1a	Ο όγκος απαντά σε ποσοστό μικρότερο από το 5% του ιστού που αφαιρέθηκε.
T1b	Ο όγκος βρίσκεται τυχαία, σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 5% του ιστού που αφαιρέθηκε.
T1c	Ο καρκίνος εντοπίζεται με βιοψία διά βελόνης στον έναν ή και στους δύο λοβούς, αλλά δεν ψηλαφείται.
T2	Ο όγκος ψηλαφείται, αλλά παραμένει εντοπισμένος στον προστάτη.
T2a	Ο καρκίνος είναι περιορισμένος στον έναν μόνο λοβό του προστάτη (δεξιό ή αριστερό) και καταλαμβάνει λιγότερο από τον μισό.
T2b	Ο καρκίνος είναι περιορισμένος στον έναν μόνο λοβό του προστάτη (δεξιό ή αριστερό) και καταλαμβάνει περισσότερο από τον μισό.
T2c	Ο όγκος καταλαμβάνει και τους 2 λοβούς

T3	Ο καρκίνος έχει αρχίσει να εξαπλώνεται έξω από τον προστάτη και μπορεί να εξαπλωθεί και στα σπερματικά κυστίδια
T3a	Ο καρκίνος εξαπλώνεται έξω από τον προστάτη, αλλά όχι στα σπερματικά κυστίδια
T3b	Ο όγκος έχει εξαπλωθεί στα σπερματικά κυστίδια
T4	Εξάπλωση σε γειτονικούς ιστούς, όπως ο αυχένας της κύστης, το ορθό, ο έξω σφιγκτήρας και τα τοιχώματα της πυέλου.
Λεμφαδένες-N (Nodes)	
Nx	Επιχώριοι λεμφαδένες δεν δύνανται να αξιολογηθούν
N0	Κανένας θετικός επιχώριος λεμφαδένας.
N1	Μετάσταση σε επιχώριο λεμφαδένα
Απομακρυσμένες μεταστάσεις –M (Metastasis)	
M0	Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
M1	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
M1a	Μακρινή μετάσταση σε μη επιχώριους λεμφαδένες
M1b	Οστικές μεταστάσεις
M1c	Μακρινή μετάσταση σ' άλλα όργανα, παρουσία ή απουσία μετάστασης στα οστά.

B.8 Κλινικά συμπτώματα

Σε πολλές περιπτώσεις η νόσος είναι ασυμπτωματική ή ο ασθενής παρουσιάζει συμπτώματα, όπως είναι η πολυουρία, η επείγουσα ανάγκη για ούρηση, η δυσκολία για ούρηση, η νυκτουρία, συμπτώματα ουρολοίμωξης, μη ομαλή ροή των ούρων, στυτική δυσλειτουργία και αιματουρία. Σπανιότερα έχει καταγραφεί η παρουσία αίματος στο σπέρμα ή η επώδυνη εκσπερμάτιση (ESMO, 2020), καθώς επίσης και εντοπισμένο ή γενικευμένο άλγος όταν ο όγκος έχει δώσει ήδη μεταστάσεις στα οστά. Στα αρχικά στάδια της νόσου τα συμπτώματα είναι σπάνια. Εμφανίζονται συνήθως όταν ο όγκος έχει αυξηθεί σε μέγεθος και πιέζει την ουρήθρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δύσκολη η διαφορορική διάγνωση, καθώς τα συμπτώματα είναι παρόμοια με αυτά της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη ή της προστατίτιδας [13]. Άλλωστε έχει σημειωθεί ένας μεγάλος αριθμός ανδρών με μη διαγνωσμένο καρκίνο του

προστάτη λόγω έλλειψης συμπτωμάτων, εκ των οποίων τα 3/4 αυτών, ηλικίας άνω των 85 ετών, είχαν καρκίνο του προστάτη που δεν είχε διαγνωστεί πριν τον θάνατο τους.

B.9 Θεραπεία

Οι θεραπευτικές επιλογές καθορίζονται με βάση το προσδόκιμο ζωής κάθε ασθενούς, την επιθετικότητα και τον βαθμό κακοηθείας της νόσου. Σε περιπτώσεις ηλικιωμένων ανδρών που δεν παρουσιάζουν συμπτώματα ή σε όσους ο καρκίνος ανιχνεύθηκε τυχαία κατά τη διάρκεια μιας εξέτασης χρειάζεται προσεκτική και συστηματική παρακολούθηση που προϋποθέτει έλεγχο του PSA κάθε έξι μήνες και δακτυλική εξέταση. Εάν υπάρξει υποτροπή ή συμπτώματα παρέχεται θεραπεία για την ανακούφιση των συμπτωμάτων και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενούς (PCF, 2020).

Ασθενείς με καλή κατάσταση υγείας, και εντοπισμένο όγκο εντός του προστάτη μπορούν να υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση. Ο τύπος της χειρουργικής επέμβασης, επιλέγεται ανάλογα με το στάδιο της νόσου, τη γενική υγεία του ασθενούς και άλλους παράγοντες. Η κύρια χειρουργική επέμβαση είναι η ριζική προστατεκτομή, η οποία περιλαμβάνει την αφαίρεση του προστάτη, του περιβάλλοντος ιστού και των σπερματικών κυστιδίων, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να γίνει και αφαίρεση των γειτονικών λεμφαδένων. Η ριζική προστατεκτομή, μπορεί να είναι ανοικτή και πραγματοποιείται συνήθως μέσω μιας τομής στην περιοχή κάτω από την κοιλιακή χώρα. Η επέμβαση δύναται να γίνει και λαπαροσκοπικά. Στην περίπτωση αυτή γίνονται αρκετές μικρές τομές στο τοίχωμα της κοιλιάς, και στη συνέχεια, μέσω μίας τομής εισάγεται το λαπαροσκόπιο, το οποίο καθοδηγεί τον γιατρό, ενώ από τα υπόλοιπα ανοίγματα εισάγονται τα χειρουργικά όργανα για την ολοκλήρωση της επέμβασης.

Τελευταία, έχει αναπτυχθεί η ρομποτική λαπαροσκοπική προστατεκτομή. Πρόκειται για μία λιγότερο επεμβατική χειρουργική τεχνική που παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με την λαπαροσκοπική επέμβαση και έχει το πλεονέκτημα του μικρότερου χρόνου ανάρρωσης μετεγχειρητικά. Παράλληλα, η πυελική λεμφαδενεκτομή γίνεται με σκοπό την αφαίρεση των λεμφαδένων στην περιοχή της λεκάνης. Εναλλακτικά, η διουρηθρική εκτομή του προστάτη (TURP)

πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ρεζεκτοσκοπίου, το οποίο εισάγεται μέσω της ουρήθρας για την αφαίρεση ιστού από τον προστάτη και εξυπηρετεί συνήθως την ανακούφιση των συμπτωμάτων του ασθενούς. Το TURP μπορεί να εφαρμοστεί σε άνδρες με εντοπισμένο όγκο, οι οποίοι δεν μπορούν να υποβληθούν σε ριζική προστατεκτομή. Επιπρόσθετα η ορχεκτομή, διαδικασία μέσω της οποίας αφαιρούνται ο ένας ή και οι δύο όρχεις, αποσκοπεί στη μείωση της ποσότητας των ανδρογόνων που παράγονται. Ωστόσο, σήμερα δεν εφαρμόζεται πλέον ο χειρουργικός ευνουχισμός, καθώς έχει αντικατασταθεί από τα LHRH ανάλογα που χορηγούνται υποδόρια ή από το στόμα.

Η ορμονική θεραπεία δεν αποσκοπεί στη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, αλλά περιορίζει τη δράση των ορμονών εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις μεταστατικού καρκίνου του προστάτη. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα ανδρογόνα ευθύνονται κατά κύριο λόγο για τον καρκίνο του προστάτη, η θεραπεία στέρησης ανδρογόνων (ADT) είναι μια θεραπεία στην οποία χρησιμοποιούνται φάρμακα και άλλες ορμόνες με στόχο τη μείωση των ανδρογόνων και κυρίως της τεστοστερόνης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται αγωνιστές της ορμόνης απελευθέρωσης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHRH), οι οποίοι μπλοκάρουν την παραγωγή της τεστοστερόνης στους όρχεις, σε συνδυασμό με αντιανδρογόνα, που μπλοκάρουν τη δράση των ανδρογόνων. Ενδεικτικά, η οξική αμπιρατερόνη αποτρέπει την παραγωγή ανδρογόνων από τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη και χρησιμοποιείται κυρίως σε περιπτώσεις προχωρημένου καρκίνου του προστάτη, με δράση αναστολής ενζύμου στην παραγωγή τεστοστερόνης και ανήκει στα νεότερα φάρμακα ανδρογονικού αποκλεισμού, τα οποία χορηγούνται ταυτόχρονα με τα LHRH ανάλογα στις πιο προχωρημένες μορφές καρκίνου (μεταστατικός και ευνουχοάντοχος). Η χρήση οιστρογόνων αποφεύγεται λόγω των παρενεργειών που μπορεί να προκαλέσουν.

Η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία είναι επίσης εφαρμόσιμες θεραπείες. Στην χημειοθεραπεία γίνεται χρήση φαρμάκων, ώστε να σταματήσει η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, είτε σκοτώνοντας τα κύτταρα είτε σταματώντας τη διαίρεσή τους. Ένα πρόγραμμα χημειοθεραπειών αποτελείται από έναν αριθμό κύκλων που πραγματοποιούνται σε μία καθορισμένη χρονική περίοδο και μπορεί να βοηθήσει σε περιπτώσεις προχωρημένου ή

ορμονοευαίσθητου μεταστατικού καρκίνου του προστάτη. Η ακτινοθεραπεία εστιάζει στη χρήση ακτινών υψηλής ενέργειας που καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα. Ο συνήθης τύπος είναι η θεραπεία με ακτινοβολία εξωτερικής δέσμης. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί η θεραπεία με υποθλαστική ακτινοβολία που χρησιμοποιεί ακτινοβολία εξωτερικής ακτίνας. Σύμφωνα με την Αμερικανική Ουρολογική Εταιρεία, η συγκεκριμένη θεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί σε άτομα με πρώιμο καρκίνο του προστάτη ή παρηγορητικά σε μεταστατικές εστίες.

Παράλληλα, εξελίσσονται συνεχώς και οι τοπικές και στοχευμένες θεραπείες. Πρόκειται για λιγότερο επεμβατικές θεραπείες, οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως σε χαμηλού ή μεσαίου κινδύνου όγκους και καταστρέφουν τους όγκους τοπικά, χρησιμοποιώντας θερμότητα, ή ψύχος. Ένας τέτοιος τύπος τοπικής θεραπείας είναι η κρυοχειρουργική, στην οποία μέσω μιας μικρής τομής στην περιοχή μεταξύ του ορθού και του όσχεου, εισάγεται ένα μικρό όργανο το οποίο παγώνει και καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα στην περιοχή του προστάτη. Ο υπερηχογράφος υψηλής έντασης (HIFU) βασίζεται στη θερμότητα, και πήρε έγκριση για θεραπεία του καρκίνου του προστάτη το 2015. Στη συγκεκριμένη περίπτωση εισάγεται στο ορθό ένας ανιχνευτής υπερήχων και μέσω ηχητικών κυμάτων κατευθύνεται προς τις καρκινικές εστίες του προστάτη και καταστρέφει με τη χρήση θερμότητας τα καρκινικά κύτταρα.

Επιπρόσθετα, η στοχευμένη θεραπεία εστιάζει σε συγκεκριμένα γονίδια, πρωτεΐνες ή το μικροπεριβάλλον του όγκου και εμποδίζει την ανάπτυξη και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. Κύριος στόχος είναι η εξατομίκευση των ασθενών και της νόσου με βάση το μοριακό προφίλ του κάθε ασθενούς εξατομικευμένα.

Γ. Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί και γονίδια επιδιόρθωσης

Γ.1 Ο ρόλος των επιδιορθωτικών μηχανισμών

Οι ζωντανοί οργανισμοί εκτίθενται συνεχώς σε παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA [122]. Για τον λόγο αυτό τα κύτταρα διαθέτουν πολλούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που εφαρμόζονται κατά περίπτωση για

να επιδιορθώσουν τις βλάβες στο DNA. Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί διατηρούν και προστατεύουν τη γονιδιωματική σταθερότητα και ακεραιότητα στα κύτταρα, έναντι ενδογενών παραγόντων, που προκαλούν βλάβη στο DNA, όπως τα λάθη κατά τη μειωτική διαίρεση, καθώς επίσης και έναντι εξωγενών παραγόντων, όπως είναι η υπεριώδης και η ιονίζουσα ακτινοβολία. Στην αποκατάσταση των βλαβών του DNA συμμετέχουν διάφορα γονίδια επιδιόρθωσης και ένζυμα, μέσω των οποίων αποκόπτονται και αντικαθίστανται οι κατεστραμμένες περιοχές του DNA, ώστε να περιοριστεί η συσσώρευση μεταλλάξεων που επάγουν την καρκινογένεση.

Οι κύριοι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί είναι η επιδιόρθωση λανθασμένων ζευγών βάσεων (Mismatch repair-MMR), η επιδιόρθωση με εκτομή βάσεων (Base excision repair-BER), η επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίων (Nucleotide excision repair-NER) και η επιδιόρθωση δίκλωνων ρηγμάτων στον κλώνο του DNA (DNA Double Strand Break repair-DSBR) [123]. Ο επιδιορθωτικός μηχανισμός MMR διορθώνει τα λάθη που προκύπτουν κατά την αντιγραφή του DNA τα οποία οδηγούν στην εισαγωγή μίας λανθασμένης βάσης. Τα στάδια περιλαμβάνουν την αναγνώριση της βλάβης, τη διάκριση του θυγατρικού DNA κλώνου, την απομάκρυνση της λανθασμένης βάσης, την αντικατάστασή της και την επανασύνθεση του DNA κλώνου. Ο επιδιορθωτικός μηχανισμός BER επιδιορθώνει λάθη που αφορούν σε μία μόνο νουκλεοτιδική βάση και θραύσματα στη μία αλυσίδα του DNA. Ο επιδιορθωτικός μηχανισμός NER επιδιορθώνει βλάβες που αφορούν δύο ή περισσότερα νουκλεοτίδια ή περιλαμβάνουν την προσθήκη μεγαλύτερων τμημάτων. Ο μηχανισμός αποκατάστασης των δίκλωνων θραυσμάτων στο DNA (DSB) ανιχνεύει βλάβες και είτε διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο μέχρι να αποκατασταθεί η βλάβη ή τα κύτταρα οδηγούνται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Ανάλογα με την περιοχή της βλάβης υπάρχουν δυο τρόποι επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραυσμάτων, που περιλαμβάνουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous Recombination) και την μη ομόλογη σύνδεση των άκρων (Non Homologous End-Joining).

Γ.2 Επιδιορθωτικά μονοπάτια και καρκινογένεση

Είναι γνωστό ότι η ανεπαρκής επιδιόρθωση του DNA μπορεί να οδηγήσει σε αναδιατάξεις χρωμοσωμάτων και συσσώρευση μεταλλάξεων με αποτέλεσμα τη γονιδιωματική αστάθεια. Η παρουσία πολυμορφισμών και κυρίως σημειακών μεταλλάξεων σε γονίδια που κωδικοποιούν επιδιορθωτικές πρωτεΐνες, συμβάλλει στην μειωμένη ή μη δράση των ενζύμων αυτών με αποτέλεσμα τη συσσώρευση βλαβών που δεν επιδιορθώνονται και δύνανται να επάγουν την καρκινογένεση. Με τον όρο «καρκίνος» αποδίδεται η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων που δυνητικά μετατρέπονται σε κακοήγη. Τα εν λόγω κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχύτερα από τα υγιή και δεν παρακάμπτουν τους μηχανισμούς που οδηγούν σε απόπτωση [124].

Τα κύτταρα από φυσιολογικά μετατρέπονται σε κακοήγη, καθώς αδρανοποιούνται τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και ενεργοποιούνται τα ογκογονίδια, τα οποία διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στους περισσότερους τύπους καρκίνου το κύριο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που αδρανοποιείται είναι το *TP53* το οποίο έχει καίριο ρόλο στον εντοπισμό βλαβών όταν υπάρχει θραύση και των δύο αλυσίδων του DNA (DSB). Αναγνωρίζοντας τη βλάβη ενεργοποιεί τους κατάλληλους μηχανισμούς επιδιόρθωσης για την αποκατάστασή της ή εναλλακτικά οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση.

Οι πολυμορφισμοί στο επίπεδο του ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms- SNPs) είναι ένας συνήθης τύπος γενετικής παραλλαγής στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Ενδεικτικά, απαντούν τουλάχιστον 10 εκατομμύρια SNPs, συνήθως κάθε 100-300 ζεύγη βάσεων σε συχνότητα αλληλόμορφων μεγαλύτερη από 1% [125]. Οι μετατροπές Αδενίνης σε Γουανίνη (A→G) ή Κυτοσίνης σε Θυμίνη (C→T) εμφανίζονται συχνότερα έναντι των μετατροπών Αδενίνης σε Κυτοσίνη ή Θυμίνη (A→C ή T) και Γουανίνης σε Κυτοσίνη ή Θυμίνη (G→C ή T) [126]. Όταν οι πολυμορφισμοί βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή μεταβάλλουν τη δραστηριότητά του και επομένως επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου, μέσω αλλαγών που ενδέχεται να επιφέρουν ως προς την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα ή τη μεθυλίωση του DNA. Πολυμορφισμοί έχουν καταγραφεί επίσης στην 5' αμετάφραστη περιοχή και επηρεάζουν τη μετάφραση του mRNA μορίου, καθώς επίσης και στην 3' αμετάφραστη περιοχή, όπου επηρεάζουν την πρόσδεση microRNA μορίων. Τα

SNP που απαντούν στα εξόνια επηρεάζουν τη μεταφραστική μηχανή και φαίνεται επίσης να αυξάνουν την ευαισθησία στον καρκίνο, ενώ η παρουσία τους σε ιντρόνια των γονιδίων φαίνεται να επιδρά στη διαδικασία ματίσματος των mRNA μορίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν οι πολυμορφισμοί και οι μεταλλάξεις σημειώνονται σε γονίδια που κωδικοποιούν επιδιορθωτικά ένζυμα, επηρεάζουν λιγότερο ή περισσότερο τη λειτουργία των επιδιορθωτικών ενζύμων, με ενδεχόμενη μη αποτελεσματική επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση μεταλλάξεων και γενωμική αστάθεια και να επάγει την καρκινογένεση. Μέχρι σήμερα έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες συσχέτισης των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), που λαμβάνουν χώρα σε γονίδια επιδιόρθωσης με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη [127].

Γ.2.1 Πολυμορφισμοί στα γονίδια της αυτοφαγίας και καρκίνος του προστάτη

Πρόσφατα, επισημάνθηκε ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο και εξετάστηκε η πιθανή συμβολή της, καθώς φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να προάγει ή να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη. Υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν την εμπλοκή της αυτοφαγίας στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, ενώ σύμφωνα με άλλες μελέτες επηρεάζει την απόκριση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη στη χημειοθεραπεία και στην ακτινοθεραπεία, μέσω σύνδεσής της με την απόπτωση των κυττάρων. Ανοδικοί μεσολαβητές όπως η AMPK, τα μη κωδικοποιητικά RNA, το KLF5, το MTOR και άλλοι παράγοντες ρυθμίζουν την αυτοφαγία στον καρκίνο του προστάτη. Ορισμένες αντικαρκινικές ουσίες χορηγούμενες στα πλαίσια θεραπείας δύνανται να αναστέλλουν ή να διεγείρουν την αυτοφαγία στον εν λόγω τύπο καρκίνου. Μικρού μεγέθους μόρια, όπως το siRNA και το CRISPR-Cas9, εξετάζονται σε ερευνητικό για περαιτέρω χρήση τους στα πλαίσια στόχευσης των αυτοφαγικών γονιδίων. Απώτερος σκοπός είναι η εφαρμογή των ευρημάτων σε προκλινικές και κλινικές μελέτες για τη βελτίωση της επιβίωσης και της πρόγνωσης των ασθενών με καρκίνο του προστάτη [128]. Στην

καρκινογένεση του προστάτη, συμμετέχουν γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες [129,130]. Γνωρίζουμε πλέον ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *AR*, που κωδικοποιεί τον ανδρογονικό υποδοχέα, οδηγούν στην ανάπτυξη CRPC μετά από θεραπεία και σε αυτές προστίθενται και επιγενετικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν την έκφραση των εμπλεκόμενων γονιδίων [131,132].

Η αυτοφαγία αποτελεί έναν ομοιοστατικό μηχανισμό, ο οποίος εμπλέκεται στις διαδικασίες της γήρανσης και της καρκινογένεσης. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν έναν διττό και ιστοειδικό ρόλο του μηχανισμού της αυτοφαγίας, που σχετίζεται με το στάδιο του όγκου και τη χορηγούμενη θεραπεία. Η κύρια αυτοφαγική μηχανή συγκροτείται από τρία συμπλέγματα: α) το σύμπλεγμα ενεργοποίησης που επιτρέπει το σχηματισμό μίας πρόδρομης μορφής αυτοφαγοσώματος ως απάντηση σε ερεθίσματα, β) μόρια που εμπλέκονται στον σχηματισμό του ώριμου αυτοφαγοσώματος και γ) πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιμήκυνση του αυτοφαγοσώματος. Στην τελευταία ομάδα περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες *MAP1LC3* και *ATG16L1*, που κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τα γονίδια *MAP1LC3B* και *ATG16L1*.

Ορισμένοι πολυμορφισμοί, όπως οι rs78835907 και rs8044820 που σημειώνονται στα γονίδια *ATG16L1* και *MAP1LC3B* αντίστοιχα, τα οποία συμμετέχουν στο μηχανισμό της αυτοφαγίας και ειδικότερα στην ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος, φαίνονται να εμπλέκονται στον καρκίνο του προστάτη και να επηρεάζουν την έκβαση των ασθενών. Η μελέτη των Huang C.Y και συνεργατών του (2015), έδειξε ότι η παρουσία του παραλλαγμένου αλληλομόρφου A στον πολυμορφισμό *ATG16L1* rs78835907 (G>A), συνδέεται με αυξημένη έκφραση του *ATG16L1* γονιδίου, έναντι των ασθενών με γονότυπο GG. Στην ίδια μελέτη, διενεργήθηκε εκτεταμένη *in silico* ανάλυση, η οποία έδειξε την τάση η μειωμένη έκφραση του *ATG16L1* γονιδίου να συνδέεται με επιθετικότερες μορφές καρκίνου του προστάτη και χειρότερη έκβαση των ασθενών [133].

Ο πολυμορφισμός rs78835907 (G>A) εδράζεται στο χρωμόσωμα 2, στη θέση GRCh38.p14 chr 2 (NC_000002.12:g.233210531G>A), στην 5' αμετάφραστη περιοχή του *ATG16L1* γονιδίου. Ανάλογες μελέτες σχετικά με το λειτουργικό ρόλο του πολυμορφισμού rs78835907 (G>A), ανέδειξαν ότι η θέση του πολυμορφισμού βρίσκεται σε περιοχή ρύθμισης της μεταγραφής και ως εκ

τούτου ο πολυμορφισμός δύναται να επηρεάσει την έκφραση του *ATG16L1* γονιδίου με αντίστοιχες επιπτώσεις στο μονοπάτι της αυτοφαγίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η θέση στην οποία εδράζεται ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός φέρει θέσεις πρόσδεσης της αποακετυλάσης ιστόνης 2 (Histone Deacetylase 2, HDAC2). Οι μελέτες λειτουργικότητας που έχουν διεξαχθεί στα πλαίσια διερεύνησης του ρόλου του συγκεκριμένου πολυμορφισμού υποστηρίζουν ότι το αγρίου τύπου αλληλόμορφο G μεταβάλλει τη συγγένεια πρόσδεσης του ενζύμου HDAC2 στο DNA και μειώνει την έκφραση του *ATG16L1* γονιδίου. Σύμφωνα με άλλη μελέτη ο πολυμορφισμός rs78835907 (G>A) συνδέεται με αυξημένη έκφραση του *ATG16L1* γονιδίου και επιδεικνύει έναν προστατευτικό ρόλο στον καρκίνο του προστάτη [134].

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs8044820 του *MAP1LC3B* γονιδίου, αυτός απαντά στο χρωμόσωμα χρωμόσωμα 16 και συγκεκριμένα στη χρωμοσωμική θέση GRCh38.p14 chr 16 (NC_000016.10:g.87402776G>A) και εντοπίζεται σε ιντρόνιο. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και δεν είναι σαφής ο ρόλος του. Ελάχιστες μελέτες, σχετικά με τον καρκίνο του προστάτη, αναφέρουν την πιθανή σύνδεση του πολυμορφισμού rs8044820 του *MAP1LC3B* γονιδίου και κυρίως την υπερέκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου, με αυξημένο Gleason score και με αυξημένο κίνδυνο προόδου νόσου [133,135]. Ωστόσο, δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία δεδομένα για τον λειτουργικό ρόλο του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και χρειάζονται περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, καθώς και μελέτες λειτουργικότητας [134].

Γ.2.2 Είδη Αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός με την πρώτη αναφορά να προσδιορίζεται τη δεκαετία του 1950, με την εμφάνιση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας [136,137]. Ο μηχανισμός αυτός αφορά στην αποικοδόμηση των κυτταρικών συστατικών μέσω του σχηματισμού αυτοφαγοσωμάτων και της επακόλουθης σύντηξής τους με λυσοσώματα, με στόχο την αποσύνθεση και ανακύκλωση των δομικών συστατικών [138]. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι αυτοφαγίας, η αυτοφαγία που προκαλείται από συνοδά μόρια (CMA), η μικρο-αυτοφαγία και η μακροαυτοφαγία. Η μικροαυτοφαγία είναι η λιγότερο

μελετημένη, αλλά περιγράφει ουσιαστικά μία μη επιλεκτική οδό που απομονώνει κυτταροπλασματικά στοιχεία απευθείας στην μεμβράνη του λυσοσώματος μέσω εγκόλπωσης της μεμβράνης [139].

Η CMA είναι μία επιλεκτική μορφή αυτοφαγίας, που σηματοδοτεί μεμονωμένες πρωτεΐνες για λυσοσωμική αποικοδόμηση [140]. Η κύρια μορφή της αυτοφαγίας είναι η μακροαυτοφαγία, στην οποία δημιουργούνται παροδικά διαμερίσματα διπλής μεμβράνης, γνωστά ως φαγοφόρα, ώστε να δεσμεύσουν τα κυτταρικά στοιχεία εντός του αυτοφαγοσώματος και να ακολουθήσει η σύντηξη με το λυσόσωμα. Αυτό το είδος αυτοφαγίας παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης.

Γ.2.3 Η διαδικασία της αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία ολοκληρώνεται σε έξι στάδια, τα οποία περιλαμβάνουν α) την ενεργοποίηση, β) την ωρίμανση, γ) την επέκταση δ) τη σύντηξη, ε) την αποικοδόμηση και στ) την ανακύκλωση [92]. Το σύμπλοκο ULK1 (κινάση ενεργοποίησης αυτοφαγίας τύπου unc-51) που περιέχει ATG13 (σχετιζόμενη με την αυτοφαγία 13), ATG101 και RB1CC1 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Η κινάση σερίνης/θρεονίνης ULK1, συμμετέχει στη φωσφορυλίωση των συστατικών του συμπλόκου Ι της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης (PtdIns3K), συμπεριλαμβανομένων των BECN1 και PIK3C3/VPS34, και μεσολαβεί στην παραγωγή φαγοφόρων στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) [141].

Στο δεύτερο βήμα της ωρίμανσης, το σύμπλοκο ATG12-ATG5 σχηματίζεται μέσω της δράσης των ενζύμων ATG7 και ATG10 και προσλαμβάνεται στη μεμβράνη φαγοφόρων. Οι πρωτεΐνες MAP1LC3/LC3 (ελαφριά αλυσίδα 3 της πρωτεΐνης 1 που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους) και GABARAP (που αντιπροσωπεύουν δύο υποοικογένειες που αναφέρονται ως πρωτεΐνες της οικογένειας Atg8 λόγω ομολογίας με την Atg8 ζύμης) διασπώνται από την ATG4. Αυτές οι πρωτεολυτικά ωριμάζουσες πρωτεΐνες συνδέονται στη συνέχεια ομοιοπολικά με τη φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη στη μεμβράνη του φαγοφόρου. Η ανωτέρω σύνδεση εξαρτάται από τις ATG3 και ATG7 και περιλαμβάνει τη δημιουργία του ζεύγους ATG12-ATG5 [142–144].

Στη συνέχεια ακολουθεί η επέκταση του φαγοφόρου. Σε αυτό το βήμα, η LC3-II διαχωρίζεται από την επιφάνεια του αυτοφαγοσώματος, ώστε να ολοκληρωθεί η ωρίμανση και να επιτραπεί η σύντηξη είτε άμεσα με το λυσόσωμα είτε έμμεσα, αφού προηγηθεί η σύντηξη με το ενδόσωμα [141]. Η σύντηξη συμβαίνει με τη βοήθεια παραγόντων πρόσδεσης όπως η RAB7 και διαλυτές πρωτεΐνες σύντηξης της μεμβράνης ενεργοποίησης παράγοντα ευαίσθητου σε N-αιθυλο-λεϊμίδιο (SNARE).

Κατά τη σύντηξη με ένα λυσόσωμα, το περιεχόμενο αποικοδομείται από τα λυσοσωμικά ένζυμα και τα προϊόντα της διάσπασης επιστρέφουν στο κυτταρόπλασμα για επαναχρησιμοποίηση. Άλλα πειράματα αποκαλύπτουν τον ρόλο πρόσθετων μοριακών οδών και δικτύων σηματοδότησης στην αυτοφαγία. Για παράδειγμα, η MTOR λειτουργεί ως αναστολέας της αυτοφαγίας. Κατά την ενεργοποίηση της MTOR, τα επίπεδα AMP αυξάνονται και προκαλούν την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης AMPK. Η τελευταία καταστέλλει την MTOR, προκαλεί αυτοφαγία και αυξάνει τα επίπεδα ενέργειας στο κύτταρο [145].

Γ.2.4 Ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο του προστάτη

Η αυτοφαγία έχει διπλό ρόλο στην καρκινογένεση. Σε μία πρόσφατη ανασκόπηση που εξετάζει την σύνδεση της αυτοφαγίας και του καρκίνου, επισημαίνεται ότι έχει ιστοειδική δράση [146]. Η αυτοφαγία και η απόπτωση αποτελούν κύριους κλάδους στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Η διέγερση της αυτοφαγίας έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, με επακόλουθο την εξέλιξη του όγκου [147]. Αντιθέτως, όταν η αυτοφαγία έχει κατασταλτικό ρόλο, η επαγωγή τόσο της αυτοφαγίας, όσο και της απόπτωσης, μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή του καρκίνου.

Η κατανόηση της αυτοφαγίας και των μηχανισμών που τη διέπουν θα επιτρέψει ενδεχομένως τη χρήση βιοδεικτών της εν λόγω οδού στη θεραπεία του καρκίνου. Οι συνθήκες υποξίας ενεργοποιούν την οδό της αυτοφαγίας μέσω της PAK1 (κινάση 1 που ενεργοποιείται από την p21 (RAC1), η οποία φωσφορυλιώνει την ATG5 [148]. Οι μελέτες αυτού του είδους θα διαλευκάνουν το ρόλο της αυτοφαγίας στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου [149]. Η

αυτοφαγία μπορεί να ενισχύσει ή να μειώσει διπλά τη μετανάστευση και την διείσδυση του καρκίνου σε διάφορα σημεία [150–152]. Η αυτοφαγία μπορεί να προάγει σημαντικά την ικανότητα μετάστασης που διαθέτουν τα καρκινικά κύτταρα μέσω της επιθηλιο-μεσεγγχυματικής επαγωγής (EMT). Η αναστολή της αυτοφαγίας, ακολουθείται από μείωση των επιπέδων μεσεγγχυματικών δεικτών, όπως είναι η βιμεντίνη και καντχερίνη [153].

Ορισμένες μελέτες αναφέρουν επίσης επίδραση της αυτοφαγίας στη ρύθμιση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος [154,155]. Πιο συγκεκριμένα, η αυτοφαγία αποτρέπει την έκφραση του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας κατηγορίας I (MHCI) και περιορίζει την αντικαρκινική ανοσιακή απάντηση των T κυττάρων έναντι των καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος, με αποτέλεσμα την αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος [156]. Η αυτοφαγία φαίνεται επίσης να εμπλέκεται στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία. Ένα πρόσφατο πείραμα αποκάλυψε ότι η αναστολή της αυτοφαγίας ενισχύει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων του στομάχου στη χημειοθεραπεία [157].

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με την τρέχουσα βιβλιογραφία, η αυτοφαγία φαίνεται να εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ικανότητα μετάστασης. Δύναται να τροποποιήσει την απάντηση των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία και φαίνεται να ρυθμίζει επίσης την ανοσιακή απόκριση. Επομένως, θα πρέπει να διαλευκανθεί πλήρως ο ρόλος της αυτοφαγίας, να δημιουργηθεί ένα προγνωστικό μοντέλο και να αναδυθούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις [158–162].

Πολυάριθμοι παράγοντες αλληλοεπιδρούν, αναστέλλοντας ή ευοδώνοντας την αυτοφαγία με ποικίλους μοριακούς μηχανισμούς. Ένας από αυτούς με κυρίαρχο ρόλο στον καρκίνο του προστάτη είναι η σηματοδότηση AR [162,163]. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ανοδική ρύθμιση του DNM1L (dynamin 1 like), μέσω της σηματοδότησης AR σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, επηρεάζει τον μεταβολισμό και την καρκινογένεση, ενώ η καθοδική του ρύθμιση επάγει την αυτοφαγία και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [164].

Σε συνθήκες υποξίας ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας HIF1A/HIF-1α (υπομονάδα άλφα του παράγοντα 1 που επάγεται από την υποξία) και ενισχύεται ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των καρκινικών

κυττάρων του προστάτη [165–167]. Ο HIF1A προάγει τον όγκο στον καρκίνο του προστάτη και επηρεάζει τον μηχανισμό της αυτοφαγίας.

Οι παράγοντες ανάπτυξης ινοβλαστών (FGFs), εμπλέκονται σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, μεταξύ των οποίων η ανάπτυξη και διαφοροποίηση, η απόπτωση, η αγγειογένεση και η μεταβολική ρύθμιση [168]. Ο FGF21 εκκρίνεται από το ήπαρ και σχετίζεται με την μεταβολική ομοιόσταση [169]. Μειωμένη έκφραση του FGF21 σχετίζεται με μειωμένο πολλαπλασιασμό και επιβίωση, υποδηλώνοντας αντικαρκινική δράση. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέσω αναστολής του άξονα PI3K-AKT-MTOR, ο FGF21 προκαλεί αυτοφαγία, και αναστέλλει την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη [170]. Ωστόσο, ο προστατευτικός ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο του προστάτη δεν περιορίζεται στη σύνδεση με τον κυτταρικό θάνατο, αλλά δραστηριοποιείται αλληλοεπιδρώντας και με άλλες οδούς σηματοδότησης [130]. Αναφέρεται για παράδειγμα, ότι η υπερέκφραση της HSD17B4 προάγει τον πολλαπλασιασμό και την κακοήγη εξαλλαγή των καρκινικών κυττάρων στον προστάτη. Η ακετυλίωση της HSD17B4 προάγει την αποδόμησή της από την CMA και δρα προστατευτικά έναντι της εξέλιξης του όγκου [171].

Πίνακας 2. Ο ρόλος της αυτοφαγίας και ο διττός μηχανισμός δράσης στον καρκίνο του προστάτη. [Ανασκόπηση [128]]

<i>In vivo/</i> <i>In vitro</i>	Κυτταρική σειρά/μοντέλο ζώου	Επίδραση σε πολλαπλασιασμό ή επιβίωση	Παρατήρηση	Αναφορά
<i>In vivo</i>	DU145 κύτταρα	ΕΝΙΣΧΥΣΗ	Η PAK1 υφίσταται ανοδική ρύθμιση στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη και είναι απαραίτητη στην εξέλιξη του καρκίνου. Ρυθμίζεται από την MTOR.	[172]
<i>In vivo</i>	PC3, LNCaP και DU145 κύτταρα, ζωικά μοντέλα	ΕΝΙΣΧΥΣΗ	Η αναστολή του φαινομένου Warburg και η ταυτόχρονη καταστολή της αυτοφαγίας με τη χρήση χλωροκίνης μειώνουν σημαντικά την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη.	[173]
<i>In vivo</i>	LNCaP, 22Rv1 και HEK293T κυτταρικές σειρές Xenograft	ΕΝΙΣΧΥΣΗ	Η αναστολή της CAMKK2 σχετίζεται με μείωση της ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη μέσω αναστολής της αυτοφαγίας. Η αυτοφαγία αναστέλλεται λόγω της καταστολής της AMPK-ULK1.	[174]
<i>In vivo</i>	PC3 κύτταρα	ΕΝΙΣΧΥΣΗ	Επαγωγή στρες μέσω 1-φωσφορικής σφινγγοσίνης με ενίσχυση των επιπέδων ROS, επαγωγή αυτοφαγίας και επακόλουθη αύξηση της επιβίωσης σε καρκίνο του προστάτη.	[175]
<i>In vivo</i>	HEK293T κύτταρα	ΑΝΑΣΤΟΛΗ	Το σύμπλεγμα EP300/p300-CREBBP/CBP διεγείρει την αυτοφαγία στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, μέσω αποικοδόμησης του συμπλόκου CTNNB1/β-κατενίνης. Ακολουθεί μειωμένη εξέλιξη και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.	[176]
<i>In vivo</i>	LNCaP κύτταρα	ΑΝΑΣΤΟΛΗ	Το PLCE1/PLCe υφίσταται ανοδική ρύθμιση και ευοδώνει την εξέλιξη του όγκου, μέσω ενεργοποίησης της σηματοδότησης AR. Η μείωση του PLCE1 συμβάλλει στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας μέσω του άξονα AMPK-ULK1 και την επακόλουθη υποβάθμιση της σηματοδότησης AR.	[177]

(Συνέχεια)

Πίνακας 2 (συνέχεια). Ο ρόλος της αυτοφαγίας και ο διττός μηχανισμός δράσης στον καρκίνο του προστάτη. [Ανασκόπηση [128]]

<i>In vivo/ In vitro</i>	Κυτταρική σειρά/μοντέλο ζώου	Επίδραση σε πολλαπλασιασμό ή επιβίωση	Παρατήρηση	Αναφορά
<i>In vivo</i>	PC3 κύτταρα	ΑΝΑΣΤΟΛΗ	Η σηματοδότηση AR αναστέλλει την αυτοφαγία και προωθεί την ανάπτυξη του όγκου, ενώ αντιθέτως η σίγαση της οδού AR επάγει την αυτοφαγία και αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου.	[9]
<i>In vivo</i>	OC3 κύτταρα	ΑΝΑΣΤΟΛΗ	Υπερέκφραση BSG/CD147 σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Η σίγαση της BSG αυξάνει την έκφραση LC3-II. Η αυτοφαγία επιδρά αρνητικά στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.	[178]

Δ. PI3CA and AR σηματοδότηση

Ο υποδοχέας AR συνδέεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs)-90, HSP-70, HSP-56, καθώς και άλλες πρωτεΐνες συνοδούς που ρυθμίζουν τη διατήρηση και αποικοδόμηση του υποδοχέα [179]. Η σύνδεση του υποδοχέα με τον συνδέτη τον απελευθερώνει από τα προαναφερόμενα σύμπλοκα και ο AR μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται και συνδέεται με τα στοιχεία ανδρογονικής απόκρισης (AREs) [180]. Τα AREs περιλαμβάνουν επίσης γονίδια που εμπλέκονται στην έκφραση του PSA, τη βιοσύνθεση των ανδρογόνων, τη σύνθεση και επιδιόρθωση βλαβών του DNA, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [181,182]. Στην ενεργοποίηση του AR φαίνεται να εμπλέκονται και να δρουν συνεργατικά περισσότερες από 300 πρωτεΐνες, οι οποίες εξασφαλίζουν την μεταγραφή ή την καταστολή του [183].

Το σύμπλοκο ανδρογόνου-υποδοχέα ενεργοποιεί τη σηματοδότηση του μονοπατιού μέσω εξαρτώμενου, αλλά και μη εξαρτώμενου από τα ανδρογόνα μηχανισμού [184]. Οι ανεξάρτητες από τα ανδρογόνα οδοί σηματοδότησης συμπεριλαμβάνουν την ενεργοποίηση υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G (GPCRs), την οδό πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και παραλλαγές που επηρεάζουν τη λειτουργία του AR [185,186].

Το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR αποτελεί ενδοκυττάρια οδό σηματοδότησης και η ενεργοποίησή του σχετίζεται με την εξέλιξη του όγκου ποικίλους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, του στομάχου, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου, του προστάτη, του γλοιοβλαστώματος και του ενδομητρίου [73]. Η ενεργοποίηση της κινάσης PI3K αποτελεί έναν κεντρικό μηχανισμό μεταξύ των ανοδικών σημάτων ανάπτυξης και των κατάντη μηχανισμών μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται σε πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες, όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, ο μεταβολισμός, η φλεγμονή, η κυτταρική επιβίωση, η ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου.

Η PI3K αποτελεί μία μεγάλη οικογένεια λιπιδικών ενζύμων, ικανών να φωσφορυλιώνουν την ομάδα 3'-OH της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, που υπάρχει στην κυτταρική μεμβράνη. Τρεις κατηγορίες PI3K (τάξη I, τάξη II και τάξη III) έχουν εντοπιστεί στα θηλαστικά και οι κινάσες της IA υποομάδας διαθέτουν μία

καταλυτική και μία ρυθμιστική υπομονάδα [186]. Οι καταλυτικές υπομονάδες p110α, p110β, ή p110δ κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τα γονίδια *PIK3CA*, *PIK3CB* και *PIK3CD*. Οι ρυθμιστικές υπομονάδες αποτελούνται από την p85α (ισομορφές p85α, p55α, p50α), p85β και p55γ, οι οποίες κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τα γονίδια *PIK3R1*, *PIK3R2* και *PIK3R3*. Η υποομάδα IB περιλαμβάνει μόνο την καταλυτική υπομονάδα P110γ, και τις ρυθμιστικές υπομονάδες p84 και p101 [187]. Η κατηγορία II περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές μονομερείς ισομορφές και είναι η λιγότερο μελετημένη. Ωστόσο, τελευταία έχουν σημειωθεί μελέτες σχετικά με το ρόλο της συγκεκριμένης κατηγορίας στη μεταγωγή σήματος. Στην τελευταία κατηγορία (III) υπάρχει μόνο ένα μόριο, ως Vps34 (Vacuolar protein signal 34), το οποίο εκφράζεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και ανακαλύφθηκε πρώτη φορά σε ζυμομύκητες [188].

Η PI3K ενεργοποιείται κυρίως μέσω των RTKs, GPCRs και ογκογονιδίων όπως το *RAS*. Μόλις διεγερθεί, φωσφορυλιώνει την PIP2 σε PIP3 σηματοδοτώντας την στρατολόγηση κατάλληλων πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη. Η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της σηματοδότησης της PI3K αποτελεί συχνό φαινόμενο σε ποικίλους καρκίνους και οφείλεται κυρίως στις λειτουργίες των καταλυτικών υπομονάδων p110α και p110β. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA*, που κωδικοποιεί την υπομονάδα p110α, έχουν ανιχνευθεί σε καρκινικά κύτταρα του εντέρου, του πνεύμονα, του προστάτη, του ήπατος και του εγκεφάλου [204]. Το *PIK3CA* γονίδιο συμμετέχει στις διαδικασίες ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και ανάπτυξης. Κατέχει επίσης σημαντικό ρόλο στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπου προωθεί την αγγειογένεση και έμμεσα, μέσω παροχής διαθέσιμων θρεπτικών ουσιών, διευκολύνει την ανάπτυξη και μετάσταση του όγκου. Η ισομορφή p110α δραστηριοποιείται σε όγκους που καθοδηγούνται από ενεργοποιημένες κινάσες τυροσίνης και ογκογονίδια. Η p110β υπομονάδα απαιτείται κυρίως για την κατώτερη σηματοδότηση του GPCR, αλλά έχει βρεθεί επίσης ότι χρειάζεται για την ανάπτυξη υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του προστάτη (HG-PIN) [189].

Αξίζει να σημειωθεί ότι στη ρύθμιση της PI3K/AKT οδού παίζει σημαντικό ρόλο το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN*, το οποίο αποφωσφορυλιώνει την PIP3 σε PIP2, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο αρνητικά την ενεργοποίηση της οδού PI3K/AKT. Αυτή η φωσφατάση επιδρά σε λιπίδια και πρωτεΐνες και

αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενεργοποιώντας την απόπτωση. Η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *PTEN* παρεμποδίζει τον ογκοκατασταλτικό του ρόλο. Αξίζει να σημειωθεί ότι το *PTEN* γονίδιο εμπλέκεται σε πολλές κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες, μεταξύ αυτών ο πολλαπλασιασμός και η γήρανση των κυττάρων, η μετανάστευση και η γονιδιωματική αστάθεια, το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων, ενώ παράλληλα συμμετέχει στη ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου [189]. Μεταλλάξεις στο εν λόγω γονίδιο έχουν καταγραφεί σε όγκους μαστού, προστάτη, ενδομητρίου, ωοθηκών, παχέος εντέρου, μελανώματος, γλοιοβλαστώματος και λεμφωμάτων [190]. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν επιδείξει ότι η απώλεια ενός και μόνο αντιγράφου του γονιδίου *PTEN* είναι ικανή να διαταράξει την κυτταρική σηματοδότηση και να δώσει το έναυσμα για ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό [191].

Μέσα στα κύτταρα οι οδοί σηματοδότησης αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους εξασφαλίζοντας την μετάδοση του κατάλληλου σήματος κατά περίπτωση. Η αλληλοεπίδραση των PI3K/AKT/mTOR και AR μονοπατιών (crosstalking) έχει αποδειχθεί ότι λαμβάνει χώρα κατά την ανάπτυξη του ευνουχοάντοχου καρκίνου του προστάτη. Στον εντοπισμένο καρκίνο προστάτη οι διαταραχές στην σηματοδότηση στα προαναφερόμενα μονοπάτια συμβαίνουν σε ποσοστό της τάξης του 42% των περιπτώσεων, ποσοστό το οποίο προσεγγίζει το 100% στην προχωρημένη νόσο. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την συμμετοχή μηχανισμών ενεργοποίησης και αρνητικής ανάδρασης που επηρεάζουν τη σηματοδότηση των AR και PI3K/AKT οδών [192]. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, οι ασθενείς με καρκίνο προστάτη που φέρουν μεταλλάξεις ή έχουν ενίσχυση του *PIK3CA* γονιδίου συνδέονται με φτωχή πρόγνωση. Παράλληλα, η απώλεια του *PTEN* γονιδίου έχει συνδεθεί με ταχύτερη βιοχημική υποτροπή μετά από προστατεκτομή, μικρότερο διάστημα μέχρι την μετάσταση [193] και σύνδεση με για υψηλότερες βαθμολογίες κατά Gleason [194].

Η ΔΙΚΙΑ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήσαμε την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA*, καθώς και η διερεύνηση των πολυμορφισμών rs78835907 και rs8044820 των γονιδίων *ATG16L1* και *MAP1LC3B* αντίστοιχα, τα οποία συμμετέχουν στο μηχανισμό της αυτοφαγίας και ειδικότερα στη σύνθεση του αυτοφαγοσώματος. Η αυτοφαγία αποτελεί σημαντικό μηχανισμό διατήρησης της ομοιόστασης των κυττάρων και φαίνεται να έχει διττή δράση σε πολλούς όγκους, δρώντας ως υποκινητής αλλά και ως καταστολέας της καρκινογενετικής διαδικασίας. Ο πολυμορφισμός rs8044820 του *MAP1LC3B* γονιδίου έχει αναφερθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο εξέλιξης καρκίνου του προστάτη. Αντιθέτως, ο πολυμορφισμός rs78835907 στο *ATG16L1* γονίδιο σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εξέλιξης της νόσου, τόσο σε εντοπισμένο όσο και σε προχωρημένο καρκίνο προστάτη. Οι προαναφερόμενοι πολυμορφισμοί φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση και κατ' επέκταση και τη δράση των αντίστοιχων γονιδίων στο μονοπάτι της αυτοφαγίας. Ωστόσο, η διαθέσιμη βιβλιογραφία είναι περιορισμένη και αφορά στην πλειοψηφία της μικρό αριθμό δειγμάτων. Ως εκ τούτου, θελήσαμε να μελετήσουμε την κατανομή των συγκεκριμένων πολυμορφισμών σε Έλληνες ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και την πιθανή τους συσχέτιση με την ύπαρξη μεταλλάξεων του *PIK3CA* γονιδίου, καθώς και με τα κλινικο-παθολογο-ανατομικά στοιχεία των ασθενών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υπό μελέτη πληθυσμός

Συμπεριλάβαμε 30 ασθενείς με καρκίνο προστάτη, οι οποίοι προήλθαν από τρεις Ογκολογικές κλινικές. Ως ομάδα ελέγχου (control group) χρησιμοποιήσαμε 33 υγιείς άρρενες. Από τους ασθενείς συλλέξαμε νεοπλασματικό ιστό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (Formalin-Fixed Paraffin Embedded Tissue, FFPE), μετά την ολοκλήρωση της ιστολογικής διάγνωσης, ενώ για τα υγιή άτομα συλλέξαμε περιφερικό αίμα.

Παράλληλα, συλλέξαμε τα κλινικοεργαστηριακά στοιχεία σχετικά με το στάδιο της νόσου και το βαθμό κακοηθείας, καθώς και την πιθανή υποτροπή, την παρακολούθηση τους και τις γραμμές όπως και τα είδη θεραπείας που λάβανε καθώς και την ανταπόκριση που είχαν σε κάθε γραμμή.

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA ακολουθήσαμε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα, ένα για την απομόνωση από ιστικά δείγματα (FFPET) και ένα για απομόνωση από περιφερικό αίμα (ομάδα ελέγχου). Το γενωμικό DNA που εξήχθη χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* και των πολυμορφισμών rs78835907 και rs8044820 των γονιδίων *ATG16L1* και *MAP1LC3B* αντίστοιχα.

2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από FFPET ιστικά δείγματα

Η απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε σε ιστικά δείγματα, από τα οποία λάβαμε 5 τομές πάχους 10 μm σε σωληνάριο τύπου Eppendorf. Αρχικά έγινε αποπαραφίνωση του ιστού σε απαγωγό εστία (HOOD), ώστε να διαλυθεί η παραφίνη. Ακολούθησε η λύση των κυττάρων του ιστού, η διάσπαση των πυρήνων και η καταστροφή των ιστονών, ώστε να απομονώσουμε υψηλής καθαρότητας γενωμικό DNA.

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics Hellas) και η απομόνωση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας, με μικρές τροποποιήσεις:

Πειραματική διαδικασία

- Προσθέτουμε 500 μl διάλυμα ξυλόλης σε σωληνάριο τύπου Eppendorf, και κάνουμε έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
- Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου (15°C έως 30°C) για 5 λεπτά.
- Προσθέτουμε 500 μl διάλυμα απόλυτης αιθανόλης (96-100%) σε σωληνάριο τύπου Eppendorf, ώστε να εξουδετερωθεί η ξυλόλη και κάνουμε έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
- Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου (15°C έως 30°C) για 5 λεπτά.

- Φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
- Απόρριψη του εκλούόμενου υγρού με προσοχή, ώστε να μην διαταραχθεί το ίζημα.
- Προσθήκη 1 ml διαλύματος απόλυτης αιθανόλης (96-100%) στο σωληνάριο τύπου Eppendorf για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων ξυλόλης.
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
- Φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
- Απόρριψη του εκλούόμενου υγρού χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.
- Αποξήρανση του ιζήματος στους 56°C σε θερμαινόμενη πλάκα (heat block) ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη, καθώς η παραμονή της έχει ανασταλτικό χαρακτήρα στην PCR αντίδραση.
- Για την επαναδιάλυση του ιζήματος προσθέτουμε 180 μl διαλύματος λύσης του ιστού (Tissue Lysis Buffer, TLB) και προσθέτουμε 70 μl ανασυσταμένης πρωτεϊνάσης K, ώστε να διασπαστούν οι ιστόνες και να απελευθερωθεί το γενωμικό DNA.
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να ομογενοποιηθεί ο ιστός.
- Το δείγμα επωάζεται στη θερμαινόμενη πλάκα στους 56°C σε σωληνάριο Eppendorf για τουλάχιστον 12 ώρες (overnight).
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα και ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την επώαση.
- Την επόμενη ημέρα το δείγμα επωάζεται και πάλι στη θερμαινόμενη πλάκα για μία ώρα στους 90°C.
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα και ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την επώαση.
- Το σωληνάριο τύπου Eppendorf ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου (15°C έως 30°C) και ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρωση (spin-down), ώστε να καθιζάνουν όλες οι σταγόνες από τα τοιχώματα.
- Προσθέτουμε 200 μl διαλύματος δέσμησης της παραφίνης (Paraffin Binding Buffer, PBB) και αναμιγνύουμε, τουλάχιστον 3 φορές με την πιπέτα.
- Επωάζουμε σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C για τουλάχιστον 10 λεπτά.
- Προσθέτουμε 100 μl διαλύματος ισοπροπανόλης και αναμιγνύουμε με την πιπέτα τουλάχιστον τρεις φορές.

- Μεταφέρουμε σε στήλη με φίλτρο (FT) που έχει τοποθετηθεί σε σωληνάριο συλλογής (CT).
- Φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
- Τοποθέτηση της στήλης FT σε νέο σωληνάριο συλλογής CT και προσθήκη 500 μl διαλύματος πλύσης DNA (Wash Buffer I, WB I).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
- Απορρίπτουμε το εκλούόμενο υγρό, διατηρώντας το ίδιο σωληνάριο συλλογής CT.
- Προσθέτουμε στη στήλη 500 μl διαλύματος πλύσης DNA II (Wash Buffer II, WB II).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά, μέχρι να περάσει όλη η ποσότητα του δείγματος από τη στήλη.
- Στη συνέχεια, τοποθετούμε τη στήλη FT σε νέο σωληνάριο συλλογής και φυγοκεντρούμε τη μονάδα FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά, προκειμένου να στεγνώσει η στήλη και να μη φέρει υπολείμματα αλκοόλης.
- Η στήλη FT τοποθετείται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf και προστίθενται 35 μl διαλύματος έκλουσης του DNA (Elution Buffer, EB), στο κέντρο της στήλης FT.
- Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15°C έως 30°C). 23 και φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
- Το εκλούόμενο δείγμα περιέχει το γενωμικό DNA, το οποίο συλλέγεται και φορτώνεται εκ νέου τη στήλη FT.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
- Μετά το πέρας, το γενωμικό DNA κάθε δείγματος συλλέγεται και τοποθετείται σε σωληνάριο τύπου.
- Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C μέχρι τη χρήση τους.

2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Η μέθοδος της απομόνωσης

βασίζεται στη χρήση στηλών/μεμβρανών από πηκτή σιλικόνης, που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τα νουκλεϊνικά οξέα.

Πειραματική διαδικασία:

- Σε σωληνάριο τύπου erpendorf (χωρητικότητας 1.5 mL), προσθέτουμε 25 μl διαλύματος πρωτεΐνωσης K, 200 μl διαλύματος λύσης/πρόσδεσης (B3) και 200 μl δείγμα περιφερικού αίματος που έχουμε προηγουμένως ανακινήσει.
- Καλή ανάδευση του προαναφερόμενου μίγματος (vortex) και σύντομη φυγοκέντρηση (spin down)
- 15 λεπτά επώαση σε θερμαινόμενη πλάκα (heat block) στους 70°C
- Προσθήκη 210 μl διαλύματος καθαρής (απόλυτη) αιθανόλης (96–100%)
- Καλή ανάδευση του μίγματος (vortex) και σύντομη φυγοκέντρηση.
- Τοποθετούμε σε κατάλληλη στήλη 600-650 μl από το παραπάνω μίγμα
- Φυγοκέντρηση στις 18.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής
- Προσθέτουμε 500 μl διαλύματος πλύσης (BW) στη στήλη
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 18.000 στροφές (rpm) για 1 λεπτό
- Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο συλλογής και ακολουθεί επόμενη πλύση και συγκεκριμένα
- Προστίθενται στη στήλη 600 μl διαλύματος πλύσης (B5)
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 18.000 στροφές (rpm) για 1 λεπτό
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής
- Φυγοκέντρηση της στήλης στις 18.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά, προκειμένου να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης, καθώς η παραμονή της αναστέλλει την PCR αντίδραση.
- Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο τύπου Erpendorf.
- Στη συνέχεια προστίθενται στη στήλη 100 μl διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer), το οποίο έχει προθερμανθεί στους 70°C.
- Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 18.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά

- Επανατοποθέτηση του δείγματος στην στήλη και εκ νέου επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 18.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά
- Αποθήκευση του δείγματος στους -20°C μέχρι τη χρήση του.

2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός γενωμικού DNA - Φωτομέτρηση

Το DNA που απομονώθηκε από τους ασθενείς και τα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου) φωτομετρήθηκε προκειμένου να εκτιμήσουμε την ποσότητα και την ποιότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων. Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο τύπου Nanodrop 2000.

Η ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την φωτομέτρηση είναι 1-2 μl. Η καθαρότητα κάθε δείγματος εκτιμήθηκε με βάση το λόγο OD260/OD280, ο οποίος πρέπει να είναι περίπου 1,8-2,0, ώστε να θεωρείται υψηλής καθαρότητας το DNA. Τιμές μικρότερες από 1,7 υποδηλώνουν προσμίξεις πρωτεϊνών ή φαινόλης, ενώ τιμές μεγαλύτερες από 2,0 υποδηλώνουν πρόσμιξη με άλλα μακρομόρια.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος με βάση τον νόμο του Lambert-Beer: $C \text{ double-stranded DNA (ng/}\mu\text{l)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{συντελεστής αραίωσης}$, όπου C= υπολογιζόμενη συγκέντρωση.

2.5 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Για τον έλεγχο της επιτυχούς ενίσχυσης των PCR προϊόντων φτιάξαμε πήκτωμα αγαρόζης 3% σύστασης. Για την παρασκευή του πηκτώματος ζυγίζουμε σε ζυγό ακριβείας την απαραίτητη ποσότητα αγαρόζης και την προσθέτουμε σε συγκεκριμένη ποσότητα TBE ρυθμιστικού διαλύματος 1X (TRIS-BORIC-EDTA). Για το πήκτωμα αγαρόζης σύστασης 3% χρησιμοποιήσαμε 300 μl TBE ρυθμιστικό διάλυμα και 9 γραμμάρια αγαρόζης.

Θερμαίνουμε το μίγμα σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και να γίνει διαυγές το διάλυμα. Στη συνέχεια προσθέτουμε 20 μl

βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει την ιδιότητα να εισέρχεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός UV. Αδειάζουμε το διάλυμα στο εκμαγείο και αφήνουμε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις πήξει, συλλέγεται προσεκτικά, τυλίγεται σε μεμβράνη και αλουμινόχαρτο και αποθηκεύεται στο ψυγείο μέχρι περαιτέρω χρήση.

2.6 Επιλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να συνθέτει νέα αλυσίδα DNA συμπληρωματική ως προς την υπάρχουσα μητρική αλυσίδα. Η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει νουκλεοτίδια εφόσον προϋπάρχει μία περιοχή 3'-OH, επομένως, χρειάζεται έναν εκκινητή, στον οποίο θα προστεθεί το πρώτο νουκλεοτίδιο. Η αντίδραση περιλαμβάνει κατά κανόνα 30-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης σε υψηλή θερμοκρασία, ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA, υβριδοποίησης, σε θερμοκρασία περίπου 5°C κάτω από το T_m των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση και επιμήκυνσης στους 72°C, ώστε να ολοκληρωθεί η σύνθεση των νεοσυντιθέμενων κλώνων. Με την ολοκλήρωση της PCR αντίδρασης τα δείγματα φυλάσσονται στο ψυγείο ή ελέγχονται άμεσα με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης, ώστε να ελεγχθεί εάν ήταν επιτυχής η ενίσχυσή τους.

Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε τους πολυμορφισμούς rs78835907 και rs8044820 των γονιδίων *ATG16L1* και *MAP1LC3B* αντίστοιχα. Οι PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf (Εικόνα 1). Για κάθε πολυμορφισμό που εξετάσαμε πραγματοποιήθηκε αντίδραση με μίγμα αντιδραστηρίων και εκκινητών σε κατάλληλες ποσότητες και συνθήκες που απεικονίζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 3, 4, 5).



Εικόνα 1. Θερμικός Κυκλοποιητής τύπου Eppendorf.

Πίνακας 3. Αλληλουχίες εκκινητών (EurofinsGenomics) για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων *ATG16L1* και *MAP1LC3B* που περιλαμβάνουν τους πολυμορφισμούς rs78835907 και rs8044820, αντίστοιχα.

Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών 5'→3'	Tm	Μέγεθος PCR προϊόντων
ATG16L1- rs78835907 Εμπρόσθιος	TCCCGTTCCCTCATCCTTCGA	61,8	232 ζεύγη βάσεων
ATG16L1- rs78835907 Ρανάστροφος	TCCTGGCCTCAGTTATCCATGC	62,1	
MAP1LC3B- rs8044820 Εμπρόσθιος	GCAGTAAATGGCACAGGCTTAG	60,3	379 ζεύγη βάσεων
MAP1LC3B- rs8044820 R ανάστροφος	CTGACCATGCTGTGTCCGT	58,8	

Πίνακας 4. Ποσότητες των αντιδραστηρίων της PCR αντίδρασης ανά δείγμα για κάθε πολυμορφισμό.

Μίγμα αντιδραστηρίων	ATG16L1- rs78835907 Όγκος(μl)	MAP1LC3B- rs8044820 Όγκος(μl)
10x ρυθμιστικό διάλυμα	5	5
25 mM MgCl ₂	4	4
40 mM dNTPs	3	3

Πρόσθιος εκκινητής F	2	1,5
Ανάστροφος εκκινητής R	1	1
Taq DNA Polymerase	0.4	0.4
ddH ₂ O	Προσαρμόζεται ανάλογα με την ποσότητα του προστιθέμενου γενωμικού DNA	
Γενωμικό DNA	100 – 200 ng/ αντίδραση	
Τελικός όγκος αντίδρασης	50	50

Σημειώνεται ότι για κάθε PCR αντίδραση, εκτός από τα εξεταζόμενα δείγματα χρησιμοποιήθηκε και αρνητικός μάρτυρας (απουσία DNA), ώστε να ελεγχθούν οι αντιδράσεις για τυχόν επιμολύνσεις.

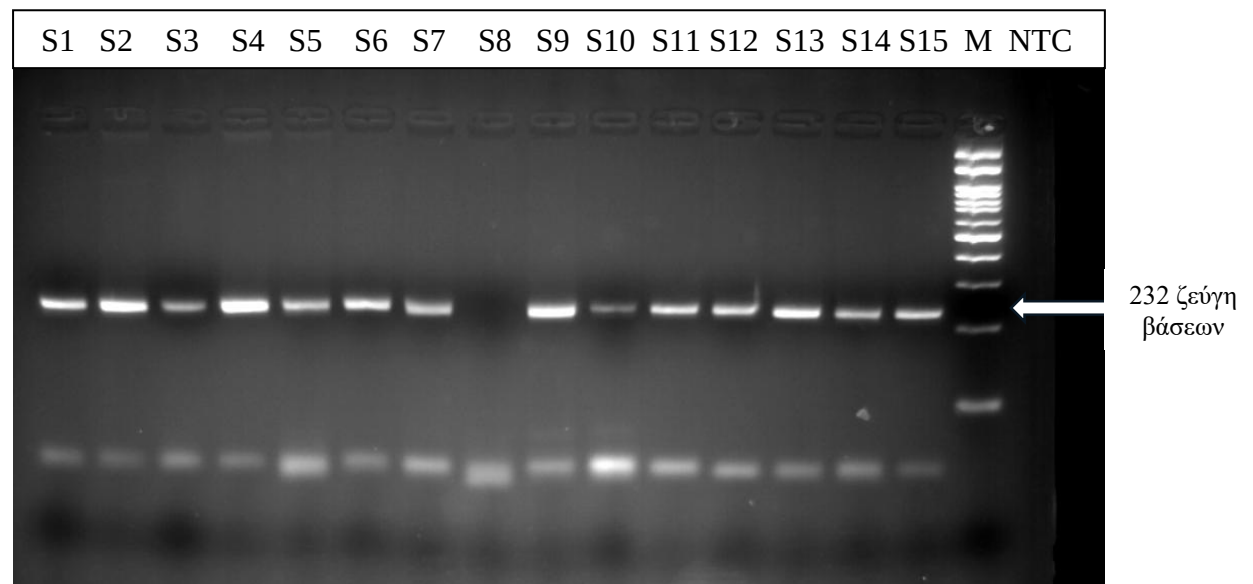
Πίνακας 5. Συνθήκες διεξαγωγής PCR αντίδρασης για τους πολυμορφισμούς *ATG16L1*- rs78835907 και *MAP1LC3B*- rs8044820 στον θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf.

Στάδιο PCR αντίδρασης	Θερμοκρασία(°C) MAP1LC3B- rs8044820 / ATG16L1- rs78835907	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	5 λεπτά	1
Αποδιάταξη	95	1 λεπτό	35
Υβριδοποίηση	58/ 60	1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72	1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72	10min	1
Συντήρηση	4	∞	

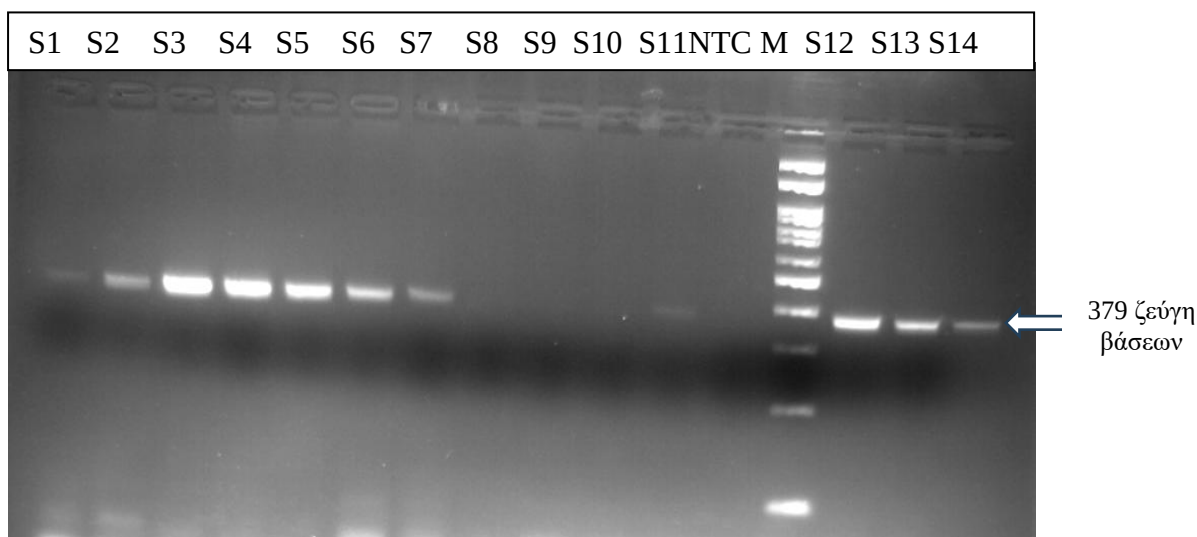
2.7 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων

Μετά την PCR ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης σύστασης 3%. Ετοιμάζουμε το μίγμα, το οποίο περιέχει 12 μλ PCR προϊόντος και 6 μλ μιας ειδικής χρωστικής, με γλυκερόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης. Η γλυκερόλη συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος και στην διατήρησή του στο βοθρίο φόρτωσης, ενώ το μπλε της βρωμοφαινόλης καθιστά ορατή την ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση, ηλεκτροφορείται παράλληλα με τα δείγματα μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους - εδώ χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100 bp της εταιρείας Nippon Genetics- που επιτρέπει τον σαφή

προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται υπό υπεριώδες φως και η εικόνα αποθηκεύεται σε υπολογιστή, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ηλεκτρικό πεδίο 80-100 Volt για 30-40 λεπτά. Στη συνέχεια το πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρεται στη συσκευή παρατήρησης και φωτογράφησης UV, η οποία είναι συνδεδεμένη με υπολογιστή. Με βάση το φθορισμό που εκπέμπει το βρωμιούχο αιθίδιο κατά την ενσωμάτωσή του μεταξύ των βάσεων στο δίκλωνο DNA γίνεται η εκτίμηση των δειγμάτων. Ενδεικτικές εικόνες ηλεκτροφόρησης για τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνες 2, 3).



Εικόνα 2. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για τον πολυμορφισμό rs78835907 του γονιδίου *ATG16L1* σε πήκτωμα αγαρόζης 3% σύστασης. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας (M) γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους 100 bp (Nippon Genetics). S1-S15: Δείγματα ασθενών με καρκίνο προστάτη, NTC: Non template control, μάρτυρας για έλεγχο επιμολύνσεων. Μέγεθος PCR προϊόντων: 232 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 3. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για τον πολυμορφισμό rs8044820 του MAP1LC3B σε πήκτωμα αгарόζης 3% σύστασης. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας (M) γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους 100 bp (Nippon Genetics). S1-S14: Δείγματα ασθενών με καρκίνο προστάτη, NTC: Non template control, μάρτυρας για έλεγχο επιμολύνσεων. Μέγεθος PCR προϊόντων: 379 ζεύγη βάσεων.

2.8 Καθαρισμός δειγμάτων για ανάλυση της αλληλουχίας

Τα δείγματα των ασθενών και των υγιών ατόμων (ομάδα ελέγχου) που ενισχύθηκαν επιτυχώς καθαρίστηκαν προκειμένου να ακολουθήσει η ανάλυση της αλληλουχίας τους για τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς. Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε για τον καθαρισμό των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με εξαγωγή της ζώνης του PCR προϊόντος από το πήκτωμα αгарόζης μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Lab Supplies). Η διαδικασία που ακολουθήσαμε περιγράφεται παρακάτω:

Πρωτόκολλο καθαρισμού PCR προϊόντων

1. Ηλεκτροφόρηση του συνόλου του εναπομείναντος PCR προϊόντος σε πήκτωμα αгарόζης 3% σύστασης.
1. Μεταφορά του πηκτώματος στη συσκευή UV για οπτικοποίηση.
2. Τεμαχισμός του πηκτώματος και αφαίρεση της φθορίζουσας ζώνης για κάθε δείγμα.
3. Τοποθέτηση του τεμαχιδίου αгарόζης που αφαιρέθηκε σε σωληνάριο τύπου

erpendorf (ξεχωριστά για κάθε δείγμα), ζύγισμα σε εργαστηριακό ζυγό ακρίβειας και καταγραφή του βάρους τους.

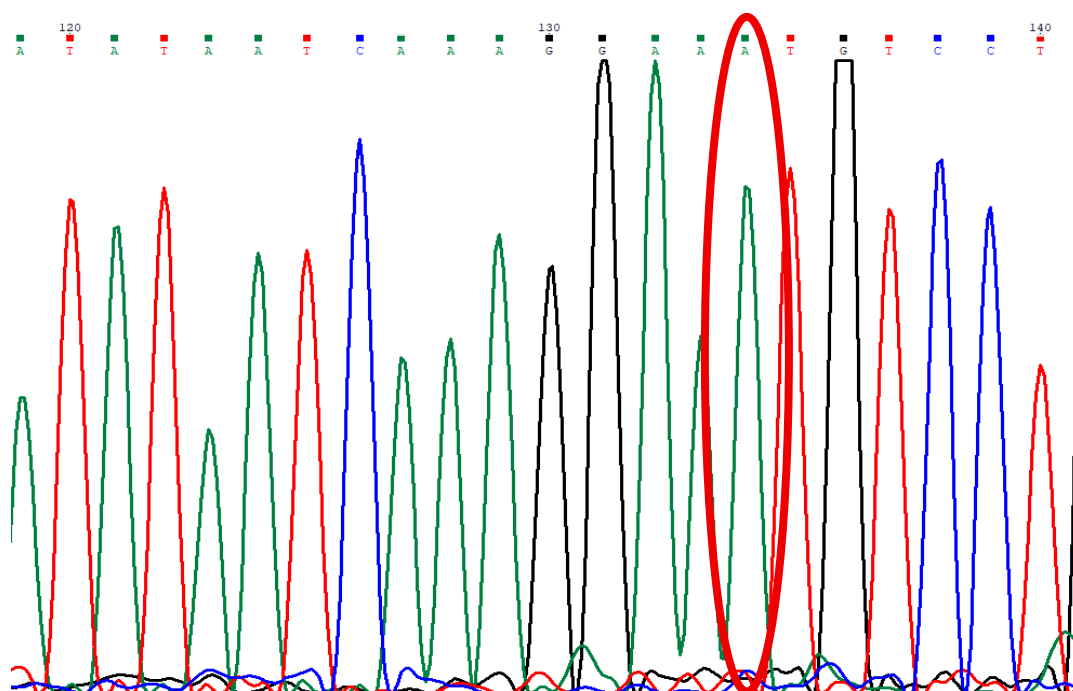
4. Διάλυση του πηκτώματος αγαρόζης, με προσθήκη 2X του όγκου του τεμαχιδίου αγαρόζης από το διάλυμα NTI (ενδεικτικά, για 100 mg πηκτώματος αγαρόζης προστέθηκαν 200 μl NTI διαλύματος).
5. Επώαση των δειγμάτων σε θερμαντική πλάκα στους 50°C μέχρι την πλήρη διάλυση του πηκτώματος. Ο χρόνος που χρειάστηκε για κάθε δείγμα ήταν ανάλογος του βάρους του τεμαχιδίου του πηκτώματος αγαρόζης και κυμάνθηκε από 30 λεπτά έως 1 ώρα. Κατά το διάστημα αυτό πραγματοποιούνταν έντονη ανάδευση για κάθε δείγμα (vortex) για διευκόλυνση της διαλυτοποίησης.
6. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση των παραπάνω δειγμάτων, ακολούθησε φόρτωση 600 μl του κάθε δείγματος σε κατάλληλη στήλη (παρέχεται από το kit) και φυγοκέντρηση στις 11.000 g για 1 λεπτό. Το παραπάνω βήμα επαναλήφθηκε όσες φορές χρειάστηκε ώστε να περάσει όλο το δείγμα από κάθε στήλη.
7. Ακολούθησε προσθήκη 600 μl διαλύματος NT3 και εκ νέου φυγοκέντρηση στις 11.000g για 1 λεπτό.
8. Επανάληψη του βήματος 8.
9. Στέγνωμα της κάθε στήλης, ώστε να εξατμιστούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης, με νέα φυγοκέντρηση στις 11.000 g για 2 λεπτά.
10. Προσθήκη 22 μl NE διαλύματος έκλουσης και επώαση κάθε στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 11.000g για 1 λεπτό.
11. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια τύπου erpendorf των 0,5 ml και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο.

Τα καθαρισμένα προϊόντα ελέγχονται σε πήκτωμα αγαρόζης 3% σύστασης, κατά την οποία σε κάθε βοθρίο του πηκτώματος φορτώνεται μίγμα που περιέχει 8 μl καθαρισμένου PCR προϊόντος και 6 μl χρωστικής που περιέχει γλυκερόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης. Στη συνέχεια, τα δείγματα που καθαρίστηκαν από προσμίξεις επιτυχώς στάλθηκαν για ανάλυση της αλληλουχίας.

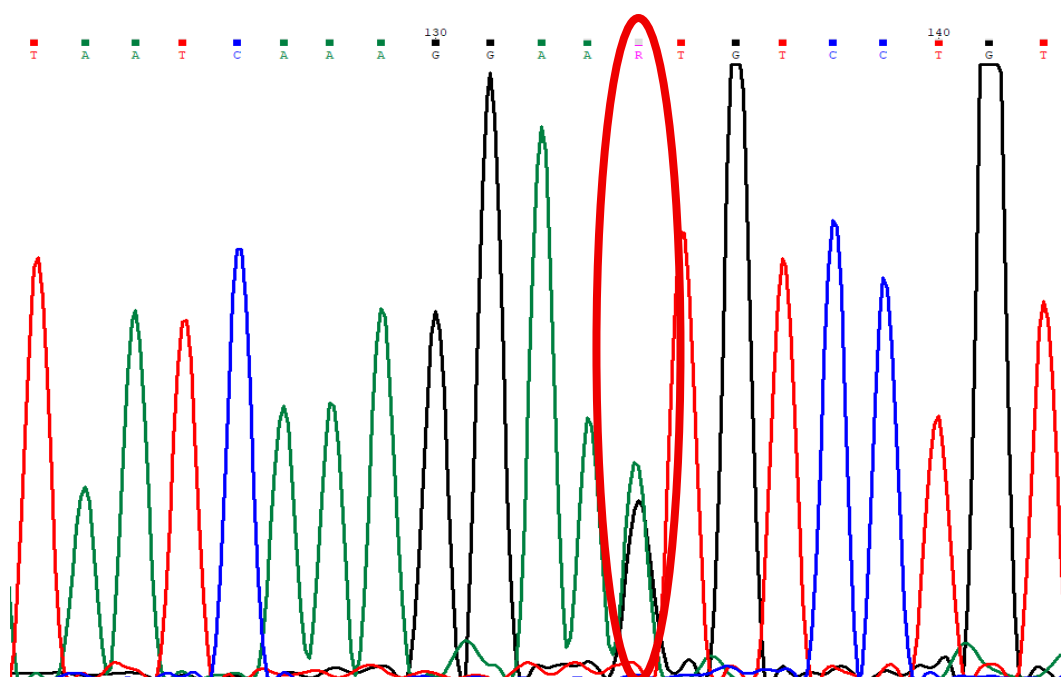
2.9 Αλληλούχηση κατά Sanger

Η αλληλούχηση κατά Sanger είναι γνωστή ως αλληλούχηση αλυσίδας τερματισμού ή «διδεοξυαλληλούχηση». Αναπτύχθηκε το 1975 από τον Frederick Sanger και έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ακόμη και σήμερα, αν και έχουν εισαχθεί νέες μέθοδοι αλληλούχησης, παραμένει το gold standard και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή της αντιγραφής του DNA και επιτυγχάνεται με την προσθήκη τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs), τα οποία στερούνται την 3' υδροξυλομάδα (3'OH). Για την αλληλούχηση απαιτούνται η μονή αλυσίδα του DNA (ssDNA) που πρόκειται να αλληλουχηθεί και χρησιμεύει ως μήτρα, το ζεύγος των εκκινητών, το ένζυμο της πολυμεράσης, ρυθμιστικό διάλυμα, dNTPs, σημασμένα ddNTPs και DMSO. Το ενσωματωμένο ddNTP στερείται την 3' υδροξυλομάδα, επομένως ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ της υδροξυλομάδας του C3 του προηγούμενου σακχάρου και του C5 του επόμενου δεν μπορεί να σχηματιστεί. Συνεπώς, τερματίζεται η ενίσχυση από την πολυμεράση στη συγκεκριμένη θέση. Συγκεκριμένα, τα ddNTPs σημαίνονται με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές και το σήμα ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός ένα λείζερ. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε μία μόνο αντίδραση και εφαρμόζεται η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης σε κατάλληλο γενετικό αναλυτή.

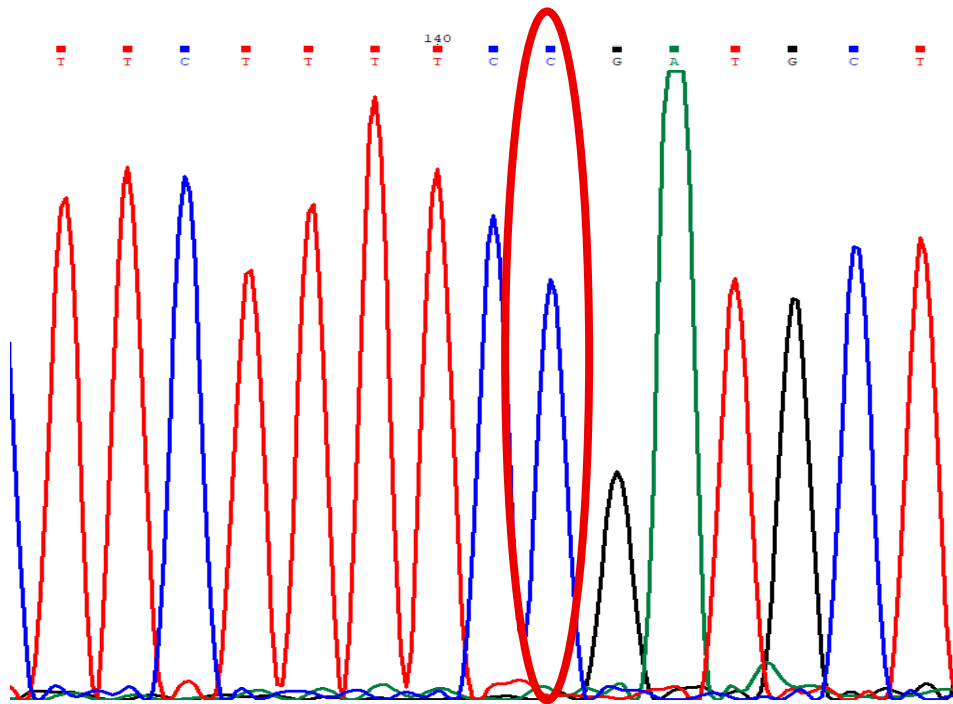
Η ανάλυση της αλληλουχίας των δειγμάτων της εργασίας μας πραγματοποιήθηκε και για τους δύο εξεταζόμενους πολυμορφισμούς σε αναλυτή ABI 3500 (Applied Biosystems). Μετά την αλληλούχηση τα δείγματα αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Chromas. Από την ανάλυση των δειγμάτων προέκυψαν χρωματογραφήματα που απεικονίζουν την αλληλουχία των εξεταζόμενων δειγμάτων και απεικονίζουν τα αλληλόμορφα του κάθε πολυμορφισμού, τα οποία βρίσκονται σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία. Ενδεικτικά χρωματογραφήματα απεικονίζονται παρακάτω.



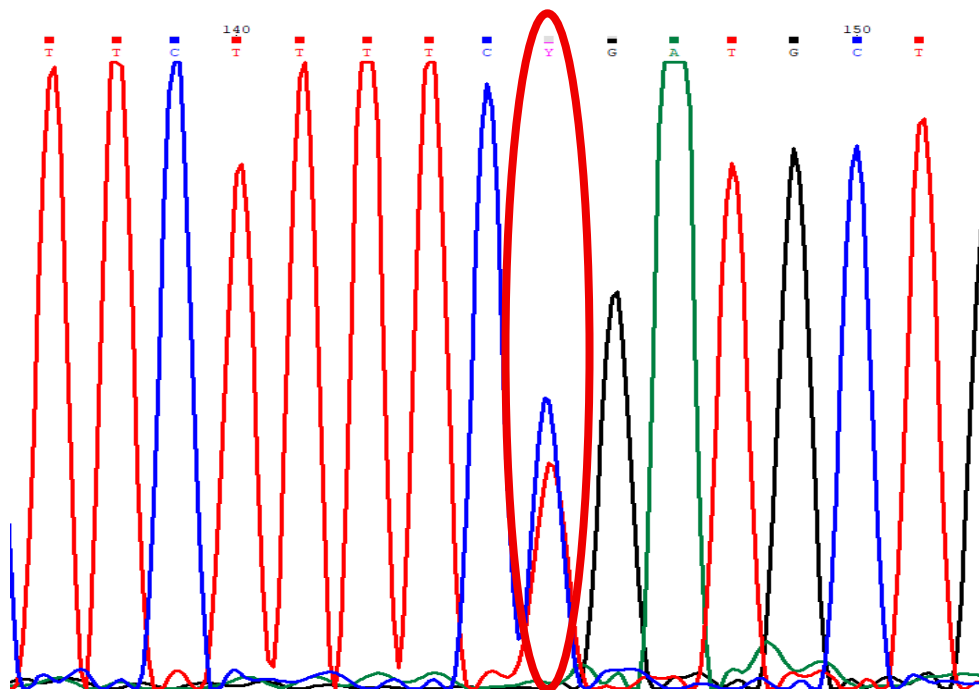
Εικόνα 4. Χρωματογράφημα αλληλούχησης για τον πολυμορφισμό rs8044820 του *MAP1LC3B* γονιδίου, στη θέση που επισημαίνεται με κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η θέση που εδράζεται ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός. Το δείγμα που απεικονίζεται φέρει το παραλλαγμένο αλληλόμορφο Α σε ομοζυγωτία, όπως απεικονίζεται η κορυφή με πράσινο χρώμα (διάβασμα της αλληλουχίας με τον πρόσθιο εκκινητή).



Εικόνα 5. Χρωματογράφημα αλληλούχησης για τον πολυμορφισμό rs8044820 του *MAP1LC3B* γονιδίου, στη θέση που επισημαίνεται με κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η θέση του πολυμορφισμού. Το δείγμα εδώ φέρει το παραλλαγμένο αλληλόμορφο Α σε ετεροζυγωτία. Απεικονίζονται στην ίδια θέση δύο κορυφές που αντιστοιχούν στο αλληλόμορφο Α (παραλλαγμένο, πράσινο χρώμα) και στο αλληλόμορφο G (αναφοράς, μαύρο χρώμα) (διάβασμα της αλληλουχίας με τον πρόσθιο εκκινητή).



Εικόνα 6. Χρωματογράφημα αλληλούχησης για τον πολυμορφισμό rs78835907 του *ATG16L1* γονιδίου, στη θέση που επισημαίνεται με κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η θέση που εδράζεται ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός. Το δείγμα που απεικονίζεται φέρει σε ομοζυγωτία το αλληλόμορφο C (αναφοράς, μπλε χρώμα) (διάβασμα της αλληλουχίας με τον ανάστροφο εκκινητή).



Εικόνα 7. Χρωματογράφημα αλληλούχησης για τον πολυμορφισμό rs78835907 του *ATG16L1* γονιδίου, στη θέση που επισημαίνεται με κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η θέση που εδράζεται ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός (διπλή κορυφή). Το δείγμα που απεικονίζεται φέρει σε ετεροζυγωτία το αλληλόμορφο C) (αναφοράς, μπλε χρώμα) και το αλληλόμορφο T (παραλλαγμένο, κόκκινο χρώμα) (διάβασμα της αλληλουχίας με τον ανάστροφο εκκινητή).

Τα σύνολα των ασθενών και των υγιών ατόμων αναλύθηκαν για τους δύο πολυμορφισμούς που αφορούν σε γονίδια αυτοφαγίας. Παράλληλα, οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη μας εξετάστηκαν και για πιθανές μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *PIK3CA* που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110α της PI3K πρωτεΐνης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ένας μηχανισμός ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μονοπατιού είναι οι μεταλλάξεις στο *PIK3CA* γονίδιο, εξετάσαμε τα δείγματα των ασθενών μας για την παρουσία μεταλλάξεων στα εξώνια 1, 4, 7, 9 και 20, στα οποία συμπεριλαμβάνεται περίπου το 80% των μεταλλάξεων στο εν λόγω γονίδιο. Η PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου COBAS z480, ο οποίος επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων που με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία > 95%.

2.10 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα από τις δοκιμές γονοτύπησης των ασθενών για τα γονίδια *MAP1LC3B*, *ATG16L1* και *PIK3CA*, καθώς και τα κλινικά δεδομένα των ασθενών καταχωρήθηκαν σε ενιαία ηλεκτρονική βάση και χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική ανάλυση με τη χρήση του ειδικού λογισμικού στατιστικού πακέτου SPSS v26. Στη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μόνο το σύνολο των ατόμων που έφερε πλήρεις καταγραφές τόσο κλινικών δεδομένων όσο και δοκιμών γονοτύπησης. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε περιγραφική στατιστική ανάλυση των κλινικών δεδομένων και υπολογίστηκαν οι συχνότητες των μεταλλάξεων του γονιδίου *PIK3CA*, καθώς και των αλληλομόρφων A και G όσο και των γονοτύπων (AA, GG, και AG) για τα γονίδια *MAP1LC3B* και *ATG16L1*.

Η συσχέτιση των μεταλλάξεων και των πολυμορφισμών των γονιδίων με την παρουσία του καρκίνου του προστάτη, καθώς και με τα κλινικά δεδομένα διερευνήθηκε με τη χρήση Fisher exact test (όταν οι αναμενόμενες τιμές ήταν < 5) ή με τη δοκιμή χ^2 (chi-square test). Για τη διερεύνηση της συσχέτισης των μεταλλάξεων και των αλληλομόρφων των εξεταζόμενων γονιδίων στις συνεχείς μεταβλητές (ηλικία διάγνωσης, έτη από τη διάγνωση μέχρι την πρώτη θεραπεία, και έτη από τη διάγνωση μέχρι το θάνατο) χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος t-test για ανεξάρτητα δείγματα, στην περίπτωση που οι μεταβλητές παρουσίαζαν κανονική κατανομή και το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney

στην περίπτωση που οι μεταβλητές παρουσίαζαν απόκλιση από την κανονική κατανομή. Το επίπεδο σημαντικότητας σε όλες τις στατιστικές αναλύσεις ορίστηκε στο $\alpha = 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κλινικά δεδομένα

Στη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα 23 από τα 30 ασθενή άτομα που συμπεριλήφθηκαν αρχικά στην μελέτη στα οποία κατέστησαν επιτυχείς οι δοκιμές γονοτύπησης. Ο μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης των ασθενών ήταν $67 \pm 9,4$ έτη (εύρος 48-83 έτη). Το 30,4% (7/23) των ασθενών κατηγοριοποιήθηκαν με Gleason score μικρότερο ή ίσο του 7, το 8,7% (2/23) με 8, το 52,2 % (12/23) με 9, και το υπόλοιπο 8,7% (2/23) με 10. Ως υψηλού βαθμού θεωρήθηκε το Gleason score που ήταν μεγαλύτερο του 7. Το 69,6% (16/23) των ασθενών εμφάνισαν οστικές μεταστάσεις ή μεταστάσεις στους λεμφαδένες (ένα σημείο μεταστάσεων), ενώ το υπόλοιπο 30,4% (7/23) των ασθενών εμφάνισε μεταστάσεις σε πολλαπλά σημεία.

Ο μέσος όρος ετών από τη διάγνωση μέχρι τη λήψη πρώτης γραμμής θεραπείας ήταν $4 \pm 4,4$ έτη, με το 78,3% (18/23) να παρουσιάζουν θετική ανταπόκριση σε αυτή. Το 69,6% (16/22) των ασθενών συνέχισαν σε δεύτερη γραμμή θεραπείας μετά από περισσότερους από 6 μήνες από τη λήψη της πρώτης γραμμής. Συνολικά μέχρι το τέλος της παρακολούθησης των ασθενών επιβίωσε το 13% (3/23), ενώ από τους υπόλοιπους ασθενείς που κατέληξαν, το 10% (1/20) δέχθηκε μόλις μία γραμμή θεραπείας, το 35% (7/20) δύο γραμμές, το 50% (10/23) τρεις, και ένας ασθενής πέντε γραμμές θεραπείας. Ο μέσος όρων ετών από τη διάγνωση μέχρι την κατάληξη των ασθενών ήταν τα $8 \pm 4,2$ έτη.

3.2 Συσχέτιση των κλινικών δεδομένων με την μετάλλαξη του γονιδίου *PIK3CA*

Από το σύνολο των ασθενών ατόμων, το 13% (3/23) έφερε μετάλλαξη στο γονίδιο *PIK3CA*. Από τους 3 ασθενείς που έφεραν μετάλλαξη κανείς δεν

κατηγοριοποιήθηκε με Gleason score <7 , κανείς δεν είχε μεταστάσεις σε περισσότερα από μία θέσεις, ένας μόνο ανταποκρίθηκε στην πρώτη γραμμή θεραπείας, ενώ οι 2 πέρασαν σε δεύτερη γραμμή θεραπείας σε λιγότερο από 6 μήνες, και τελικά όλοι κατέληξαν από τη νόσο. Ο μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης του καρκίνου στα άτομα που έφεραν την μετάλλαξη ήταν 71 ± 15.1 έτη, ενώ στα άτομα με το φυσιολογικό γονίδιο ήταν 66 ± 8.6 έτη. Επίσης, ο μέσος όρος των ετών από τη διάγνωση μέχρι την πρώτη γραμμή θεραπείας και από τη διάγνωση μέχρι την κατάληξη του ασθενούς ήταν $4 \pm 3,5$ και $5 \pm 4,9$ έτη, αντίστοιχα, στα άτομα που έφεραν τη μετάλλαξη, ενώ στα άτομα με το φυσιολογικό αλληλόμορφο γονίδιο ήταν $5 \pm 4,3$ και $8 \pm 4,1$ έτη, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 6 φαίνονται συγκεντρωτικά τα κλινικά δεδομένα των ασθενών σύμφωνα με την παρουσία μετάλλαξης στο γονίδιο *PIK3CA*. Ωστόσο, καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της παρουσίας μεταλλάξεων στο *PIK3CA* γονίδιο και του συνόλου των κλινικών δεδομένων των ασθενών ($p>0,05$).

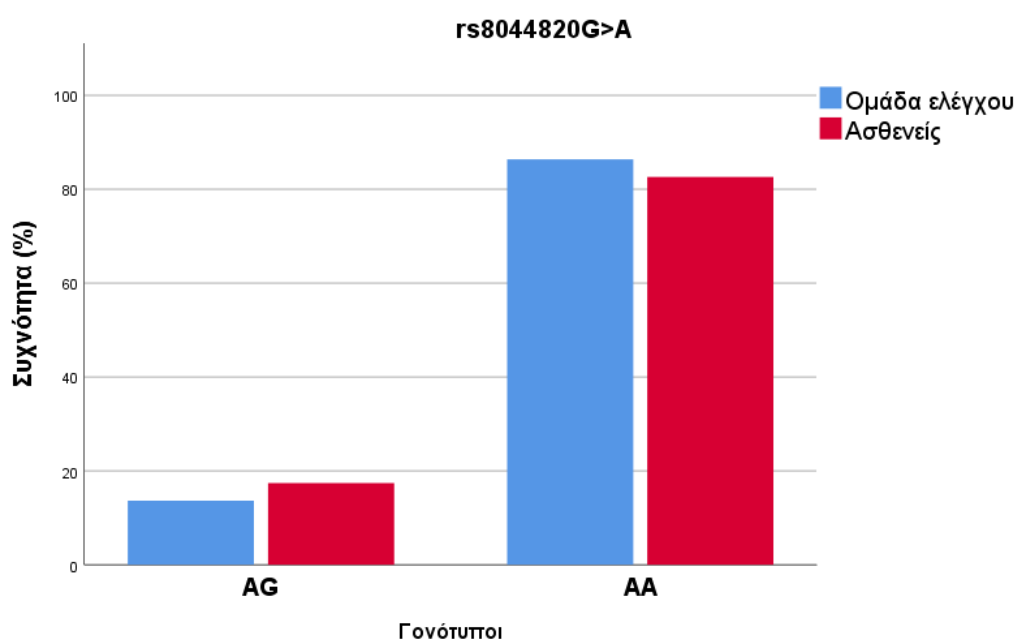
Πίνακας 6. Τα κλινικά δεδομένα των ασθενών που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA*.

PIK3CA	Ηλικία διάγνωσης (μέση τιμή ετών± τυπική απόκλιση)	Gleason score (%)		Μεταστάσεις (%)		Έτη από τη διάγνωση μέχρι την 1 ^η γραμμή θεραπείας (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)	Ανταπόκριση στην 1 ^η γραμμή θεραπείας (%)	Μήνες από την 1 ^η μέχρι τη 2 ^η θεραπεία (%)		Κατάληξη (%)	Αριθμός θεραπειών μέχρι την κατάληξη		Έτη από τη διάγνωση μέχρι την κατάληξη (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)
		≤7	>7	<1	>1			≤6	>6		≤2	>2	
Normal	66 ± 8.6	35 (7/20)	65 (13/20)	35 (7/20)	65 (13/20)	5 ± 4,3	85 (17/20)	21,1 (4/19)	78,9 (15/19)	85 (17/20)	41,2 (7/17)	58,8 (10/17)	8 ± 4,1
Mutated	71 ± 15.1	0	100 (3/3)	100 (3/3)	0	4 ± 3,5	33,3 (1/3)	66,7 (2/3)	33,3 (1/3)	100 (3/3)	66,7 (2/3)	33,3 (1/3)	5 ± 4,9

3.3 Συσχέτιση της παρουσίας καρκίνου του προστάτη με τους πολυμορφισμούς rs8044820 του γονιδίου *MAP1LC3B* και rs78835907 του γονιδίου *ATG16L1*

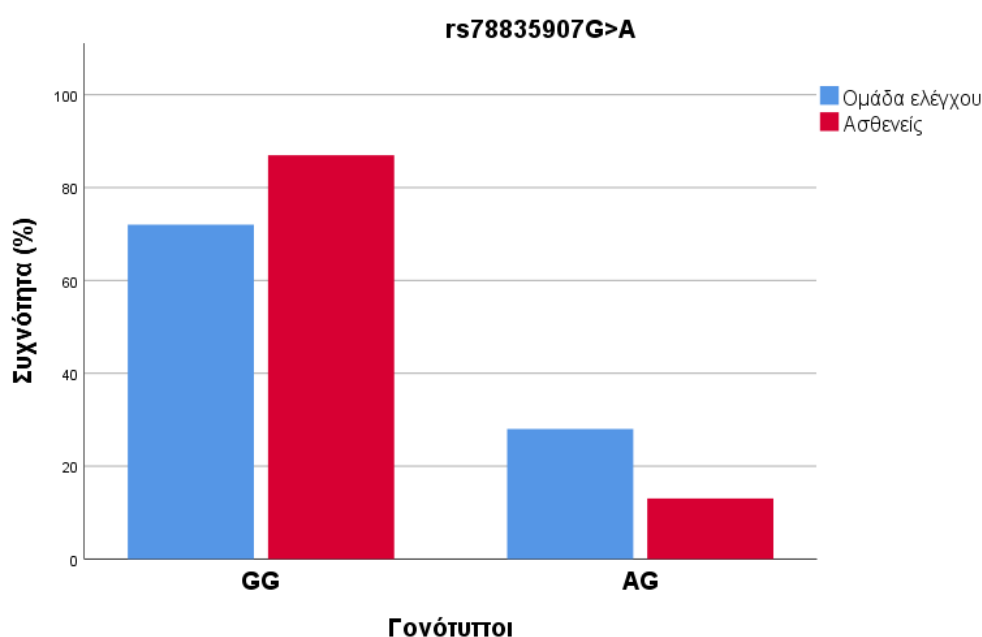
Στα υγιή άτομα η γονοτύπηση για τον πολυμορφισμό rs8044820G>A ήταν εφικτή σε 22 άτομα και για τον πολυμορφισμό rs78835907G>A σε 25 άτομα. Η γονοτύπηση ήταν επιτυχής στο σύνολο των ασθενών ατόμων.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs8044820G>A του γονιδίου *MAP1LC3B*, στους ασθενείς το 82,6% (19/23) έφεραν σε ομοζυγωτία το συχνότερο αλληλόμορφο A (AA), ενώ το 17,4% (4/23) ήταν ετερόζυγο (AG) για τον πολυμορφισμό. Στα υγιή άτομα το 86,4% (19/22) βρέθηκε ομόζυγο για το αλληλόμορφο A, ενώ το 13,6% (3/22) έφερε τον πολυμορφισμό σε ετεροζυγωτία (AG). Κανένα άτομο στις δύο ομάδες δεν εμφάνισε το αλληλόμορφο G σε ομοζυγωτία. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1 η κατανομή των αλληλομόρφων είναι παρόμοια στις δύο εξεταζόμενες ομάδες (ασθενείς, υγιή άτομα) και η συσχέτιση που προέκυψε δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p>0,05$).



Διάγραμμα 1. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs8044820G>A του γονιδίου *MAP1LC3B* στις ομάδες των ασθενών και στα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου).

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs78835907G>A του γονιδίου *ATG16L1*, το 87% (20/23) των ασθενών έφεραν σε ομοζυγωτία το αλληλόμορφο αναφοράς G (GG), ενώ το 13% (3/23) είχε γονότυπο AG. Στα υγιή άτομα το 72% (18/22) βρέθηκε ομόζυγο για το αλληλόμορφο G (GG), ενώ το 28% (7/22) ήταν ετερόζυγο (AG). Κανένα άτομο στις δύο ομάδες δεν έφερε σε ομοζυγωτία το αλληλόμορφο A. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2 η κατανομή των αλληλομόρφων είναι παρόμοια στις δύο εξεταζόμενες ομάδες (ασθενείς, υγιή άτομα) και η συσχέτιση που προέκυψε δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p>0,05$).



Διάγραμμα 2. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs78835907G>A του γονιδίου *ATG16L1* στις ομάδες των ασθενών και στα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου).

3.4 Συσχέτιση των κλινικών δεδομένων με τους πολυμορφισμούς rs8044820 και rs78835907 των γονιδίων *MAP1LC3B* και *ATG16L1*

Εξετάσαμε στη συνέχεια την πιθανή συσχέτιση των προαναφερόμενων πολυμορφισμών με τις κλινικές πληροφορίες που συλλέξαμε για τους ασθενείς. Στους Πίνακες 7 και 8 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα κλινικά δεδομένα σύμφωνα με το γονότυπο των ασθενών για τους πολυμορφισμούς rs8044820 και rs78835907.

Πίνακας 7. Τα κλινικά δεδομένα των ασθενών σε συνάρτηση με τον πολυμορφισμό rs8044820 του *MAP1LC3B* γονιδίου.

rs8044820	Ηλικία διάγνωσης (μέση τιμή ετών± τυπική απόκλιση)	Gleason score (%)		Μεταστάσεις (%)		Έτη από τη διάγνωση μέχρι την 1 ^η γραμμή θεραπείας (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)	Ανταπόκριση στην 1 ^η γραμμή θεραπείας (%)	Μήνες από την 1 ^η μέχρι τη 2 ^η θεραπεία (%)		Κατάληξη (%)	Αριθμός θεραπειών μέχρι την κατάληξη		Έτη από τη διάγνωση μέχρι την κατάληξη (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)
		≤7	>7	≤1	>1			≤6	>6		≤2	>2	
AA	65 ± 9.2	31,6 (6/19)	68,4 (13/19)	73,7 (14/19)	26,3 (5/19)	4 ± 3,9	73,7 (14/19)	33,3 (6/18)	66,7 (12/18)	94,7 (18/19)	44,4 (8/18)	55,6 (10/18)	8 ± 4,3
AG	74 ± 7.0	25 (1/4)	75 (3/4)	50 (2/4)	50 (2/4)	6 ± 5,6	100 (4/4)	0	100 (4/4)	50 (2/4)	50 (1/2)	50 (1/2)	8 ± 4,9

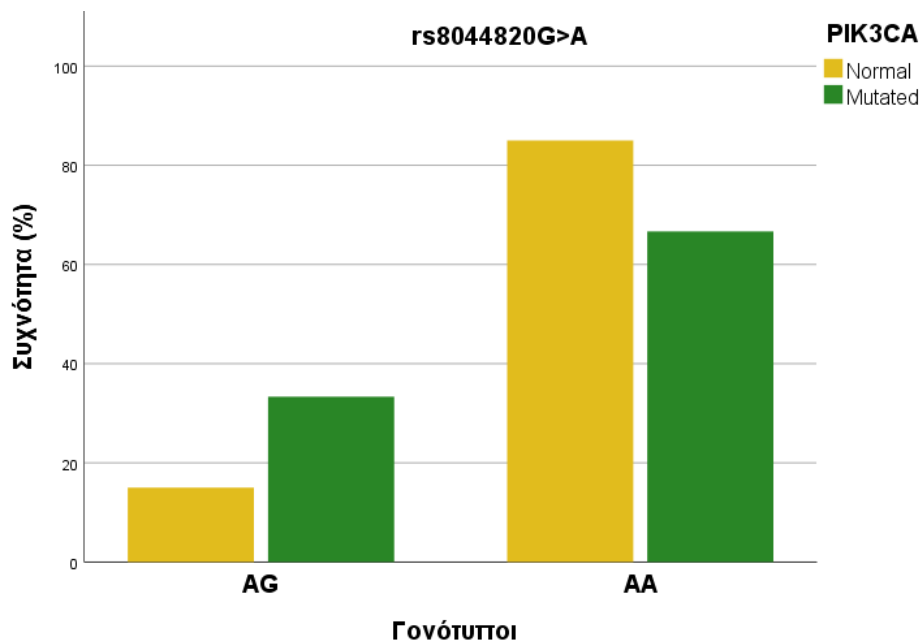
Πίνακας 8. Τα κλινικά δεδομένα των ασθενών σε συνάρτηση με τον πολυμορφισμό rs78835907 του *ATG16L1* γονιδίου.

rs78835907	Ηλικία διάγνωσης (μέση τιμή ετών± τυπική απόκλιση)	Gleason score (%)		Μεταστάσεις (%)		Έτη από τη διάγνωση μέχρι την 1 ^η γραμμή θεραπείας (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)	Ανταπόκριση στην 1 ^η γραμμή θεραπείας (%)	Μήνες από την 1 ^η μέχρι τη 2 ^η θεραπεία (%)		Κατάληξη (%)	Αριθμός θεραπειών μέχρι την κατάληξη		Έτη από τη διάγνωση μέχρι την κατάληξη (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)
		≤7	>7	≤1	>1			≤6	>6		≤2	>2	
GG	66 ± 9.3	35 (7/20)	65 (13/20)	70 (14/20)	30 (6/20)	4 ± 4,4	80 (16/20)	26,3 (5/19)	73,7 (14/19)	85 (17/20)	35,3 (8/17)	64,7 (9/17)	8 ± 4,5
AG	71 ± 10.4	0	100 (3/3)	66,7 (2/3)	33,3 (1/3)	5 ± 2,5	66,7 (2/3)	33,3 (1/3)	66,7 (2/3)	100 (3/3)	33,3 (1/3)	66,7 (2/3)	8 ± 3,1

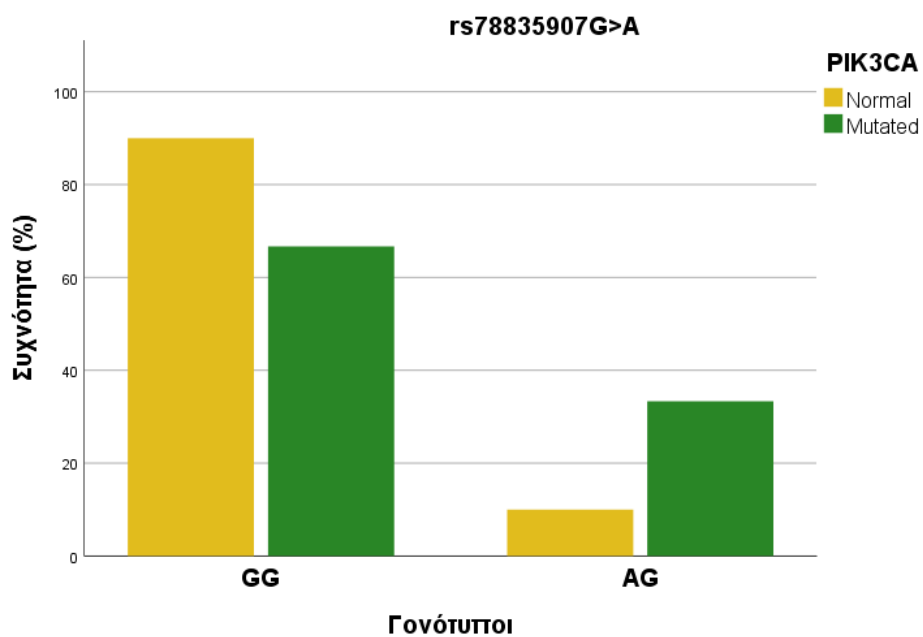
Δε αναδείχθηκε καμία στατιστικώς σημαντική σχέση, παρατηρήθηκε ωστόσο, μία τάση στη συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου AA στον πολυμορφισμό rs8044820 του γονιδίου *MAP1LC3B* και της θνησιμότητας στους ασθενείς (Fisher's Exact Test, $p = 0,067$). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 το 94,7% των ασθενών με το γονότυπο AA κατέληξε, ενώ με το γονότυπο AG κατέληξε μόλις το 50% των ασθενών, γεγονός που σημαίνει μεγαλύτερης διάρκειας επιβίωση για τους φορείς του πολυμορφισμού. Επίσης, μία τάση παρατηρήθηκε στη συσχέτιση της μέσης ηλικίας διάγνωσης του καρκίνου του προστάτη και των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs8044820. Η ηλικία διάγνωσης ήταν χαμηλότερη στους φορείς του γονοτύπου AA σε σύγκριση με τους φορείς των γονοτύπων AG ($t(21) = 1.891$, $p = 0.07$). Η μέση ηλικία στον γονότυπο AA ήταν $65 \pm 9,2$ έτη, ενώ στο γονότυπο AG ήταν $74 \pm 7,0$ έτη.

3.5 Συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* με τους πολυμορφισμούς rs8044820 και rs78835907 των γονιδίων *MAP1LC3B* και *ATG16L1*

Ένα ποσοστό ασθενών, της τάξης του 15% (3/20) που δεν έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *PIK3CA* και το 33,3% (1/3) των ασθενών που έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *PIK3CA*, βρέθηκε ετερόζυγο AG για τον πολυμορφισμό rs8044820G>A. Το 10% (2/20) των ασθενών που δεν έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *PIK3CA* και το 33,3% (1/3) των ασθενών που έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *PIK3CA*, βρέθηκε ετερόζυγο AG για τον πολυμορφισμό rs78835907G>A. Δεν προέκυψε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($p > 0.05$). Στα Διαγράμματα 3 και 4 φαίνονται οι κατανομές των γονοτύπων στα άτομα με μετάλλαξη και στα άτομα με φυσιολογικό *PIK3CA* αλληλόμορφο γονίδιο.



Διάγραμμα 3. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs8044820G>A του γονιδίου *MAP1LC3B* στα άτομα με φυσιολογικό και μεταλλαγμένο *PIK3CA* γονίδιο.



Διάγραμμα 4. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs78835907G>A του γονιδίου *ATG16L1* στα άτομα με φυσιολογικό και μεταλλαγμένο *PIK3CA* γονίδιο.

3.6 Κλινικά δεδομένα ασθενών που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* και ετεροζυγωτία στους πολυμορφισμούς rs8044820 και rs78835907 των γονιδίων *MAP1LC3B* και *ATG16L1*

Στον Πίνακα 9 που ακολουθεί, παρουσιάζονται συνοπτικά τα κλινικά δεδομένα για τους ασθενείς που έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *PIK3CA* (3/23) και είχαν σε ετεροζυγωτία τους δύο πολυμορφισμούς, rs8044820 (4/23) και rs78835907 (3/23).

Πίνακας 9. Κλινικά δεδομένα ασθενών που έφεραν μεταλλάξεις στο *PIK3CA* γονίδιο και είχαν σε ετεροζυγωτία στους πολυμορφισμούς rs8044820 και rs78835907.

Κωδικός ασθενούς	Μετάλλαξη PIK3CA	Γονότυπος rs8044820	Γονότυπος rs78835907	Ηλικία διάγνωσης	Gleason score	Γραμμές θεραπείας	Έτη από τη διάγνωση μέχρι την κατάληξη
1	OXI	AA	AG	78	9	2	5
5	NAI	AA	GG	83	10	1	3
8	OXI	AG	GG	77	9	2	4
11	OXI	AA	AG	59	9	3	9
12	NAI	AG	AG	76	9	3	11
15	OXI	AG	AA	80	9	3	εν ζωή
16	OXI	AG	AA	64	6	3	εν ζωή
17	NAI	AA	AA	54	9	2	2

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί παγκοσμίως μία κυρίαρχη κακοήθεια στο δυτικό κόσμο. Είναι ο δεύτερος συχνότερος καρκίνος στα άρρενα άτομα και κατέχει την πέμπτη θέση όσον αφορά στη θνησιμότητα. Το 98% των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη εμφανίζονται σε άτομα άνω των 50 ετών, αλλά όταν εμφανίζεται σε νεότερους άνδρες, το νόσημα τείνει να είναι πιο επιθετικό.

Πλήθος παραγόντων συνδέθηκαν με την παθογένειά του με σημαντικότερο από όλους την αύξηση της ηλικίας και φυλετικές διαφοροποιήσεις τόσο σε γενετικό όσο και επιγενετικό επίπεδο από επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως το κάπνισμα και η διατροφή [13,35,39,59]. Ο καρκίνος του προστάτη είναι σε μεγάλο ποσοστό κληρονομικός. Ένα ποσοστό της τάξης του 20% των ασθενών έχουν οικογενειακό ιστορικό, ενώ η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου διπλασιάζεται αν υπάρχει συγγενής πρώτου βαθμού με ιστορικό καρκίνου του προστάτη.

Ο ανδρογονικός υποδοχέας AR και τα ενδοκυττάρια μονοπάτια που σηματοδοτεί, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη. Σε αυτά τα δεδομένα βασίστηκε και η πρώτη θεραπεία στέρησης ανδρογόνων, με σκοπό την διακοπή της σηματοδότησης προς τον πυρήνα. Παράλληλα με την ανάπτυξη θεραπειών για τα προχωρημένα στάδια του όγκου, στους μεταστατικούς ευνοχοάντοχους ασθενείς με αρχική θεραπεία Docetaxel, ως τους νεότερους αντιανδρογονικούς αποκλειστές (Enzalutamide, Abirateron, Apalutamide, Darolutamide), μελετήθηκε πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών, οι τελεστές των οποίων φέρουν μεταλλάξεις και αναδιατάξεις, ή παρουσιάζουν γονιδιακή ενίσχυση. Επίσης μελετήθηκε εκτενώς, σε φάσης III πολυκεντρικές τυχαιοποιημένες μελέτες, ο ρόλος των γονιδίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA [BRCA1, BRCA2 (πιο συχνό), PALB2, CHEK2, CDK12). Οι οικογένειες ETS και MYC είναι εξέχουσες οικογένειες γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη. Με τα δεδομένα αυτά καταλήξαμε στη στόχευση γονιδίων που μετέχουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (αναστολείς PARP, Olaparib, talazoparib, rucaparib), σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια με επακόλουθο τη μη ομαλή λειτουργία του ομόλογου ανασυνδυασμού. Τα

αποτελέσματα έχουν θετικό πρόσημο και δείχνουν περιορισμό ως προς την εξέλιξη της νόσου, βιοχημική ανταπόκριση (πτώση των επιπέδων PSA) και απεικονιστική βελτίωση των μεταστατικών εστιών.

Μία από τις κύριες οδούς σηματοδότησης σε ποικίλους καρκίνους, μεταξύ αυτών και του καρκίνου του προστάτη, είναι η οδός PI3K/AKT/mTOR [73]. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, στον καρκίνο του προστάτη, το γονίδιο *PIK3CA* φέρει μεταλλάξεις ή ενίσχυση σε ποσοστά της τάξης των 5,5-11,5% γεγονός που συμφωνεί με τον πληθυσμό των ασθενών της δικής μας μελέτης, καθώς το 13% (3/23) έφερε μετάλλαξη στο γονίδιο *PIK3CA*. Από τους 3 ασθενείς που έφεραν μετάλλαξη κανείς δεν κατηγοριοποιήθηκε με Gleason score <7. Ένας ασθενής ανταποκρίθηκε στην πρώτη γραμμή θεραπείας, ενώ οι άλλοι 2 πέρασαν σε δεύτερη γραμμή θεραπείας σε λιγότερο από 6 μήνες, επομένως, δεν είχαν καλή ανταπόκριση στη θεραπεία πρώτης γραμμής και κανείς τους δεν επιβίωσε. Τα ευρήματα της μελέτης μας συμφωνούν με τα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία που υποστηρίζουν υψηλότερα GS και χειρότερη πρόγνωση σε όσους φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* [208,210].

Ο μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης του καρκίνου στα άτομα που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* ήταν 71 ± 15.1 έτη, ενώ στα άτομα με το φυσιολογικό γονίδιο ήταν 66 ± 8.6 έτη, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη σε φορείς μεταλλάξεων *PI3KCA* σε νεότερη ηλικία [208,210], όμως ο ένας από τους τρεις ασθενείς μας με μετάλλαξη *PI3KCA*, διαγνώστηκε στην ηλικία των 83 ετών και με πολλαπλές οστικές μεταστάσεις, πιθανά λόγω παραμελημένης διάγνωσης. Δεν ανταποκρίθηκε σε θεραπεία με νέας γενιάς ανδρογονικό αναστολέα και πέρασε γρήγορα σε επόμενη γραμμή θεραπείας, όπου του χορηγήθηκε χημειοθεραπεία -πήρε μόνο 4 μήνες ARSi που δεν πρόλαβε να λάβει και πέθανε εντός 3 ετών από τη διάγνωση και μόλις με 4 μήνες θεραπεία (GS=10). Οι άλλοι δύο ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο *PI3KCA* γονίδιο, διαγνώστηκαν στα 76 και 54 χρόνια τους. Ο νεότερος σε διάγνωση έζησε μόλις 2 χρόνια με τη νόσο και πήρε δύο γραμμές θεραπείας και ο τρίτος επιβίωσε 11 χρόνια και πήρε τρεις γραμμές θεραπείας. Ο τελευταίος ασθενής φέρει ταυτόχρονα μετάλλαξη στο *PI3KCA* γονίδιο και τον πολυμορφισμό rs8044820G>A. Ο συγκεκριμένος ασθενής έζησε 11 έτη, λαμβάνοντας τρεις γραμμές θεραπείας, αλλά όλες λιγότερο από

6 μήνες και καθυστέρησε να υποτροπιάσει (8 έτη μετά τη διάγνωση). Ωστόσο, δεν αναδείχθηκε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* και του συνόλου των κλινικών δεδομένων των ασθενών ($p>0,05$). Δεδομένου του χαμηλού ποσοστού εμφάνισης της μετάλλαξης (5%-11%), χρειάζεται να εξετασθεί μεγαλύτερος αριθμός ασθενών, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή στατιστικώς συμπεράσματα.

Όσον αφορά τους πολυμορφισμούς που εξετάσαμε, αναφέρονται σε γονίδια της αυτοφαγίας τα οποία συμμετέχουν στο στάδιο της ωρίμανσης του αυτοφαγοσώματος. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs8044820G>A του γονιδίου *MAP1LC3B*, το 82,6% (19/23) των ασθενών μας έφεραν σε ομοζυγωτία το συχνότερο αλληλόμορφο A (AA), ενώ μόλις το 17,4% (4/23) είχε γονότυπο AG. Παρομοίως, στα υγιή άτομα το 86,4% (19/22) είχε σε ομοζυγωτία το αλληλόμορφο A και το 13,6% (3/22) είχαν τον πολυμορφισμό σε ετεροζυγωτία (γονότυπος AG). Το αλληλόμορφο G δεν βρέθηκε σε ομοζυγωτία σε καμία από τις δύο ομάδες ατόμων που εξετάστηκαν.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs78835907G>A του γονιδίου *ATG16L1* το 87% (20/23) των ασθενών έφεραν σε ομοζυγωτία το αλληλόμορφο αναφοράς G (γονότυπος GG), ενώ το 13% (3/23) έφερε σε ετεροζυγωτία το αλληλόμορφο γονίδιο (γονότυπος AG). Στα υγιή άτομα το 72% (18/22) ήταν ομόζυγο για το αλληλόμορφο G (γονότυπος GG), ενώ το 28% (7/22) ήταν ετερόζυγο (γονότυπος AG). Και εδώ, το αλληλόμορφο A δεν βρέθηκε σε ομοζυγωτία σε καμία από τις δύο εξεταζόμενες ομάδες.

Τα ευρήματα μας συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία στον πολυμορφισμό rs8044820G>A του *MAP1LC3B* γονιδίου το επικρατές και συχνότερο αλληλόμορφο είναι το A, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs8044820>), ενώ για τον πολυμορφισμό rs78835907G>A του *ATG16L1* γονιδίου και στις δύο ομάδες το επικρατές αλληλόμορφο είναι το G (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs78835907>).

Ο σχετικά μικρός αριθμός ασθενών δεν επέτρεψε την ανάδειξη στατιστικώς σημαντικών συσχετίσεων. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο, ότι αναδείχθηκε μία τάση στη συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου AA στον πολυμορφισμό rs8044820G>A και της θνησιμότητας στους ασθενείς (Fisher's Exact Test, $p = 0,067$). Οι ασθενείς που έφεραν σε ετεροζυγωτία τον πολυμορφισμό rs8044820G>A, πήραν περισσότερες γραμμές θεραπείας και επιβίωσαν

περισσότερο μετά τη διάγνωσή τους. Πρόκειται για ασθενείς που πήραν περισσότερες από 2 γραμμές θεραπείας και οι δύο από αυτούς είναι ακόμη εν ζωή με ενεργό θεραπεία. Επιπρόσθετα, για τον πολυμορφισμό rs8044820 παρατηρήσαμε μία τάση συσχέτισης μεταξύ της μέσης ηλικίας διάγνωσης του καρκίνου του προστάτη και των γονοτύπων του πολυμορφισμού. Πιο συγκεκριμένα, οι φορείς του γονοτύπου AA είχαν μικρότερη ηλικία διάγνωσης σε σύγκριση με τους φορείς των γονοτύπων AG [$t(21) = 1.891, p = 0.07$]. Η μέση ηλικία στον γονότυπο AA ήταν $65 \pm 9,2$ έτη, ενώ στο γονότυπο AG ήταν $74 \pm 7,0$ έτη. Η τάση αυτή προσδίδει ενδεχομένως έναν προστατευτικό ρόλο στο αλληλόμορφο G, καθώς η παρουσία του σε ετεροζυγωτία φαίνεται να συνδέεται με καθυστερημένη διάγνωση και πιθανώς και έναρξη του καρκίνου του προστάτη.

Οι πολυμορφισμοί που εξετάσαμε δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένοι στη διεθνή βιβλιογραφία. Επιπρόσθετα, δεν υπάρχουν δεδομένα για αυτούς στον ελληνικό πληθυσμό και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Άλλωστε, ακόμη και στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν πρόσφατα και λιγοστά δεδομένα σχετικά με τα γονίδια της αυτοφαγίας και τον ρόλο τους στην ανάπτυξη και εξέλιξη διαφόρων τύπων καρκίνου. Η μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών θα οδηγούσε ενδεχομένως σε στατιστική σημαντικότητα και διαφώτιση του ρόλου του πολυμορφισμού rs8044820G>A, σε ασθενείς με καρκίνο προστάτη στον ελληνικό πληθυσμό. Άλλωστε, λαμβάνοντας υπόψη ότι η αυτοφαγία έχει πιθανώς διττό ρόλο και λειτουργεί διαφορετικά αναλόγως του τύπου του καρκίνου, χρειάζονται εκτενείς αναλύσεις των εμπλεκόμενων γονιδίων που μετέχουν στον μηχανισμό προκειμένου να διαλευκανθεί ο ακριβής της ρόλος στους διάφορους τύπους καρκίνου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μελέκος, Μ. *Σύγχρονη Ουρολογία*; 1η έκδοση.; Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 2005;
2. Laschkar, S.; Montagne, S.; De Kerviler, E.; Roupret, M.; Lucidarme, O.; Cussenot, O.; Penna, R.R. Zonal Anatomy of the Prostate Using Magnetic Resonance Imaging, Morphometrics, and Radiomic Features: Impact of Age-Related Changes. *Br. J. Radiol.* **2022**, *95*, doi:10.1259/bjr.20210156.
3. Aaron, L.T.; Franco, O.E.; Hayward, S.W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol. Clin. North Am.* **2016**, *43*, 279–288, doi:10.1016/j.ucl.2016.04.012.
4. Jiang, M.; Strand, D.W.; Franco, O.E.; Clark, P.E.; Hayward, S.W. PPAR γ : A Molecular Link between Systemic Metabolic Disease and Benign Prostate Hyperplasia. *Differentiation* **2011**, *82*, 220–236, doi:10.1016/j.diff.2011.05.008.
5. Taplin, M.E.; Ho, S.M. Clinical Review 134: The Endocrinology of Prostate Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86*, 3467–3477, doi:10.1210/jc.86.8.3467.
6. Sekhoacha, M.; Riet, K.; Motloun, P.; Gumenku, L.; Adegoke, A.; Mashele, S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules* **2022**, *27*, 1–33, doi:10.3390/molecules27175730.
7. Knudsen, B.S.; Vasioukhin, V. *Mechanisms of Prostate Cancer Initiation and Progression*; 1st ed.; Elsevier Inc, 2010; Vol. 109;.
8. Cuzick, J.; Thorat, M.A.; Andriole, G.; Brawley, O.W.; Brown, P.H.; Culig, Z.; Eeles, R.A.; Ford, L.G.; Hamdy, F.C.; Holmberg, L.; et al. Prevention and Early Detection of Prostate Cancer. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, e484–e492, doi:10.1016/S1470-2045(14)70211-6.
9. Jiang, Q.; Yeh, S.; Wang, X.; Xu, D.; Zhang, Q.; Wen, X.; Xia, S.; Chang, C. Targeting Androgen Receptor Leads to Suppression of Prostate Cancer via Induction of Autophagy. *J. Urol.* **2012**, *188*, 1361–1368, doi:10.1016/j.juro.2012.06.004.
10. Gao, W.; Bohl, C.E.; Dalton, J.T. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 3352–3370,

doi:10.1021/cr020456u.

11. Brody, H. *Prostate Cancer*; Bott, S.R., Lim Ng, K., Eds.; Exon Publications, 2021; Vol. 528; ISBN 9780645001754.
12. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2022: A Worldwide Overview for Prostate Cancer. *Int. J. Cancer* **2024**, *149*, 778–789, doi:10.1002/ijc.33588.
13. Merriel, S.W.D.; Funston, G.; Hamilton, W. Prostate Cancer in Primary Care. *Adv. Ther.* **2018**, *35*, 1285–1294, doi:10.1007/s12325-018-0766-1.
14. Harvey, C.J.; Pilcher, J.; Richenberg, J.; Patel, U.; Frauscher, F. Applications of Transrectal Ultrasound in Prostate Cancer. *Br. J. Radiol.* **2012**, *85*, 3–17, doi:10.1259/bjr/56357549.
15. Grossman, D.C.; Curry, S.J.; Owens, D.K.; Bibbins-Domingo, K.; Caughey, A.B.; Davidson, K.W.; Doubeni, C.A.; Ebell, M.; Epling, J.W.; Kemper, A.R.; et al. Screening for Prostate Cancer US Preventive Services task force recommendation Statement. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **2018**, *319*, 1901–1913, doi:10.1001/jama.2018.3710.
16. Yao, M.H.; Zou, L.L.; Wu, R.; Guo, L.H.; Xu, G.; Xie, J.; Li, P.; Wang, S. Transperineal Ultrasound-Guided 12-Core Prostate Biopsy: An Extended Approach to Diagnose Transition Zone Prostate Tumors. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–5, doi:10.1371/journal.pone.0089171.
17. Liu, Y.; Zhao, G.; Xu, Y.; Zhang, T.; Chen, Z.; Yan, G.; Tu, W.; Hu, Y.; Chen, Y.; He, X.; et al. Phase II Study of Adjuvant Chemoradiotherapy Using Docetaxel/Cisplatin/5-Fluorouracil before and after Intensity-Modulated Radiotherapy with Concurrent Docetaxel in Patients with Completely (R0) Resected Gastric Carcinoma. *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* **2018**, *41*, 619–625, doi:10.1097/COC.0000000000000373.
18. Calio, B.P.; Sidana, A.; Sugano, D.; Gaur, S.; Maruf, M.; Jain, A.L.; Merino, M.J.; Choyke, P.L.; Wood, B.J.; Pinto, P.A.; et al. Risk of Upgrading from Prostate Biopsy to Radical Prostatectomy Pathology—Does Saturation Biopsy of Index Lesion during Multiparametric Magnetic Resonance Imaging-Transrectal Ultrasound Fusion Biopsy Help? *J. Urol.* **2018**, *199*, 976–982, doi:10.1016/j.juro.2017.10.048.

19. Ahdoot, M.; Wilbur, A.R.; Reese, S.E.; Lebastchi, A.H.; Mehralivand, S.; Gomella, P.T.; Bloom, J.; Gurram, S.; Siddiqui, M.; Pinsky, P.; et al. MRI-Targeted, Systematic, and Combined Biopsy for Prostate Cancer Diagnosis. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 917–928, doi:10.1056/nejmoa1910038.
20. Pang, B.; Zhu, Y.; Ni, J.; Thompson, J.; Malouf, D.; Bucci, J.; Graham, P.; Li, Y. Extracellular Vesicles: The next Generation of Biomarkers for Liquid Biopsy-Based Prostate Cancer Diagnosis. *Theranostics* **2020**, *10*, 2309–2326, doi:10.7150/thno.39486.
21. Chang, L.; Ni, J.; Zhu, Y.; Pang, B.; Graham, P.; Zhang, H.; Li, Y. Liquid Biopsy in Ovarian Cancer: Recent Advances in Circulating Extracellular Vesicle Detection for Early Diagnosis and Monitoring Progression. *Theranostics* **2019**, *9*, 4130–4140, doi:10.7150/thno.34692.
22. Rawla, P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J. Oncol.* **2019**, *10*, 63–89, doi:10.14740/wjon1191.
23. American Cancer Society Prostate Cancer What Is Prostate Cancer ? *Am. Cancer Soc.* **2016**, *88*.
24. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2022: An Overview for Europe. *Int. J. Cancer* **2024**, *149*, 778–789, doi:10.1002/ijc.33588.
25. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
26. Rando, T.A. The Ins and Outs of Aging and Longevity. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**, *75*, 617–619, doi:10.1146/annurev-physiol-092712-103439.
27. Scardino, P.T.; Weaver, R.; Hudson, M.A. Early Detection of Prostate Cancer. *Hum. Pathol.* **1992**, *23*, 211–222, doi:10.1016/0046-8177(92)90102-9.
28. Rebbeck, T.R.; Devesa, S.S.; Chang, B.-L.; Bunker, C.H.; Cheng, I.; Cooney, K.; Eeles, R.; Fernandez, P.; Giri, V.N.; Gueye, S.M.; et al. Global Patterns of Prostate Cancer Incidence, Aggressiveness, and Mortality in Men of African Descent. *Prostate Cancer* **2013**, *2013*, 1–12, doi:10.1155/2013/560857.
29. Cassell, A.; Yunusa, B.; Jalloh, M.; Mbodji, M.M.; Diallo, A.; Ndoeye, M.;

- Kouka, S.C.; Labou, I.; Niang, L.; Gueye, S.M. A Review of Localized Prostate Cancer: An African Perspective. *World J. Oncol.* **2019**, *10*, 162–168, doi:10.14740/wjon1221.
30. Amundadottir, L.T.; Sulem, P.; Gudmundsson, J.; Helgason, A.; Baker, A.; Agnarsson, B.A.; Sigurdsson, A.; Benediktsdottir, K.R.; Cazier, J.B.; Sainz, J.; et al. A Common Variant Associated with Prostate Cancer in European and African Populations. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 652–658, doi:10.1038/ng1808.
 31. Freedman, M.L.; Haiman, C.A.; Patterson, N.; McDonald, G.J.; Tandon, A.; Waliszewska, A.; Penney, K.; Steen, R.G.; Ardlie, K.; John, E.M.; et al. Admixture Mapping Identifies 8q24 as a Prostate Cancer Risk Locus in African-American Men. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 14068–14073, doi:10.1073/pnas.0605832103.
 32. Taioli, E.; Sears, V.; Watson, A.; Flores-Obando, R.E.; Jackson, M.D.; Ukoli, F.A.; De Syllos Cõlus, I.M.; Fernandez, P.; McFarlane-Anderson, N.; Ostrander, E.A.; et al. Polymorphisms in CYP17 and CYP3A4 and Prostate Cancer in Men of African Descent. *Prostate* **2013**, *73*, 668–676, doi:10.1002/pros.22612.
 33. Down, L.; Barlow, M.; Bailey, S.E.R.; Mounce, L.T.A.; Merriel, S.W.D.; Watson, J.; Martins, T. Association between Patient Ethnicity and Prostate Cancer Diagnosis Following a Prostate-Specific Antigen Test: A Cohort Study of 730,000 Men in Primary Care in the UK. *BMC Med.* **2024**, *22*, 1–10, doi:10.1186/s12916-024-03283-5.
 34. Wu, I.; Modlin, C.S. Disparities in Prostate Cancer in African American Men: What Primary Care Physicians Can Do. *Cleve. Clin. J. Med.* **2012**, *79*, 313–320, doi:10.3949/ccjm.79a.11001.
 35. Okobia, M.N.; Zmuda, J.M.; Ferrell, R.E.; Patrick, A.L.; Bunker, C.H. Chromosome 8q24 Variants Are Associated with Prostate Cancer Risk in a High Risk Population of African Ancestry. *Prostate* **2011**, *71*, 1054–1063, doi:10.1002/pros.21320.
 36. Koga, Y.; Song, H.; Chalmers, Z.R.; Newberg, J.; Kim, E.; Carrot-Zhang, J.; Piou, D.; Polak, P.; Abdulkadir, S.A.; Ziv, E.; et al. Genomic Profiling of Prostate Cancers from Men with African and European Ancestry. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 4651–4660, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-

- 4112.
37. Shin, S.; Saito, E.; Sawada, N.; Ishihara, J.; Takachi, R.; Nanri, A.; Shimazu, T.; Yamaji, T.; Iwasaki, M.; Sasazuki, S.; et al. Dietary Patterns and Prostate Cancer Risk in Japanese: The Japan Public Health Center-Based Prospective Study (JPHC Study). *Cancer Causes Control* **2018**, *29*, 589–600, doi:10.1007/s10552-018-1030-3.
 38. Bagheri, A.; Nachvak, S.M.; Rezaei, M.; Moravridzade, M.; Moradi, M.; Nelson, M. Dietary Patterns and Risk of Prostate Cancer: A Factor Analysis Study in a Sample of Iranian Men. *Heal. Promot. Perspect.* **2018**, *8*, 133–138, doi:10.15171/hpp.2018.17.
 39. Askari, F.; Parizi, M.K.; Jessri, M.; Rashidkhani, B. Fruit and Vegetable Intake in Relation to Prostate Cancer in Iranian Men: A Case-Control Study. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 5223–5227, doi:10.7314/APJCP.2014.15.13.5223.
 40. Niclis, C.; Román, M.D.; Osella, A.R.; Eynard, A.R.; Díaz, M.D.P. Traditional Dietary Pattern Increases Risk of Prostate Cancer in Argentina: Results of a Multilevel Modeling and Bias Analysis from a Case-Control Study. *J. Cancer Epidemiol.* **2015**, *2015*, doi:10.1155/2015/179562.
 41. Richman, E.L.; Kenfield, S.A.; Stampfer, M.J.; Giovannucci, E.L.; Zeisel, S.H.; Willett, W.C.; Chan, J.M. Choline Intake and Risk of Lethal Prostate Cancer: Incidence and Survival. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 855–863, doi:10.3945/ajcn.112.039784.
 42. Sinha, R.; Park, Y.; Graubard, B.I.; Leitzmann, M.F.; Hollenbeck, A.; Schatzkin, A.; Cross, A.J. Meat and Meat-Related Compounds and Risk of Prostate Cancer in a Large Prospective Cohort Study in the United States. *Am. J. Epidemiol.* **2009**, *170*, 1165–1177, doi:10.1093/aje/kwp280.
 43. Aune, D.; Navarro Rosenblatt, D.A.; Chan, D.S.M.; Vieira, A.R.; Vieira, R.; Greenwood, D.C.; Vatten, L.J.; Norat, T. Dairy Products, Calcium, and Prostate Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *101*, 87–117, doi:10.3945/ajcn.113.067157.
 44. Chavarro, J.E.; Stampfer, M.J.; Li, H.; Campos, H.; Kurth, T.; Ma, J. A

- Prospective Study of Polyunsaturated Fatty Acid Levels in Blood and Prostate Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2007**, *16*, 1364–1370, doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-1033.
45. Szymanski, K.M.; Wheeler, D.C.; Mucci, L.A. Fish Consumption and Prostate Cancer Risk: A Review and Meta-Analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *92*, 1223–1233, doi:10.3945/ajcn.2010.29530.
 46. Yan, L.; Spitznagel, E.L. Soy Consumption and Prostate Cancer Risk in Men: A Revisit of a Meta-Analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1155–1163, doi:10.3945/ajcn.2008.27029.
 47. Higdon, J. V.; Delage, B.; Williams, D.E.; Dashwood, R.H. Cruciferous Vegetables and Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and Mechanistic Basis. *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 224–236, doi:10.1016/j.phrs.2007.01.009.
 48. Kurahashi, N.; Sasazuki, S.; Iwasaki, M.; Inoue, M. Green Tea Consumption and Prostate Cancer Risk in Japanese Men: A Prospective Study. *Am. J. Epidemiol.* **2008**, *167*, 71–77, doi:10.1093/aje/kwm249.
 49. Wilson, K.M.; Kasperzyk, J.L.; Rider, J.R.; Kenfield, S.; Van Dam, R.M.; Stampfer, M.J.; Giovannucci, E.; Mucci, L.A. Coffee Consumption and Prostate Cancer Risk and Progression in the Health Professionals Follow-up Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **2011**, *103*, 876–884, doi:10.1093/jnci/djr151.
 50. Husby, A.; Wohlfahrt, J.; Melbye, M. Vasectomy and Prostate Cancer Risk: A 38-Year Nationwide Cohort Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **2020**, *112*, 71–77, doi:10.1093/jnci/djz099.
 51. Xu, Y.; Li, L.; Yang, W.; Zhang, K.; Ma, K.; Xie, H.; Zhou, J.; Cai, L.; Gong, Y.; Zhang, Z.; et al. Association between Vasectomy and Risk of Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2021**, *24*, 962–975, doi:10.1038/s41391-021-00368-7.
 52. Jaratlerdsiri, W.; Jiang, J.; Gong, T.; Patrick, S.M.; Willet, C.; Chew, T.; Lyons, R.J.; Haynes, A.M.; Pasqualim, G.; Louw, M.; et al. African-Specific Molecular Taxonomy of Prostate Cancer. *Nature* **2022**, *609*, 552–559, doi:10.1038/s41586-022-05154-6.
 53. Matejcic, M.; Patel, Y.; Lilyquist, J.; Hu, C.; Lee, K.Y.; Gnanaolivu, R.D.; Hart, S.N.; Polley, E.C.; Yadav, S.; Boddicker, N.J.; et al. Pathogenic

- Variants in Cancer Predisposition Genes and Prostate Cancer Risk in Men of African Ancestry. *JCO Precis. Oncol.* **2020**, 32–43, doi:10.1200/PO.19.00179.
54. Ambrosini, G.L.; Fritschi, L.; de Klerk, N.H.; Mackerras, D.; Leavy, J. Dietary Patterns Identified Using Factor Analysis and Prostate Cancer Risk: A Case Control Study in Western Australia. *Ann. Epidemiol.* **2008**, *18*, 364–370, doi:10.1016/j.annepidem.2007.11.010.
 55. Freitas, M.; Alves, V.; Sarmento-Ribeiro, A.; Mota-Pinto, A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons May Contribute for Prostate Cancer Progression. *J. Cancer Ther.* **2013**, *04*, 37–46, doi:10.4236/jct.2013.44a005.
 56. Doat, S.; Marous, M.; Rebillard, X.; Trétarre, B.; Lamy, P.J.; Soares, P.; Delbos, O.; Thuret, R.; Segui, B.; Cénée, S.; et al. Prostatitis, Other Genitourinary Infections and Prostate Cancer Risk: Influence of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs? Results from the EPICAP Study. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 1644–1651, doi:10.1002/ijc.31565.
 57. De Marzo, A.M.; Platz, E.A.; Sutcliffe, S.; Xu, J.; Grönberg, H.; Drake, C.G.; Nakai, Y.; Isaacs, W.B.; Nelson, W.G. Inflammation in Prostate Carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 256–269, doi:10.1038/nrc2090.
 58. Vietri, M.T.; D’elia, G.; Caliendo, G.; Resse, M.; Casamassimi, A.; Passariello, L.; Albanese, L.; Cioffi, M.; Molinari, A.M. Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22073753.
 59. Athie, A.; Arce-Gallego, S.; Gonzalez, M.; Morales-Barrera, R.; Suarez, C.; Casals Galobart, T.; Hernandez Viedma, G.; Carles, J.; Mateo, J. Targeting DNA Repair Defects for Precision Medicine in Prostate Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* **2019**, *21*, doi:10.1007/s11912-019-0790-6.
 60. Pilarski, R. The Role of BRCA Testing in Hereditary Pancreatic and Prostate Cancer Families. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* **2019**, 79–86, doi:10.1200/edbk_238977.
 61. Zheng, Q.F.; Ying, Q.; Ren, Z.J.; Zhang, Q.; Lu, D.L.; Wang, H.B.; Wei, W.R. First-Degree Family History of Prostate Cancer Is Associated the Risk of Breast Cancer and Ovarian Cancer. *Med. (United States)* **2021**, *100*, 1–13, doi:10.1097/MD.00000000000023816.

62. Castro, E.; Goh, C.L.; Eeles, R.A. Prostate Cancer Screening in BRCA and Lynch Syndrome Mutation Carriers . *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* **2013**, e50–e55, doi:10.14694/edbook_am.2013.33.e50.
63. Vietri, M.T.; Caliendo, G.; Schiano, C.; Casamassimi, A.; Molinari, A.M.; Napoli, C.; Cioffi, M. Analysis of PALB2 in a Cohort of Italian Breast Cancer Patients: Identification of a Novel PALB2 Truncating Mutation. *Fam. Cancer* **2015**, *14*, 341–348, doi:10.1007/s10689-015-9786-z.
64. Nicolosi, P.; Ledet, E.; Yang, S.; Michalski, S.; Freschi, B.; O’Leary, E.; Esplin, E.D.; Nussbaum, R.L.; Sartor, O. Prevalence of Germline Variants in Prostate Cancer and Implications for Current Genetic Testing Guidelines. *JAMA Oncol.* **2019**, *5*, 523–528, doi:10.1001/jamaoncol.2018.6760.
65. Pritchard, C.C.; Mateo, J.; Walsh, M.F.; De Sarkar, N.; Abida, W.; Beltran, H.; Garofalo, A.; Gulati, R.; Carreira, S.; Eeles, R.; et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 443–453, doi:10.1056/nejmoa1603144.
66. Nanda, N.; Roberts, N.J. ATM Serine/Threonine Kinase and Its Role in Pancreatic Risk. *Genes (Basel)*. **2020**, *11*, 108, doi:10.3390/genes11010108.
67. Heidegger, I.; Tsaur, I.; Borgmann, H.; Surcel, C.; Kretschmer, A.; Mathieu, R.; Visschere, P. De; Valerio, M.; van den Bergh, R.C.N.; Ost, P.; et al. Hereditary Prostate Cancer – Primetime for Genetic Testing? *Cancer Treat. Rev.* **2019**, *81*, 101927, doi:10.1016/j.ctrv.2019.101927.
68. Zhen, J.T.; Syed, J.; Nguyen, K.A.; Leapman, M.S.; Agarwal, N.; Brierley, K.; Llor, X.; Hofstatter, E.; Shuch, B. Genetic Testing for Hereditary Prostate Cancer: Current Status and Limitations. *Cancer* **2018**, *124*, 3105–3117, doi:10.1002/cncr.31316.
69. Antao, A.M.; Ramakrishna, S.; Kim, K.S. The Role of Nkx3.1 in Cancers and StemnessAntao, A. M., Ramakrishna, S., & Kim, K. S. (2021). The Role of Nkx3.1 in Cancers and Stemness. *International Journal of Stem Cells*, *14*(2), 168–179. <https://doi.org/10.15283/ijsc20121>. *Int. J. Stem Cells* **2021**, *14*, 168–179, doi:10.15283/ijsc20121.
70. Singh, K.B.; Hahm, E.R.; Kim, S.H.; Wendell, S.G.; Singh, S. V. A Novel Metabolic Function of Myc in Regulation of Fatty Acid Synthesis in

- Prostate Cancer. *Oncogene* **2021**, 40, 592–602, doi:10.1038/s41388-020-01553-z.
71. Bai, S.; Cao, S.; Jin, L.; Kobelski, M.; Schouest, B.; Wang, X.; Ungerleider, N.; Baddoo, M.; Zhang, W.; Corey, E.; et al. A Positive Role of C-Myc in Regulating Androgen Receptor and Its Splice Variants in Prostate Cancer. *Oncogene* **2019**, 38, 4977–4989, doi:10.1038/s41388-019-0768-8.
 72. Abdulkadir, S.A.; Magee, J.A.; Peters, T.J.; Kaleem, Z.; Naughton, C.K.; Humphrey, P.A.; Milbrandt, J. Conditional Loss of Nkx3.1 in Adult Mice Induces Prostatic Intraepithelial Neoplasia . *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22, 1495–1503, doi:10.1128/mcb.22.5.1495-1503.2002.
 73. Abate-Shen, C.; Shen, M.M.; Gelmann, E. Integrating Differentiation and Cancer: The Nkx3.1 Homeobox Gene in Prostate Organogenesis and Carcinogenesis. *Differentiation* **2008**, 76, 717–727, doi:10.1111/j.1432-0436.2008.00292.x.
 74. Beaulieu, M.E.; Castillo, F.; Soucek, L. Structural and Biophysical Insights into the Function of the Intrinsically Disordered Myc Oncoprotein. *Cells* **2020**, 9, 1–27, doi:10.3390/cells9041038.
 75. Dong, H.; Hu, J.; Wang, L.; Qi, M.; Lu, N.; Tan, X.; Yang, M.; Bai, X.; Zhan, X.; Han, B. SOX4 Is Activated by C-MYC in Prostate Cancer. *Med. Oncol.* **2019**, 36, 1–11, doi:10.1007/s12032-019-1317-6.
 76. Jamaspishvili, T.; Berman, D.M.; Ross, A.E.; Scher, H.I.; De Marzo, A.M.; Squire, J.A.; Lotan, T.L. Clinical Implications of PTEN Loss in Prostate Cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2018**, 15, 222–234, doi:10.1038/nrurol.2018.9.
 77. Turnham, D.J.; Bullock, N.; Dass, M.S.; Staffurth, J.N.; Pearson, H.B. The PTEN Conundrum: How to Target PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cells* **2020**, 9, doi:10.3390/cells9112342.
 78. Hollenhorst, P.C.; McIntosh, L.P.; Graves, B.J. Genomic and Biochemical Insights into the Specificity of ETS Transcription Factors. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, 80, 437–471, doi:10.1146/annurev.biochem.79.081507.103945.
 79. Lin, C.; Salzillo, T.C.; Bader, D.A.; Wilkenfeld, S.R.; Awad, D.; Pulliam, T.L.; Dutta, P.; Pudukalakatti, S.; Titus, M.; McGuire, S.E.; et al. *Prostate Cancer Energetics and Biosynthesis*; 2019; Vol. 1210; ISBN

- 9783030326555.
80. Chen, Y.; Chi, P.; Rockowitz, S.; Iaquinta, P.J.; Shamu, T.; Shukla, S.; Gao, D.; Sirota, I.; Carver, B.S.; Wongvipat, J.; et al. ETS Factors Reprogram the Androgen Receptor Cistrome and Prime Prostate Tumorigenesis in Response to PTEN Loss. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1023–1029, doi:10.1038/nm.3216.
 81. Higgins, J.; Brogley, M.; Palanisamy, N.; Mehra, R.; Ittmann, M.M.; Li, J.Z.; Tomlins, S.A.; Robins, D.M. Interaction of the Androgen Receptor, ETV1, and PTEN Pathways in Mouse Prostate Varies with Pathological Stage and Predicts Cancer Progression. *Horm. Cancer* **2015**, *6*, 67–86, doi:10.1007/s12672-014-0215-9.
 82. Bretones, G.; Delgado, M.D.; León, J. Myc and Cell Cycle Control. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **2015**, *1849*, 506–516, doi:10.1016/j.bbagr.2014.03.013.
 83. Khemlina, G.; Ikeda, S.; Kurzrock, R. Molecular Landscape of Prostate Cancer: Implications for Current Clinical Trials. *Cancer Treat. Rev.* **2015**, *41*, 761–766, doi:10.1016/j.ctrv.2015.07.001.
 84. Nguyen, L.; Papenhausen, P.; Shao, H. The Role of C-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes (Basel)*. **2017**, *8*, 2–22, doi:10.3390/genes8040116.
 85. Cooper, G.M.; Adams, K. *The Cell: A Molecular Approach*; Oxford University Press, 2022; ISBN 9780197583722.
 86. Hamid, A.A.; Gray, K.P.; Shaw, G.; Macconail, L.E.; Evan, C.; Bernard, B.; Loda, M.; Corcoran, N.M.; Allen, E.M. Van; Choudhury, A.D.; et al. Compound Genomic Alterations of TP53 , PTEN , and RB1 Tumor Suppressors in Localized and Metastatic Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2018**, 1–9, doi:10.1016/j.eururo.2018.11.045.
 87. Taylor, B.S.; Schultz, N.; Hieronymus, H.; Gopalan, A.; Xiao, Y.; Carver, B.S.; Arora, V.K.; Kaushik, P.; Cerami, E.; Reva, B.; et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell* **2010**, *18*, 11–22, doi:10.1016/j.ccr.2010.05.026.
 88. Reznik, E.; Chatila, W.K.; Chakravarty, D.; Han, G.C. The Long Tail of Oncogenic Drivers in Prostate Cancer. **2018**, *50*, 645–651, doi:10.1038/s41588-018-0078-z.

89. Hall, M.C.; Navone, N.M.; Troncoso, P. FREQUENCY AND CHARACTERIZATION OF P53 MUTATIONS IN CLINICALLY LOCALIZED PROSTATE CANCER. **1995**, *45*, doi:10.1016/s0090-4295(99)80018-1.
90. Nientiedt, C.; D, M.; Endris, V.; Ph, D.; Jenzer, M.; D, M.; Mansour, J.; D, M.; Tawanaie, N.; Sedehi, P.; et al. High Prevalence of DNA Damage Repair Gene Defects and TP53 Alterations in Metastatic Prostate Cancer – Results from in Men with Treatment-Naïve a Prospective Pilot Study Using a 37 Gene Panel. **2020**, *38*, doi:10.1016/j.urolonc.2020.03.001.
91. Mateo, J.; Carreira, S.; Bono, J.S. De; Mateo, J.; Seed, G.; Bertan, C.; Rescigno, P.; Dolling, D.; Figueiredo, I.; Miranda, S.; et al. Genomics of Lethal Prostate Cancer at Diagnosis and Castration Resistance Genomics of Lethal Prostate Cancer at Diagnosis and Castration Resistance. **2020**, *130*, 1743–1751.
92. Acevo-rodríguez, P.S.; Maldonado, G.; Castro-obregón, S. Autophagy Regulation by the Translation Machinery and Its Implications in Cancer. **2020**, *10*, 1–17, doi:10.3389/fonc.2020.00322.
93. Berry, J.L.; Polski, A.; Cavenee, W.K.; Dryja, T.P.; Murphree, A.L.; Gallie, B.L. The RB1 Story: Characterization and Cloning of the First Tumor Suppressor Gene. **2019**.
94. Zhang, L.; Goodrich, D.W. RB1 , Cancer Lineage Plasticity , and Therapeutic Resistance. **2022**, 201–221.
95. Ku, S.Y.; Rosario, S.; Wang, Y.; Mu, P.; Seshadri, M.; Goodrich, Z.W.; Goodrich, M.M.; Labbé, D.P.; Gomez, E.C.; Wang, J.; et al. Rb1 and Trp53 Cooperate to Suppress Prostate Cancer Lineage Plasticity, Metastasis, and Antiandrogen Resistance. **2017**.
96. Laudato, S.; Aparicio, A.; Giancotti, F.G. Clonal Evolution and Epithelial Plasticity in the Emergence of AR-Independent Prostate Carcinoma. **2020**, *5*, 440–455, doi:10.1016/j.trecan.2019.05.008.
97. Wise, H.M.; Hermida, M.A.; Leslie, N.R. Prostate Cancer , PI3K , PTEN and Prognosis. **2017**, 197–210, doi:10.1042/CS20160026.
98. Song, M.S.; Salmena, L.; Pandolfi, P.P. The Functions and Regulation of the PTEN Tumour Suppressor. *Nat. Publ. Gr.* **2012**, *13*, 283–296,

- doi:10.1038/nrm3330.
99. Crumbaker, M.; Khoja, L.; Joshua, A.M. AR Signaling and the PI3K Pathway in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. **2017**, *9*, 1–15, doi:10.3390/cancers9040034.
 100. Gao, T.; Furnari, F.; Newton, A.C. PHLPP: A Phosphatase That Directly Dephosphorylates Akt, Promotes Apoptosis, and Suppresses Tumor Growth. *Mol. Cell* **2005**, *18*, 13–24, doi:10.1016/j.molcel.2005.03.008.
 101. Zarif, J.C.; Miranti, C.K. The Importance of Non-Nuclear AR Signaling in Prostate Cancer Progression and Therapeutic Resistance. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 348–356, doi:10.1016/j.cellsig.2016.01.013.
 102. Kinter, K.J.; Amraei, R.; Anekar, A.A. *Biochemistry, Dihydrotestosterone*; 2025;
 103. Formaggio, N.; Rubin, M.A.; Theurillat, J.P. Loss and Revival of Androgen Receptor Signaling in Advanced Prostate Cancer. *Oncogene* **2021**, *40*, 1205–1216, doi:10.1038/s41388-020-01598-0.
 104. Taylor, R.A.; Fraser, M.; Rebello, R.J.; Boutros, P.C.; Murphy, D.G.; Bristow, R.G.; Risbridger, G.P. The Influence of BRCA2 Mutation on Localized Prostate Cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2019**, *16*, 281–290, doi:10.1038/s41585-019-0164-8.
 105. Lord, C.J.; Ashworth, A. BRCAness Revisited. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 110–120, doi:10.1038/nrc.2015.21.
 106. van Wilpe, S.; Tolmeijer, S.H.; Koornstra, R.H.T.; de Vries, I.J.M.; Gerritsen, W.R.; Ligtenberg, M.; Mehra, N. Homologous Recombination Repair Deficiency and Implications for Tumor Immunogenicity. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 1–19, doi:10.3390/cancers13092249.
 107. Blazek, D.; Kohoutek, J.; Bartholomeeusen, K.; Johansen, E.; Hulinkova, P.; Luo, Z.; Cimermanic, P.; Ule, J.; Peterlin, B.M. The Cyclin K/Cdk12 Complex Maintains Genomic Stability via Regulation of Expression of DNA Damage Response Genes. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2158–2172, doi:10.1101/gad.16962311.
 108. Ekumi, K.M.; Paculova, H.; Lenasi, T.; Pospichalova, V.; Bösken, C.A.; Rybarikova, J.; Bryja, V.; Geyer, M.; Blazek, D.; Barboric, M. Ovarian Carcinoma CDK12 Mutations Misregulate Expression of DNA Repair Genes via Deficient Formation and Function of the Cdk12/CycK

- Complex. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 2575–2589, doi:10.1093/nar/gkv101.
109. Joshi, P.M.; Sutor, S.L.; Huntoon, C.J.; Karnitz, L.M. Ovarian Cancer-Associated Mutations Disable Catalytic Activity of CDK12, a Kinase That Promotes Homologous Recombination Repair and Resistance to Cisplatin and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 9247–9253, doi:10.1074/jbc.M114.551143.
 110. Falck, J.; Mailand, N.; Syljuåsen, R.G.; Bartek, J.; Lukas, J. The ATM–Chk2–Cdc25A Checkpoint Pathway Guards against Radioresistant DNA Synthesis. *Nature* **2001**, *410*, 842–847, doi:10.1038/35071124.
 111. Wagener, R.; Walter, C.; Auer, F.; Alzoubi, D.; Hauer, J.; Fischer, U.; Varghese, J.; Dugas, M.; Borkhardt, A.; Brozou, T. The CHK2 Kinase Is Recurrently Mutated and Functionally Impaired in the Germline of Pediatric Cancer Patients. *Int. J. Cancer* **2023**, *152*, 1388–1398, doi:10.1002/ijc.34390.
 112. Zannini, L.; Delia, D.; Buscemi, G. CHK2 Kinase in the DNA Damage Response and Beyond. *J. Mol. Cell Biol.* **2014**, *6*, 442–457, doi:10.1093/jmcb/mju045.
 113. Bahassi, E.M.; Ovesen, J.L.; Riesenber, A.L.; Bernstein, W.Z.; Hasty, P.E.; Stambrook, P.J. The Checkpoint Kinases Chk1 and Chk2 Regulate the Functional Associations between HBRCA2 and Rad51 in Response to DNA Damage. *Oncogene* **2008**, *27*, 3977–3985, doi:10.1038/onc.2008.17.
 114. Tan, Y.; Raychaudhuri, P.; Costa, R.H. Chk2 Mediates Stabilization of the FoxM1 Transcription Factor To Stimulate Expression of DNA Repair Genes. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 1007–1016, doi:10.1128/mcb.01068-06.
 115. Ta, H.Q.; Ivey, M.L.; Frierson, H.F.; Conaway, M.R.; Dziegielews, J.; Larner, J.M.; Gioeli, D. Checkpoint Kinase 2 Negatively Regulates Androgen Sensitivity and Prostate Cancer Cell Growth. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 5093–5105, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0224.
 116. Grignon, D.J. Unusual Subtypes of Prostate Cancer. *Mod. Pathol.* **2004**, *17*, 316–327, doi:10.1038/modpathol.3800052.
 117. Kalluri, R. The Biology and Function of Fibroblasts in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 582–598, doi:10.1038/nrc.2016.73.

118. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 178–196, doi:10.1038/nrm3758.
119. Body, J.J.; Casimiro, S.; Costa, L. Targeting Bone Metastases in Prostate Cancer: Improving Clinical Outcome. *Nat. Rev. Urol.* **2015**, *12*, 340–356, doi:10.1038/nrurol.2015.90.
120. Chen, N.; Zhou, Q. The Evolving Gleason Grading System. *Chinese J. Cancer Res.* **2016**, *28*, 58–64, doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.04.
121. Fine, S.W.; Al-Ahmadie, H.A.; Chen, Y.-B.; Gopalan, A.; Tickoo, S.K.; Reuter, V.E. Comedonecrosis Revisited: Strong Association With Intraductal Carcinoma of the Prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* **2018**, *42*, 1036–1041.
122. Chatterjee, N.; Walker, G.C. Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **2017**, *58*, 235–263, doi:10.1002/em.22087.
123. Fleck, O.; Nielsen, O. DNA Repair. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 515–517, doi:10.1242/jcs.00952.
124. Lahtz, C.; Pfeifer, G.P. Epigenetic Changes of DNA Repair Genes in Cancer. *J. Mol. Cell Biol.* **2011**, *3*, 51–58, doi:10.1093/jmcb/mjq053.
125. Deng, N.; Zhou, H.; Fan, H.; Yuan, Y. Single Nucleotide Polymorphisms and Cancer Susceptibility. *Oncotarget* **2017**, *8*, 110635–110649, doi:10.18632/oncotarget.22372.
126. Robert, F.; Pelletier, J. Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 1–11, doi:10.3389/fgene.2018.00507.
127. Fan, R.; Kumaravel, T.S.; Jalali, F.; Marrano, P.; Squire, J.A.; Bristow, R.G. Defective DNA Strand Break Repair after DNA Damage in Prostate Cancer Cells: Implications for Genetic Instability and Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8526–8533, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1601.
128. Ashrafizadeh, M.; Paskeh, M.D.A.; Mirzaei, S.; Gholami, M.H.; Zarrabi, A.; Hashemi, F.; Hushmandi, K.; Hashemi, M.; Nabavi, N.; Crea, F.; et al. Targeting Autophagy in Prostate Cancer: Preclinical and Clinical Evidence for Therapeutic Response. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*,

- 1–37, doi:10.1186/s13046-022-02293-6.
129. Zhang, J.; Ahn, K.S.; Kim, C.; Shanmugam, M.K.; Siveen, K.S.; Arfuso, F.; Samym, R.P.; Deivasigamaniam, A.; Lim, L.H.K.; Wang, L.; et al. Nimbolide-Induced Oxidative Stress Abrogates STAT3 Signaling Cascade and Inhibits Tumor Growth in Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate Model. *Antioxid. Redox Signal.* **2016**, *24*, 575–589, doi:10.1089/ars.2015.6418.
 130. Liu, Y.; Xu, X.; Lin, P.; He, Y.; Zhang, Y.; Cao, B.; Zhang, Z.; Sethi, G.; Liu, J.; Zhou, X.; et al. Inhibition of the Deubiquitinase USP9x Induces Pre-B Cell Homeobox 1 (PBX1) Degradation and Thereby Stimulates Prostate Cancer Cell Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 4572–4582, doi:10.1074/jbc.RA118.006057.
 131. Ge, R.; Wang, Z.; Montironi, R.; Jiang, Z.; Cheng, M.; Santoni, M.; Huang, K.; Massari, F.; Lu, X.; Cimadamore, A.; et al. Epigenetic Modulations and Lineage Plasticity in Advanced Prostate Cancer. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 470–479, doi:10.1016/j.annonc.2020.02.002.
 132. *Molecular Genetic Pathology*; Cheng, L., Zhang, D.Y., Eble, J.N., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2013; ISBN 978-1-4614-4799-3.
 133. Huang, C.Y.; Huang, S.P.; Lin, V.C.; Yu, C.C.; Chang, T.Y.; Lu, T.L.; Chiang, H.C.; Bao, B.Y. Genetic Variants of the Autophagy Pathway as Prognostic Indicators for Prostate Cancer. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–9, doi:10.1038/srep14045.
 134. Mendivelso González, D.F.; Sánchez Villalobos, S.A.; Ramos, A.E.; Montero Ovalle, W.J.; Serrano López, M.L. Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Prostate Cancer Progression: A Systematic Review. *Cancer Invest.* **2024**, *42*, 75–96, doi:10.1080/07357907.2023.2291776.
 135. Zhong, C.; Wu, K.; Wang, S.; Long, Z.; Yang, T.; Zhong, W.; Tan, X.; Wang, Z.; Li, C.; Lu, J.; et al. Autophagy-Related CircRNA Evaluation Reveals Hsa_circ_0001747 as a Potential Favorable Prognostic Factor for Biochemical Recurrence in Patients with Prostate Cancer. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 1–12, doi:10.1038/s41419-021-04015-w.
 136. Singh, S.S.; Vats, S.; Chia, A.Y.Q.; Tan, T.Z.; Deng, S.; Ong, M.S.; Arfuso, F.; Yap, C.T.; Goh, B.C.; Sethi, G.; et al. Dual Role of Autophagy

- in Hallmarks of Cancer. *Oncogene* **2018**, 37, 1142–1158, doi:10.1038/s41388-017-0046-6.
137. Deng, S.; Shanmugam, M.K.; Kumar, A.P.; Yap, C.T.; Sethi, G.; Bishayee, A. Targeting Autophagy Using Natural Compounds for Cancer Prevention and Therapy. *Cancer* **2019**, 125, 1228–1246, doi:10.1002/cncr.31978.
 138. DE DUVE, C.; PRESSMAN, B.C.; GIANETTO, R.; WATTIAUX, R.; APPELMANS, F. Tissue Fractionation Studies. 6. Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in Rat-Liver Tissue. *Biochem. J.* **1955**, 60, 604–617, doi:10.1042/bj0600604.
 139. Li, W.W.; Li, J.; Bao, J.K. Microautophagy: Lesser-Known Self-Eating. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, 69, 1125–1136, doi:10.1007/s00018-011-0865-5.
 140. Tasset, I.; Cuervo, A.M. Role of Chaperone-Mediated Autophagy in Metabolism. *FEBS J.* **2016**, 2403–2413, doi:10.1111/febs.13677.
 141. Dikic, I.; Elazar, Z. Mechanism and Medical Implications of Mammalian Autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, 19, 349–364, doi:10.1038/s41580-018-0003-4.
 142. Zhang, R.; Kang, R.; Klionsky, D.J.; Tang, D. Ion Channels and Transporters in Autophagy. *Autophagy* **2022**, 18, 4–23, doi:10.1080/15548627.2021.1885147.
 143. Liu, J.; Kuang, F.; Kroemer, G.; Klionsky, D.J.; Kang, R.; Tang, D. Autophagy-Dependent Ferroptosis: Machinery and Regulation. *Cell Chem. Biol.* **2020**, 27, 420–435, doi:10.1016/j.chembiol.2020.02.005.
 144. Yin, Z.; Popelka, H.; Lei, Y.; Yang, Y.; Klionsky, D.J. The Roles of Ubiquitin in Mediating Autophagy. *Cells* **2020**, 9, 1–31, doi:10.3390/cells9092025.
 145. Benvenuto, M.; Albonici, L.; Focaccetti, C.; Ciuffa, S.; Fazi, S.; Cifaldi, L.; Miele, M.T.; De Maio, F.; Tresoldi, I.; Manzari, V.; et al. Polyphenol-Mediated Autophagy in Cancer: Evidence of in Vitro and in Vivo Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 1–91, doi:10.3390/ijms21186635.
 146. Wen, X.; Klionsky, D.J. At a Glance: A History of Autophagy and Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, 66, 3–11, doi:10.1016/j.semcancer.2019.11.005.

147. Zhang, H.M.; Li, H.; Wang, G.X.; Wang, J.; Xiang, Y.; Huang, Y.; Shen, C.; Dai, Z.T.; Li, J.P.; Zhang, T.C.; et al. MKL1/MiR-5100/CAAP1 Loop Regulates Autophagy and Apoptosis in Gastric Cancer Cells. *Neoplasia (United States)* **2020**, *22*, 220–230, doi:10.1016/j.neo.2020.03.001.
148. Feng, X.; Zhang, H.; Meng, L.; Song, H.; Zhou, Q.; Qu, C.; Zhao, P.; Li, Q.; Zou, C.; Liu, X.; et al. Hypoxia-Induced Acetylation of PAK1 Enhances Autophagy and Promotes Brain Tumorigenesis via Phosphorylating ATG5. *Autophagy* **2021**, *17*, 723–742, doi:10.1080/15548627.2020.1731266.
149. Li, J.P.; Zhang, H.M.; Liu, M.J.; Xiang, Y.; Li, H.; Huang, F.; Li, H.H.; Dai, Z.T.; Gu, C.J.; Liao, X.H.; et al. MiR-133a-3p/FOXP3 Axis Regulates Cell Proliferation and Autophagy in Gastric Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2020**, *121*, 3392–3405, doi:10.1002/jcb.29613.
150. Babaei, G.; Aziz, S.G.G.; Jaghi, N.Z.Z. EMT, Cancer Stem Cells and Autophagy; The Three Main Axes of Metastasis. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *133*, doi:10.1016/j.biopha.2020.110909.
151. Salimi, L.; Akbari, A.; Jabbari, N.; Mojarad, B.; Vahhabi, A.; Szafert, S.; Kalashani, S.A.; Soraya, H.; Nawaz, M.; Rezaie, J. Synergies in Exosomes and Autophagy Pathways for Cellular Homeostasis and Metastasis of Tumor Cells. *Cell Biosci.* **2020**, *10*, 1–18, doi:10.1186/s13578-020-00426-y.
152. Timothy; Debnath, J. Autophagy Suppresses Breast Cancer Metastasis by Degrading NBR1. *Autophagy* **2020**, *16*, 1164–1165, doi:10.1080/15548627.2020.1753001.
153. Alizadeh, J.; Glogowska, A.; Thliveris, J.; Kalantari, F.; Shojaei, S.; Hombach-Klonisch, S.; Klonisch, T.; Ghavami, S. Autophagy Modulates Transforming Growth Factor Beta 1 Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2018**, *1865*, 749–768, doi:10.1016/j.bbamcr.2018.02.007.
154. de Souza, A.S.C.; Gonçalves, L.B.; Lepique, A.P.; de Araujo-Souza, P.S. The Role of Autophagy in Tumor Immunology—Complex Mechanisms That May Be Explored Therapeutically. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1–12, doi:10.3389/fonc.2020.603661.

155. Chavez-Dominguez, R.; Perez-Medina, M.; Lopez-Gonzalez, J.S.; Galicia-Velasco, M.; Aguilar-Cazares, D. The Double-Edge Sword of Autophagy in Cancer: From Tumor Suppression to Pro-Tumor Activity. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1–19, doi:10.3389/fonc.2020.578418.
156. Yamamoto, K.; Venida, A.; Perera, R.M.; Kimmelman, A.C. Selective Autophagy of MHC-I Promotes Immune Evasion of Pancreatic Cancer. *Autophagy* **2020**, *16*, 1524–1525, doi:10.1080/15548627.2020.1769973.
157. Hou, G.; Bai, Y.; Jia, A.; Ren, Y.; Wang, Y.; Lu, J.; Wang, P.; Zhang, J.; Lu, Z. Inhibition of Autophagy Improves Resistance and Enhances Sensitivity of Gastric Cancer Cells to Cisplatin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2020**, *98*, 449–458, doi:10.1139/cjpp-2019-0477.
158. Zheng, X.; Wei, J.; Li, W.; Li, X.; Wang, W.; Guo, J.; Fu, Z. PRDX2 Removal Inhibits the Cell Cycle and Autophagy in Colorectal Cancer Cells. *Aging (Albany, NY)*. **2020**, *12*, 1–20, doi:10.18632/AGING.103690.
159. Ueda, S.; Takanashi, M.; Sudo, K.; Kanekura, K.; Kuroda, M. MiR-27a Ameliorates Chemoresistance of Breast Cancer Cells by Disruption of Reactive Oxygen Species Homeostasis and Impairment of Autophagy. *Lab. Investig.* **2020**, *100*, 863–873, doi:10.1038/s41374-020-0409-4.
160. Gao, S.; Wang, K.; Wang, X. MiR-375 Targeting Autophagy-Related 2B (ATG2B) Suppresses Autophagy and Tumorigenesis in Cisplatin-Resistant Osteosarcoma Cells. *Neoplasma* **2020**, *67*, 724–734, doi:10.4149/neo_2020_190423N366.
161. Zamame Ramirez, J.A.; Romagnoli, G.G.; Kaneno, R. Inhibiting Autophagy to Prevent Drug Resistance and Improve Anti-Tumor Therapy. *Life Sci.* **2021**, *265*, 118745, doi:10.1016/j.lfs.2020.118745.
162. Muscolino, E.; Schmitz, R.; Lorocho, S.; Caragliano, E.; Schneider, C.; Rizzato, M.; Kim, Y.H.; Krause, E.; Juranić Lisnić, V.; Sickmann, A.; et al. Herpesviruses Induce Aggregation and Selective Autophagy of Host Signalling Proteins NEMO and RIPK1 as an Immune-Evasion Mechanism. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 331–342, doi:10.1038/s41564-019-0624-1.
163. Ding, M.; Jiang, C.Y.; Zhang, Y.; Zhao, J.; Han, B.M.; Xia, S.J. SIRT7 Depletion Inhibits Cell Proliferation and Androgen-Induced Autophagy by Suppressing the AR Signaling in Prostate Cancer. *J. Exp. Clin. Cancer*

- Res. **2020**, 39, 1–18, doi:10.1186/s13046-019-1516-1.
164. Lee, Y.G.; Nam, Y.; Shin, K.J.; Yoon, S.; Park, W.S.; Joung, J.Y.; Seo, J.K.; Jang, J.; Lee, S.; Nam, D.; et al. Androgen-Induced Expression of DRP1 Regulates Mitochondrial Metabolic Reprogramming in Prostate Cancer. *Cancer Lett.* **2020**, *471*, 72–87, doi:10.1016/j.canlet.2019.12.017.
 165. Xia, L.; Sun, J.; Xie, S.; Chi, C.; Zhu, Y.; Pan, J.; Dong, B.; Huang, Y.; Xia, W.; Sha, J.; et al. PRKAR2B-HIF-1 α Loop Promotes Aerobic Glycolysis and Tumour Growth in Prostate Cancer. *Cell Prolif.* **2020**, *53*, 1–13, doi:10.1111/cpr.12918.
 166. Fan, Y.; Ou, L.; Fan, J.; Li, L.; Wang, X.; Niu, L.; Wu, X.; Luo, C. PLC ϵ Regulates Metabolism and Metastasis Signaling via HIF-1 α /MEK/ERK Pathway in Prostate Cancer. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 8546–8557, doi:10.1002/jcp.29698.
 167. Ma, Z.; Wang, L.Z.; Cheng, J.T.; Lam, W.S.T.; Ma, X.; Xiang, X.; Wong, A.L.A.; Goh, B.C.; Gong, Q.; Sethi, G.; et al. Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1-Mediated Metastasis for Cancer Therapy. *Antioxidants Redox Signal.* **2021**, *34*, 1484–1497, doi:10.1089/ars.2019.7935.
 168. Beenken, A.; Mohammadi, M. The FGF Family: Biology, Pathophysiology and Therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 235–253, doi:10.1038/nrd2792.
 169. Potthoff, M.J.; Klierer, S.A.; Mangelsdorf, D.J. Endocrine Fibroblast Growth Factors 15/19 and 21: From Feast to Famine. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 312–324, doi:10.1101/gad.184788.111.
 170. Dai, H.; Hu, W.; Zhang, L.; Jiang, F.; Mao, X.; Yang, G.; Li, L. FGF21 Facilitates Autophagy in Prostate Cancer Cells by Inhibiting the PI3K–Akt–MTOR Signaling Pathway. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41419-021-03588-w.
 171. Zhang, J.; Sikka, S.; Siveen, K.S.; Lee, J.H.; Um, J.Y.; Kumar, A.P.; Chinnathambi, A.; Alharbi, S.A.; Basappa; Rangappa, K.S.; et al. Cardamonin Represses Proliferation, Invasion, and Causes Apoptosis through the Modulation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Pathway in Prostate Cancer. *Apoptosis* **2017**, *22*, 158–168, doi:10.1007/s10495-016-1313-7.

172. Wang, Z.; Jia, G.; Li, Y.; Liu, J.; Luo, J.; Zhang, J.; Xu, G.; Chen, G. Clinicopathological Signature of P21-Activated Kinase 1 in Prostate Cancer and Its Regulation of Proliferation and Autophagy via the MTOR Signaling Pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 22563–22580, doi:10.18632/oncotarget.15124.
173. Wang, L.; Wang, J.; Xiong, H.; Wu, F.; Lan, T.; Zhang, Y.; Guo, X.; Wang, H.; Saleem, M.; Jiang, C.; et al. Co-Targeting Hexokinase 2-Mediated Warburg Effect and ULK1-Dependent Autophagy Suppresses Tumor Growth of PTEN- and TP53- Deficiency-Driven Castration-Resistant Prostate Cancer. *EBioMedicine* **2016**, *7*, 50–61, doi:10.1016/j.ebiom.2016.03.022.
174. Lin, C.; Blessing, A.M.; Pulliam, T.L.; Shi, Y.; Wilkenfeld, S.R.; Han, J.J.; Murray, M.M.; Pham, A.H.; Duong, K.; Brun, S.N.; et al. Inhibition of CAMKK2 Impairs Autophagy and Castration-Resistant Prostate Cancer via Suppression of AMPK-ULK1 Signaling. *Oncogene* **2021**, *40*, 1690–1705, doi:10.1038/s41388-021-01658-z.
175. Huang, Y.L.; Chang, C.L.; Tang, C.H.; Lin, Y.C.; Ju, T.K.; Huang, W.P.; Lee, H. Extrinsic Sphingosine 1-Phosphate Activates S1P5 and Induces Autophagy through Generating Endoplasmic Reticulum Stress in Human Prostate Cancer PC-3 Cells. *Cell. Signal.* **2014**, *26*, 611–618, doi:10.1016/j.cellsig.2013.11.024.
176. Zhou, R.; Yang, Y.; Park, S.Y.; Seo, Y.W.; Jung, S.C.; Kim, K.K.; Kim, K.; Kim, H. P300/CBP-Associated Factor Promotes Autophagic Degradation of δ -Catenin through Acetylation and Decreases Prostate Cancer Tumorigenicity. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–14, doi:10.1038/s41598-019-40238-w.
177. Quan, Z.; Li, T.; Xia, Y.; Liu, J.; Du, Z.; Luo, C.; He, Y.; Wu, X. PLC ϵ Maintains the Functionality of AR Signaling in Prostate Cancer via an Autophagy-Dependent Mechanism. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41419-020-02917-9.
178. Fang, F.; Wang, L.; Zhang, S.; Fang, Q.; Hao, F.; Sun, Y.; Zhao, L.; Chen, S.; Liao, H.; Wang, L. CD147 Modulates Autophagy through the PI3K/Akt/MTOR Pathway in Human Prostate Cancer PC-3 Cells. *Oncol. Lett.* **2015**, *9*, 1439–1443, doi:10.3892/ol.2015.2849.

179. Davey, R.A.; Grossmann, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin. Biochem. Rev.* **2016**, *37*, 3–15.
180. Dai, C.; Heemers, H.; Sharifi, N. Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2017**, *7*, 1–18, doi:10.1101/cshperspect.a030452.
181. Heemers, H. V.; Tindall, D.J. Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex. *Endocr. Rev.* **2007**, *28*, 778–808, doi:10.1210/er.2007-0019.
182. Dehm, S.M.; Tindall, D.J. Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 2855–2863, doi:10.1210/me.2007-0223.
183. Depriest, A.D.; Fiandalo, M. V.; Schlanger, S.; Heemers, F.; Mohler, J.L.; Liu, S.; Heemers, H. V. Regulators of Androgen Action Resource: A One-Stop Shop for the Comprehensive Study of Androgen Receptor Action. *Database* **2016**, *2016*, 1–11, doi:10.1093/database/bav125.
184. Pang, T.P.S.; Clarke, M. V.; Ghasem-Zadeh, A.; Lee, N.K.L.; Davey, R.A.; MacLean, H.E. A Physiological Role for Androgen Actions in the Absence of Androgen Receptor DNA Binding Activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *348*, 189–197, doi:10.1016/j.mce.2011.08.017.
185. Dahiya, V.; Bagchi, G. Non-Canonical Androgen Signaling Pathways and Implications in Prostate Cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2022**, *1869*, 119357, doi:10.1016/j.bbamcr.2022.119357.
186. Tortorella, E.; Giantulli, S.; Sciarra, A.; Silvestri, I. AR and PI3K/AKT in Prostate Cancer: A Tale of Two Interconnected Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24032046.
187. Geering, B.; Cutillas, P.R.; Nock, G.; Gharbi, S.I.; Vanhaesebroeck, B. Class IA Phosphoinositide 3-Kinases Are Obligate P85-P110 Heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 7809–7814, doi:10.1073/pnas.0700373104.
188. Gewinner, C.; Wang, Z.C.; Richardson, A.; Teruya-Feldstein, J.; Etemadmoghadam, D.; Bowtell, D.; Barretina, J.; Lin, W.M.; Rameh, L.; Salmena, L.; et al. Evidence That Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase Type II Is a Tumor Suppressor That Inhibits PI3K Signaling. *Cancer Cell*

- 2009**, 16, 115–125, doi:10.1016/j.ccr.2009.06.006.
189. Zhao, J.J.; Liu, Z.; Wang, L.; Shin, E.; Loda, M.F.; Roberts, T.M. The Oncogenic Properties of Mutant P110 α and P110 β Phosphatidylinositol 3-Kinases in Human Mammary Epithelial Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 18443–18448, doi:10.1073/pnas.0508988102.
 190. Conciatori, F.; Bazzichetto, C.; Falcone, I.; Ciuffreda, L.; Ferretti, G.; Vari, S.; Ferraresi, V.; Cognetti, F.; Milella, M. Pten Function at the Interface between Cancer and Tumor Microenvironment: Implications for Response to Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 1–19, doi:10.3390/ijms21155337.
 191. Knowles, M.A.; Platt, F.M.; Ross, R.L.; Hurst, C.D. Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Pathway Activation in Bladder Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, 28, 305–316, doi:10.1007/s10555-009-9198-3.
 192. Pungsrinont, T.; Kallenbach, J.; Baniahmad, A. Role of Pi3k-Akt-Mtor Pathway as a pro-Survival Signaling and Resistance-Mediating Mechanism to Therapy of Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, doi:10.3390/ijms222011088.
 193. Lotan, T.L.; Carvalho, F.L.; Peskoe, S.B.; Hicks, J.L.; Good, J.; Fedor, H.L.; Humphreys, E.; Han, M.; Platz, E.A.; Squire, J.A.; et al. PTEN Loss Is Associated with Upgrading of Prostate Cancer from Biopsy to Radical Prostatectomy. *Mod. Pathol.* **2015**, 28, 128–137, doi:10.1038/modpathol.2014.85.
 194. Edlind, M.P.; Hsieh, A.C. PI3K-AKT-MTOR Signaling in Prostate Cancer Progression and Androgen Deprivation Therapy Resistance. *Asian J. Androl.* **2014**, 16, 378–386, doi:10.4103/1008-682X.122876.