

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ –
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ –
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθυντής ΠΜΣ : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Καρκίνος προστάτη: Ο πιθανός ρόλος των πολυμορφισμών
rs10993994 (γονίδιο *MSMB*) και rs2735839 (γονίδιο *KLK3*)
ως παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου»

ΚΥΡΜΑΝΙΔΟΥ ΕΛΕΝΗ

Μοριακή Βιολόγος

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

ΛΑΡΙΣΑ,

Μάρτιος 2021

"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:

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Μαρία Σαμαρά

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Μαρία Σάτρα

Ε.ΔΙ.Π Βιολογίας-Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Αλέξανδρος Δαπόντε

Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην επιτυχή εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Αρχικά ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας κ. Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που δέχτηκε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής. Την ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, την εμπιστοσύνη και την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφερε σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Θα ήθελα να απευθύνω ιδιαίτερες ευχαριστίες τόσο στην κ. Μαρία Σάτρα, Ε.ΔΙ.Π Βιολογίας και Μοριακής Βιολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, όσο και στον κ. Αλέξανδρο Δαπόντε, Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος και μέλος της τριμελούς επιτροπής για την αποδοχή, τη στήριξη και τις συμβουλές τους σε όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα κ. Μαρία Παπαθανασίου για την καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές που μου παρείχε κατά την διάρκεια υλοποίησης του εργαστηριακού μέρους της παρούσας εργασίας. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου και συγκεκριμένα την υποψήφια διδάκτορα κ. Μαρία Αναγνώστου και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες κ. Ιωάννα Φαρμακιώτη και κ. Μαρίνα Ροΐδου-Ανίσογλου για την άριστη συνεργασία, την υποστήριξη τους και το ευχάριστο κλίμα στο οποίο συνετέλεσαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, όπως πάντα, στην οικογένειά μου για τη στήριξη και την αμέριστη συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Κυρμανίδου Ελένη

**«Καρκίνος προστάτη: Ο πιθανός ρόλος των πολυμορφισμών
rs10993994 (γονίδιο *MSMB*) και rs2735839 (γονίδιο *KLK3*)
ως παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου»**

ΕΛΕΝΗ ΚΥΡΜΑΝΙΔΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2021

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Επιβλέπων:** **κ. Μαρία Σαμαρά**
Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση
στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Σύμβουλος :** **κ. Μαρία Σάτρα**
Ε.ΔΙ.Π Βιολογίας-Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο
Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Μέλος :** **Αλέξανδρος Δαπόντε**
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Περίληψη

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί κακοήθεια με κύριο ιστολογικό τύπο το προστατικό αδενοκαρκίνωμα. Αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη κακοήθεια στους άνδρες και πέμπτη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο. Παρά τη μείωση της θνησιμότητας στις ανεπτυγμένες χώρες, ο αριθμός των ασθενών συνεχίζει να αυξάνεται στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η σταδιοποίηση γίνεται με το σύστημα TNM και η βαθμονόμηση του όγκου εκτιμάται με το Gleason score. Η ηλικία, η φυλή και το οικογενειακό ιστορικό αποτελούν κύριους παράγοντες κινδύνου. Πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σημαντικές για τη φυσιολογική λειτουργία του προστάτη επηρεάζουν την έκφρασή τους και συμβάλουν στην καρκινογένεση. Υπάρχει μεγάλη γεωγραφική ετερογένεια και αντικρουόμενα ευρήματα. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τους πολυμορφισμούς του γονιδίου που κωδικοποιεί για μία κύρια εκκρινόμενη προστατική πρωτεΐνη και του προστατικού αντιγόνου, καθώς δεν υπάρχει ανάλογη μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό, προκειμένου να εκτιμήσουμε την κατανομή και το ρόλο τους στην καρκινογένεση του προστάτη. Συμπεριλάβαμε 49 ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και 50 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου) για τους πολυμορφισμούς rs10993994 του MSMB γονιδίου και rs2735839 του KLK3 γονιδίου. Απομονώσαμε γενωμικό DNA από περιφερικό αίμα κι ακολούθησε RFLP ανάλυση των PCR προϊόντων με ειδικά περιοριστικά ένζυμα. Για την πλειοψηφία των ασθενών συλλέξαμε κλινικές πληροφορίες για τις τιμές του δείκτη PSA και το Gleason score. Τα αποτελέσματά μας αναλύθηκαν στατιστικά με το λογισμικό πρόγραμμα IBM SPSS έκδοση v22 χρησιμοποιώντας την chi-square δοκιμασία ($p < 0.05$, 95% CI). Δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου εμφάνισης της νόσου και των πολυμορφισμών rs10993994 του MSMB γονιδίου και rs2735839 του KLK3 γονιδίου. Οι τιμές του PSA σε περιορισμένο αριθμό των ασθενών της μελέτης δεν επέτρεψε περαιτέρω συσχετίσεις. Η μελέτη των εξεταζόμενων πολυμορφισμών σε συνδυασμό με το Gleason score των ασθενών δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις. Από την εργασία αυτή προκύπτουν κάποιες πρώτες ενδείξεις για την κατανομή των εν λόγω πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό. Χρειάζεται ανάλυση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να εξαχθούν στατιστικώς ασφαλή συμπεράσματα.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος του προστάτη, Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, Παράγοντες κινδύνου, γονίδιο *KLK3*, γονίδιο *MSMB*, rs10993994, rs2735839.

Summary

Prostate cancer is a malignancy which in most cases is prostatic adenocarcinoma amongst men. Prostate cancer is the second most common malignancy in men and fifth most common cause of death among cancers. Although incidence and mortality rates declines in Western countries, prostate cancer incidence increases in less developed developing countries. Tumor staging is based on the TNM system and tumor differentiation is evaluated with the Gleason grading system. Age, race and family history are considered as the main risk factors. Polymorphisms in genes, coding for important proteins participating in prostate's physiological function, affect protein expression and contribute to carcinogenesis. Geographical heterogeneity is high, leading to conflicting research findings. In the present study we examined polymorphisms on one of the main secreted prostate proteins gene, as well the prostate specific antigen gene, as no prior research exists, on the distribution and their role in prostate carcinogenesis in Greek population. We analyzed 49 patients with prostate cancer and 50 healthy individuals (control group) for the MSMB gene rs10993994 and KLK3 rs2735839 SNPs. DNA extraction from peripheral blood was performed, followed by PCR and RFLP analysis with specific restriction enzymes. Clinical data on PSA levels and Gleason scoring were acquired for the majority of patients. Statistical analysis was performed with IBM SPSS v.22 software, using chi-square testing ($p < 0.05$, 95% CI). No statistically significant correlation for the risk of prostate cancer development and the distribution of MSMB rs10993994 and KLK3 rs2735839 was observed. Restrictions on PSA levels data availability didn't allow for further correlations. Correlations of the two studied polymorphisms with patient Gleason scoring were not statistically significant. The present study provides primary evidence on the distribution of the studied polymorphisms in Greek population. Further analysis with larger sample sizes is required for quality statistical hypothesis testing.

Key words: Prostate cancer, Mononucleotide Polymorphisms, Risk Factors, *KLK3* gene, *MSMB* gene, rs10993994, rs2735839.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Summary	7
Περιεχόμενα	8
Εισαγωγή.....	10
1.1 Ανατομία – Ιστολογία – Φυσιολογία - Προστάτη Αδένα	10
1.1.1 Ανατομία προστάτη αδένος.....	10
1.1.2 Ιστολογία προστάτη αδένος.....	13
1.1.3 Φυσιολογία προστάτη αδένος	15
1.2 Ο καρκίνος του προστάτη	17
1.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία	17
1.2.2 Ιστολογική ταξινόμηση	20
1.3 Διάγνωση	22
1.3.1 Δακτυλική εξέταση (DRE, Digital Rectal Exam)	23
1.3.2 Μέτρηση επιπέδων ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA, Prostate Specific Antigen)	23
1.3.3 Διορθικό Υπερηχοτομογράφημα (TRUS, TransRectal UltraSound).....	25
1.3.4 Διορθική Βιοψία προστάτη.....	26
1.3.5 Μαγνητική τομογραφία (MRI, Magnetic Resonance Imaging)	26
1.4. Σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη	27
1.4.1 Σταδιοποίηση με το σύστημα TNM.....	27
1.5 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη	32
1.6. Γενετικό υπόβαθρο καρκίνου του προστάτη	34
1.7 Το γονίδιο <i>MSMB</i>	36
1.8 Το γονίδιο <i>KLK3</i>	38
Σκοπός	42
Μεθοδολογία	43
2.1 Υλικό μελέτης	43
2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	43
2.2.1 Υλικά	43
2.2.2 Πειραματική διαδικασία.....	44
2.2.3 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση του γενωμικού DNA	45
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	46
2.5 Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης	48

2.6 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων.....	49
2.7 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα για τους πολυμορφισμούς rs10993994 και rs2735839.....	50
Αποτελέσματα	52
3.1 Αποτελέσματα της PCR.....	52
3.2 Αποτελέσματα των πέψεων με περιοριστικά ένζυμα	53
3.3 Στατιστική Ανάλυση	56
3.3.1 Συσχέτιση της κατανομής των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών rs10993994 και rs2735839 με την ύπαρξη του καρκίνου του προστάτη.....	56
3.3.2 Συσχέτιση της κατανομής των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών rs10993994 και rs2735839 με την βαθμολογία κατά Gleason.....	59
Συζήτηση.....	62
Βιβλιογραφία.....	68

Εισαγωγή

1.1 Ανατομία – Ιστολογία – Φυσιολογία - Προστάτη Αδένα

1.1.1 Ανατομία προστάτη αδένου

Ο προστάτης αδένου είναι ένα μονήρες όργανο που περιβάλλει την ουρήθρα και τους εκσπερματικούς πόρους. Είναι ο μεγαλύτερος επικουρικός αδένου του άρρενος γεννητικού συστήματος. Αναπτύσσεται κατά την εφηβεία και μεγαλώνει σε όλη τη διάρκεια της ζωής του άρρενος ατόμου. Σε νεαρής ηλικίας άρρενα άτομα ζυγίζει περίπου 15-20 γραμμάρια, ενώ σε περιπτώσεις υπερτροφίας μπορεί να φτάσει και τα 100-200 γραμμάρια. Πήρε το όνομα του από τη θέση που βρίσκεται (προΐσταται, δηλαδή βρίσκεται μπροστά και κάτω από την ουροδόχο κύστη), καθώς βρίσκεται πίσω από την ηβική σύμφυση και μπροστά από το κατώτερο τμήμα του παχέος εντέρου.

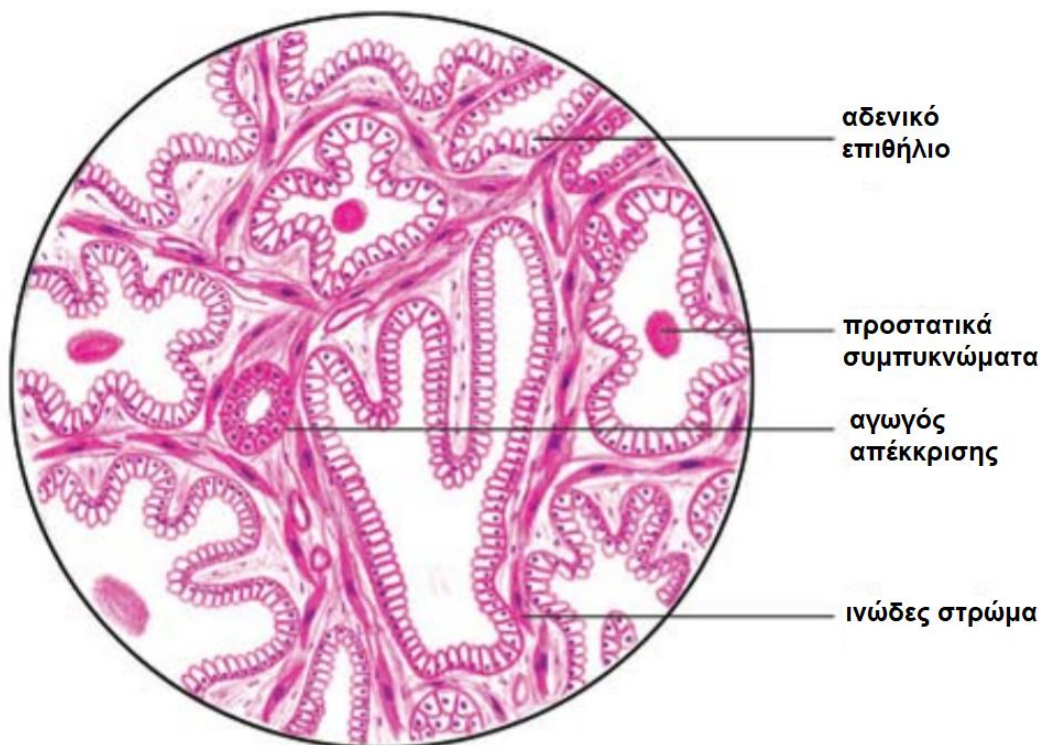
Ο προστάτης περιγράφεται ως ένα ινομυώδες όργανο σε σχήμα ανεστραμμένης πυραμίδας. Σχηματίζεται από τον δεξιό και τον αριστερό λοβό, οι οποίοι χωρίζονται κατά μήκος της οπίσθιας επιφάνειας του αδένου από μία ακαθόριστη αύλακα και από τον ισθμό του προστάτη ή μέσο λοβό¹.

Ο προστάτης έχει μία εγκάρσια διάμετρο περίπου τεσσάρων εκατοστών, μία κάθετη διάμετρο τριών εκατοστών και μία προσθιοπίσθια διάμετρο της τάξης των δύο εκατοστών. Εμφανίζει τέσσερις ανατομικές επιφάνειες που διακρίνονται στην πρόσθια, την οπίσθια και τις πλάγιες, ενώ κεφαλικά αναγνωρίζεται η βάση και η ουραία κορυφή του οργάνου. Οι ανατομικές δομές στις πλάγιες και οπισθοπλάγιες επιφάνειες του προστάτη αδένου αποτελούν σημαντικές παραμέτρους κατά τη διάρκεια της ριζικής προστατεκτομής, καθώς η ενδοπυελική περιτονία θα πρέπει να διατέμνεται επί τα εκτός του tendinousarcus, ώστε να αποφεύγονται τραυματισμοί του ραχιαίου φλεβικού συστήματος και των αγγειονευρωδών σωματίων.

Στην οπίσθιο-πλάγια επιφάνεια του αδένου, η προστατική κάψα είναι λεπτότερη και έχει πάχος 0.5 χιλιοστά. Στην πρόσθια και προσθιοπλάγια επιφάνεια του προστάτη αδένου, η κάψα συνεχεται με το σπλαχνικό τμήμα της ενδοπυελικής περιτονίας. Στην πρόσθια επιφάνεια του προστάτη αδένου, βρίσκονται οι ηβοπροστατικοί σύνδεσμοι που στερεώνουν τον προστάτη αδένου στην ηβική σύμφυση και τα ηβικά οστά. Οι πλάγιες επιφάνειες του προστάτη βρίσκονται σε στενή γειτνίαση με το ηβοκοκκυγικό τμήμα

του ανελκτήρος μυός του πρωκτού και συνδέονται άμεσα με την υπερκείμενη ενδοπυελική περιτονία.

Ο προστάτης αποτελεί εξωκρινή αδένα που επενδύεται από μία κάψα συνδετικού ιστού με ελαστικές ίνες, κολλαγόνο και κυκλικά διατασσόμενες λείες μυϊκές ίνες. Αποτελείται από αδενικό και ινομυώδες στρώμα κατά αντιστοιχία 70% και 30% του αδένα. Το στρώμα βρίσκεται μεταξύ των σωληναρίων και χωρίζει την αδενική ουσία σε λόβια (Εικόνα 1). Στη βάση του προστάτη αδένα, επιμήκεις ίνες της εξωτερικής στιβάδας του εξωστήρα μυός της ουροδόχου κύστης συνδέονται με το ινομυώδες στρώμα της προστατικής κάψας. Οι μέσες κυκλοτερείς και οι έσω επιμήκεις μυϊκές ίνες του εξωστήρα μυός συνεχίζουν και διαπερνούν τον προστάτη σχηματίζοντας τον έσω σφιγκτήρα. Η βάση και η κορυφή του προστάτη δε διαχωρίζονται από τις γειτονικές τους δομές με κάψα.



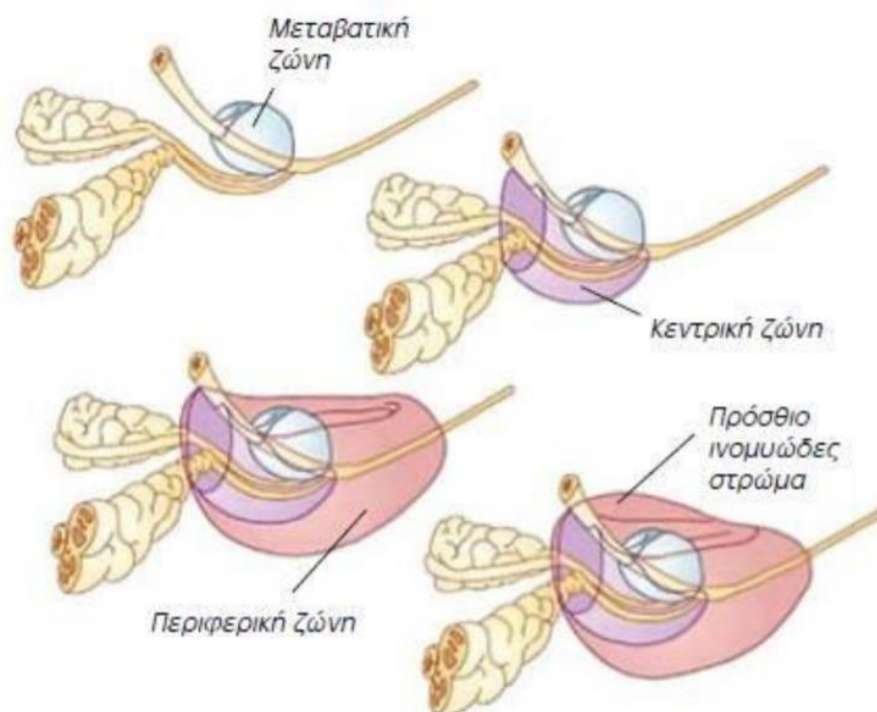
Εικόνα 1. Απεικόνιση τμήματος προστάτη αδένα, χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H/E).

Πηγή: Concise Textbook of Histology—For Undergraduate Students, 2018.

Τα αδενικά στοιχεία του προστάτη διακρίνονται σε ζώνες βάσει της τοποθεσίας των πόρων τους σε σχέση με την ουρήθρα, της παθολογοανατομικής διαφορετικότητάς τους και σε ορισμένες περιπτώσεις της εμβρυολογικής τους προέλευσης (Εικόνα 2).

Κατά τον *McNeal* οι ζώνες είναι οι ακόλουθες:

- **Περιφερική ζώνη**, που αποτελείται κατά 70% από αδενικό στοιχείο και λείες μυϊκές ίνες. Είναι η μεγαλύτερη ζώνη και αποτελεί περιοχή ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη και χρόνιων φλεγμονών.
- **Μεταβατική ζώνη**, που περιβάλλει την ουρήθρα και δίνει γένεση στην υπερτροφία του προστάτη αδένου. Πρόκειται για το μικρότερο κομμάτι του αδένου, της τάξης του 5%, ωστόσο, κατά την υπερτροφία πιέζει τα υπόλοιπα μέρη ώστε αυτά να ατροφίσουν. Το 20% περίπου των αδενοκαρκινωμάτων του προστάτη εξορμούν από τη μεταβατική ζώνη.
- **Κεντρική ζώνη**, βρίσκεται μεταξύ των δύο προαναφερόμενων ζωνών και αποτελείται κατά 25% από αδενικό στοιχείο. Οριοθετείται στη βάση του προστάτη αδένου και μόλις 1-5% των αδενοκαρκινωμάτων εξορμούν από την κεντρική ζώνη.
- **Πρόσθιο ινομυώδες στρώμα**, που καλύπτει την πρόσθια επιφάνεια του προστάτη και στερείται πλήρως αδενικού στοιχείου. Δηθείται σπάνια από καρκινώματα. Έχει άμεση συνέχεια με την προστατική κάψα, την πρόσθια περιοχή του έσω σφιγκτήρα και αποτελείται από ελασίνη, κολλαγόνο, λείες και γραμμωτές μυϊκές ίνες.

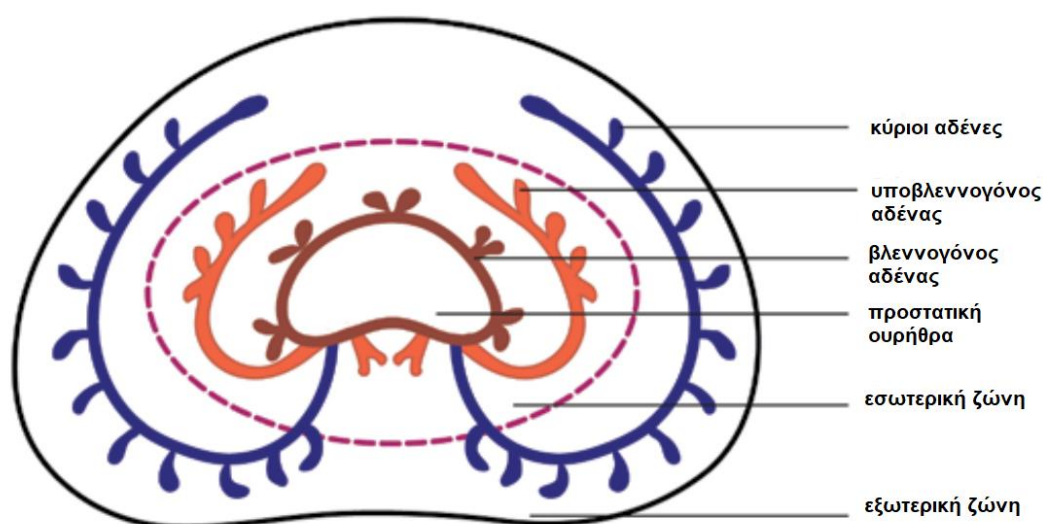


Εικόνα 2. Οι ανατομικές ζώνες του προστάτη αδένου κατά McNeal.

Πηγή: https://www.iatrikionline.gr/url_42/2.pdf

1.1.2 Ιστολογία προστάτη αδένου

Ο προστάτης αδένου αποτελεί συνάθροιση 30 έως 50 επιμέρους συνθέτων σωληνοκυψελοειδών αδένων (compound tubuloalveolar glands). Είναι διατεταγμένος σε τρεις διακριτές, συγκεντρικές στοιβάδες: βλεννογόνια, υποβλεννογόνια και κύρια. Κάθε σωληνοκυψελοειδής αδένου διαθέτει τον δικό του εκφορητικό πόρο, ο οποίος διοχετεύει το εκκριτικό προϊόν στη προστατική ουρήθρα. Οι βλεννογόνιοι αδένες (mucosal glands) είναι οι πλησιέστεροι προς την ουρήθρα και ως εκ τούτου είναι οι πλέον βραχείς. Οι υποβλεννογόνιοι αδένες (submucosal glands) εντοπίζονται περιφερικά των βλεννογονίων αδένων και είναι πιο επιμήκεις². Οι μεγαλύτεροι και πλέον πολυάριθμοι αδένες είναι οι πλέον περιφερικώς κείμενοι κύριοι αδένες (main glands) που αποτελούν και τη κυρίως μάζα του προστάτη³ (Εικόνα 3).

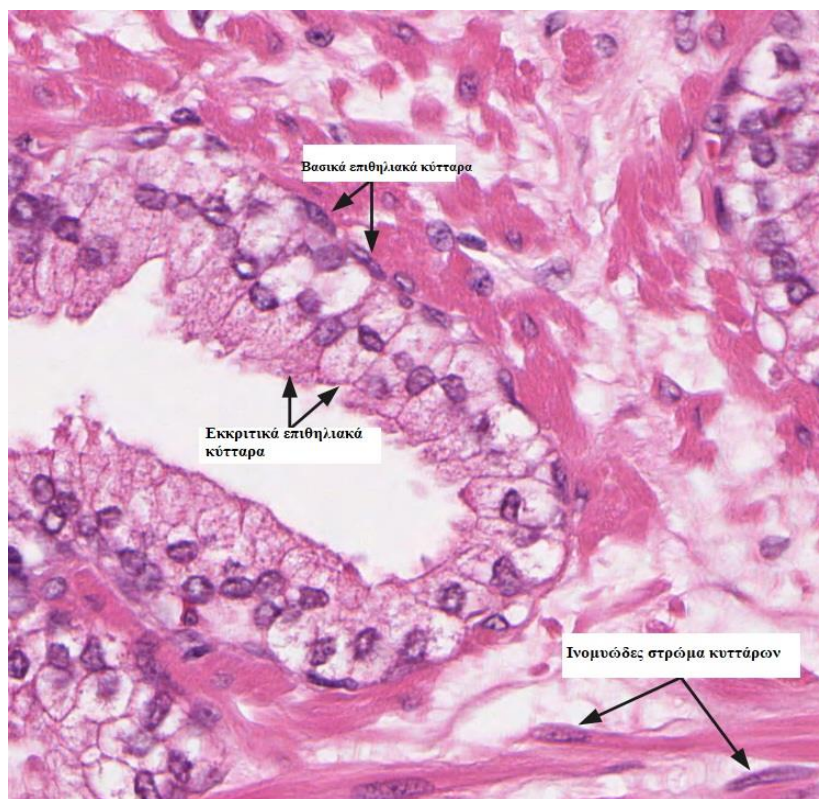


Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση αδενικών σχηματισμών προστάτη αδένου.

Πηγή: Concise Textbook of Histology—For Undergraduate Students, 2018.

Το προστατικό επιθήλιο αποτελείται από βασικά επιθηλιακά κύτταρα, ενδιάμεσα κύτταρα, νευροενδοκρινή, εκκριτικά κύτταρα και πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα. Το προστατικό στρώμα αποτελεί στηρικτική δομή και αποτελείται κυρίως από συνδετικό ιστό, λεία μυϊκά κύτταρα και ινοβλάστες. Τα επιθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν τα αδένια του προστάτη που επενδύονται από δύο στίχους κυττάρων: τα βασικά και τα εκκριτικά κύτταρα (Εικόνα 4). Τα επιθηλιακά βασικά κύτταρα επικάθονται στη βασική μεμβράνη και είναι επιμήκη, αποπλατυσμένα κύτταρα με πυκνόχρωμους πυρήνες και

ελάχιστο έως μη διακριτό κυτταρόπλασμα. Τα βασικά κύτταρα (basal cells) διαιρούνται φυσιολογικά και ωριμάζουν σε εκκριτικά κύτταρα.



Εικόνα 4. Ιστολογία υγιούς προστάτη αδένου.

Πηγή: [https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/prostate/\(τροποποιημένο\)](https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/prostate/(τροποποιημένο))

Τα εκκριτικά κύτταρα (luminal cells) είναι κυλινδρικά και πολικά με τον πυρήνα τους τοποθετημένο προς τη βάση του πόρου και το πλούσιο κυτταρόπλασμά τους προς τον αυλό. Πρόκειται για κύτταρα τελικής διαφοροποίησης με χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού. Το τελικό τμήμα του κυτταροπλάσματος των εκκριτικών κυττάρων προβάλλει εντός του αυλού, ώστε οι προστατικές εκκρίσεις να μεταφέρονται και να κινούνται εντός των προστατικών πόρων.

Τα νευροενδοκρινικά κύτταρα (NEs) είναι διαφοροποιημένα κύτταρα επιθηλιακής μεταξύ των εκκριτικών επιθηλιακών κυττάρων, καθώς και στο επιθήλιο της προστατικής ουρήθρας. Η λειτουργία τους δεν είναι πλήρως κατανοητή. Σπάνια αναγνωρίζονται με απλές χρώσεις ρουτίνας (H/E), ενώ διακρίνονται εύκολα με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων που εκφράζουν.

Τα ενδιάμεσα κύτταρα (intermedia cells) ονομάζονται έτσι καθώς εμφανίζουν φαινοτυπικά και μοριακά χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των βασικών και των εκκριτικών

κύτταρων. Παρουσιάζουν ομοιότητες με τα νεοπλασματικά κύτταρα στον καρκίνο του προστάτη με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ως κύτταρα-πρόδρομα νεοπλασματικής εξεργασίας, υπόθεση που ωστόσο δεν έχει τεκμηριωθεί απόλυτα.

1.1.3 Φυσιολογία προστάτη αδένου

Η εύρυθμη λειτουργία του προστάτη αδένου συμβάλλει στον έλεγχο της ούρησης, λόγω της ανατομικής του θέσης, στον εμπλουτισμό του σπέρματος με απαραίτητα συστατικά και στη λειτουργία της εκσπερμάτισης. Η κύρια λειτουργία του προστάτη αδένου είναι η παραγωγή του προστατικού εκκρίματος το οποίο είναι πλούσιο σε λιπίδια, πρωτεολυτικά ένζυμα, όξινη φωσφατάση και άλλες ουσίες. Το έκκριμα συμβάλλει στη μεταφορά του σπέρματος κατά την εκσπερμάτωση, αλλά και στη ρευστοποίηση του σπερματικού υγρού, ώστε η διείσδυση των σπερματοζωαρίων στην τραχηλική βλέννα να είναι ευκολότερη. Οι πρωτεΐνες που παράγονται, διοχετεύονται στην κυκλοφορία του αίματος και δρουν σε άλλα όργανα επιδρώντας στη λειτουργία τους. Τέτοιες ορμόνες θεωρούνται κυρίως το ειδικό προστατικό αντιγόνο και η όξινη προστατική φωσφατάση.

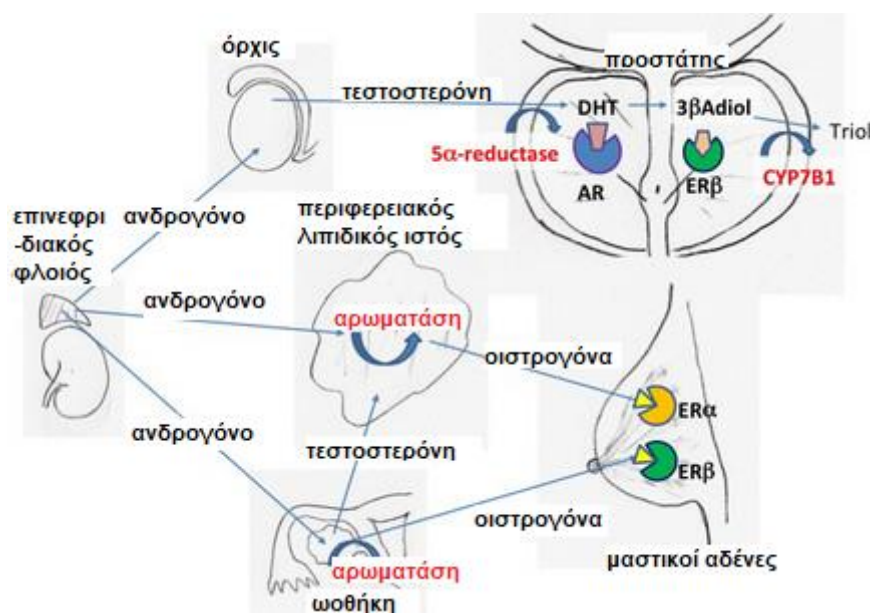
Στη λειτουργία του προστάτη συγκαταλέγεται και η μετατροπή της τεστοστερόνης στη δραστική της μορφή που καλείται διυδροτεστοστερόνη (DHT). Η τεστοστερόνη συντίθεται κυρίως στα κύτταρα Leydig των όρχεων (95%) και δευτερευόντως στα κύτταρα της δικτυωτής ζώνης των επινεφριδίων (5%). Η λειτουργία του προστάτη αδένου βρίσκεται υπό τον έλεγχο του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης. Από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης εκλύονται η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH) και η αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη (ACTH), που δρουν στους όρχεις και στον φλοιό των επινεφριδίων αντίστοιχα, και ευθύνονται για τη παραγωγή της τεστοστερόνης^{4,5}.

Η βιοσύνθεση της τεστοστερόνης επιτυγχάνεται μέσω μηχανισμού δύο σταδίων. Η μετατροπή της τεστοστερόνης από την 5 α -αναγωγή σε DHT ή η μετατροπή της από την αρωμάτωση σε οιστρογόνα αποτελεί μονόδρομη αντίδραση. Αρχικά ο υποθάλαμος απελευθερώνει ένα μικρό πολυπεπίδιο (δεκαπεπίδιο), την εκλυτική ορμόνη της ωχρινοτρόπου ορμόνης (Luteinizing hormone-releasing hormone-LHRH), που ονομάζεται επίσης και εκλυτική ορμόνη γοναδοτροπινών (GnRH). Υπό την επίδραση της LHRH, η υπόφυση εκκρίνει την ωχρινοτρόπο ορμόνη (Luteinizing Hormone, LH) και τη θυλακιοτρόπο ορμόνη (Follicle-Stimulating Hormone, FSH), που μεταφέρονται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος στους όρχεις και δρουν άμεσα στα κύτταρα

Leyding και Sertoli αντίστοιχα. Η πρόσδεση της LH στον υποδοχέα της ενεργοποιεί έναν καταρράκτη πρωτεϊνών με κατάληξη τη μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη και τελικά σε προγεστερόνη.

Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη CYP17A1 του κυτοχρώματος P450 μετατρέπει την προγεστερόνη σε ανδροστενδιόνη, που τελικά μεταβολίζεται σε τεστοστερόνη. Υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης στον ορό ενεργοποιούν έναν μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης παρεμποδίζοντας την απελευθέρωση της LHRH και διατηρώντας μια βέλτιστη φυσιολογική συγκέντρωση της τεστοστερόνης στο αίμα (Εικόνα 5).

Επιπρόσθετα, τα οιστρογόνα στον άνδρα προέρχονται στην πλειοψηφία τους (75%-90%) από περιφερική μετατροπή των ανδρογόνων ανδροστενδιόνη και τεστοστερόνη στα οιστρογόνα οιστρόνη και οιστραδιόλη μέσω της αντίδρασης της αρωματοποίησης. Τα οιστρογόνα προκαλούν αρνητική ανατροφοδότηση στην απελευθέρωση της ωχρινότροπου ορμόνης LH και μειώνουν την παραγωγή τεστοστερόνης από τους όρχεις. Ως εκ τούτου, τα οιστρογόνα λειτουργούν ως αποτελεσματικός “χημικός ευνουχισμός”.

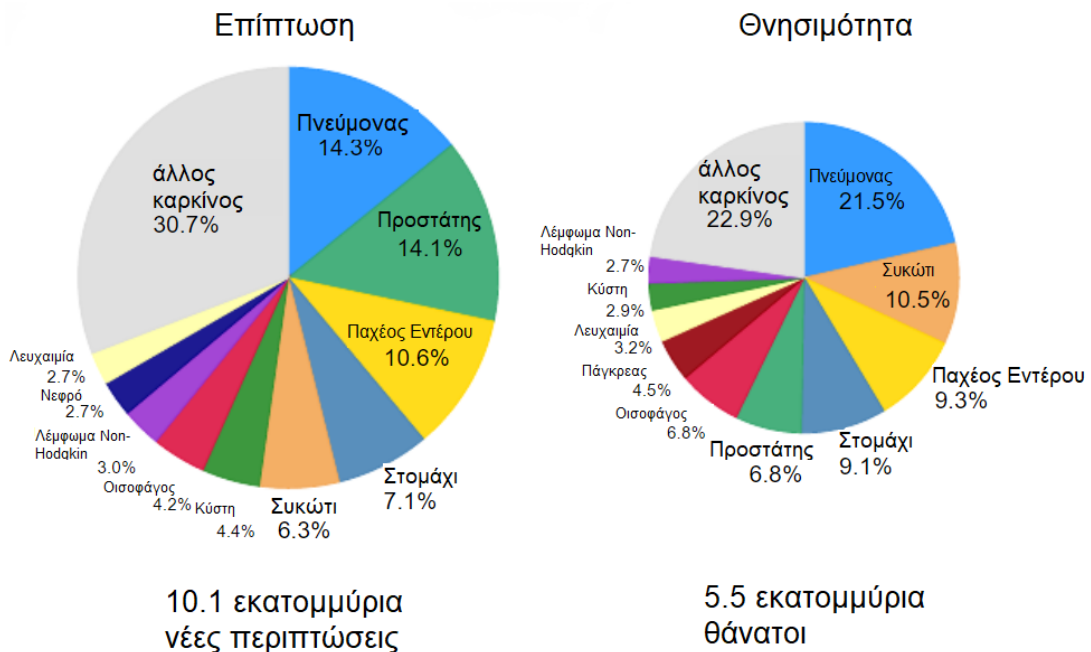


Εικόνα 5. Σύνθεση στεροειδών σε βασικά όργανα και υποδοχείς στεροειδών στους αδένες του προστάτη και του μαστού. Πηγή: Clinical significance of ERβ in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Science* 106 (4): 337-343 (2015), <https://doi.org/10.1111/cas.12613>.

1.2 Ο καρκίνος του προστάτη

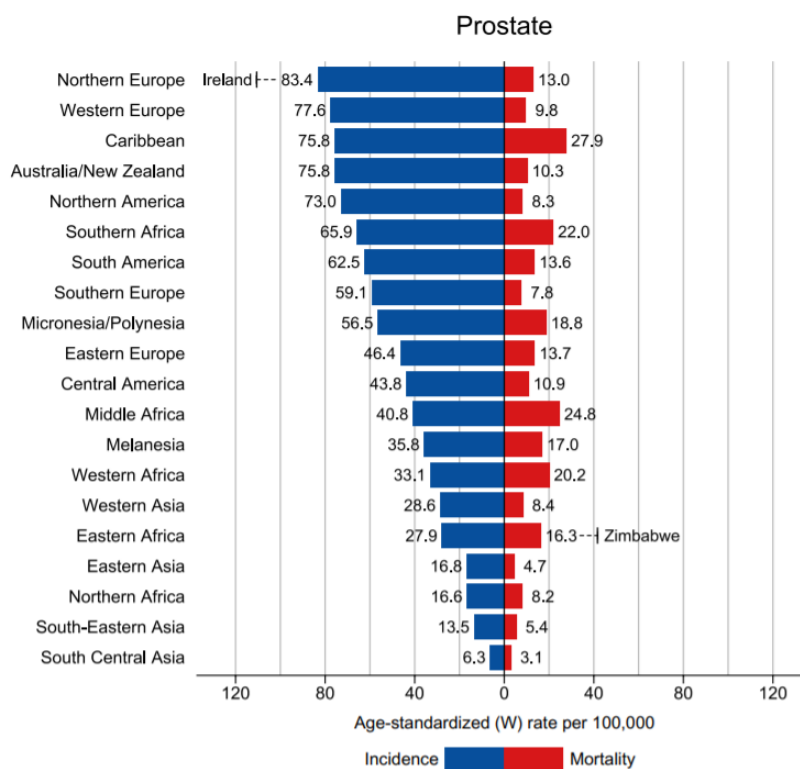
1.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τον δεύτερο σε συχνότητα τύπο καρκίνου στους άρρενες και αποτελεί την πέμπτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Κατανομή νέων περιπτώσεων και θανάτων για τους 10 πιο συχνούς καρκίνους στα άρρενα άτομα. Απεικονίζεται το ποσοστό του συνολικού αριθμού περιπτώσεων ή θανάτων το 2020. Πηγή: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA CANCER J CLIN 2021; 0:1–41 <https://doi/10.3322/caac.21660>

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τον συχνότερα διαγνωσμένο καρκίνο στους άρρενες σε τουλάχιστον 112 χώρες. Το 2020 καταγράφονται περίπου 1.400.000 νέες περιπτώσεις και 375.000 θάνατοι παγκοσμίως. Παρατηρείται μεγάλη γεωγραφική ετερογένεια παγκοσμίως ως προς την συχνότητα εμφάνισης. Υψηλότερα ποσοστά καταγράφονται στην Βόρεια και Δυτική Ευρώπη, στην Καραϊβική, στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία, στη Βόρεια Αμερική και στη Νότια Αφρική, ενώ η Ασία και η Βόρεια Αφρική σημειώνουν τα μικρότερα ποσοστά εμφάνισης (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Ποσοστά εμφάνισης νέων περιπτώσεων και θνησιμότητας ανά περιοχή για τον καρκίνο του προστάτη. Τα ποσοστά εμφανίζονται σε φθίνουσα σειρά. Πηγή: Globocan 2020.

Για μία νόσο τόσο συχνή όπως ο καρκίνος του προστάτη, λίγα είναι γνωστά όσον αφορά την επιδημιολογία του. Κύριοι παράγοντες κινδύνου θεωρούνται η ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό, η φυλή και ορισμένες μεταλλάξεις. Τα τελευταία χρόνια βέβαια παρατηρούνται διακυμάνσεις ως προς τη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του προστάτη. Οι διαφορές αυτές αποδίδονται στον τρόπο ζωής, σε περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και στις διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις μεταξύ των χωρών. Σε πολλές χώρες στη Βόρεια και Δυτική Ευρώπη παρατηρείται μείωση της συχνότητας εμφάνισης που αντανακλά την υιοθέτηση του PSA ελέγχου. Αντιθέτως σε χώρες της Ανατολικής Ευρώπης παρατηρείται αυξητική τάση.

Αναφορικά με την ηλικία τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη και τα ποσοστά θνησιμότητας συσχετίζονται με την ηλικία, με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης να παρατηρείται σε άνδρες ηλικίας άνω των 65 ετών. Συγκεκριμένα μόλις 1 στους 350 άνδρες θα διαγνωστεί με καρκίνο του προστάτη σε ηλικία κάτω των 50 ετών. Το ποσοστό αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας και σε άνδρες ηλικίας άνω των 65 ετών το ποσοστό επίπτωσης είναι σχεδόν 60%⁷.

Επιπρόσθετα, οι Αφροαμερικανοί κατέχουν τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης του καρκίνου του προστάτη, με περίπου 158,3 νέες περιπτώσεις να διαγιγνώσκονται ανά 100.000 άνδρες, ενώ η θνησιμότητά τους είναι σχεδόν διπλάσια έναντι των Καυκάσιων. Οι διαφορές που παρατηρούνται αποδίδονται σε περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες^{7,8,9}.

Όσο αναφορά την Ελλάδα, σύμφωνα με τα δεδομένα του WHO (World Health Organization) το 2020 αναφέρονται 6.217 νέες περιπτώσεις (17.1%) και καταγράφονται καταγράφηκαν συνολικά 1.835 θάνατοι κατατάσσοντας τον καρκίνο του προστάτη στην τέταρτη θέση όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης και στην Πέμπτη θέση όσον αφορά στη θνησιμότητα του εν λόγω καρκίνου (Εικόνα 8). Το ποσοστό θνησιμότητας που καταγράφηκε, προσαρμοσμένο στην ηλικία που προσβάλλει ο καρκίνος, ήταν 13.51 ανά 100.000 άτομα του πληθυσμού.¹

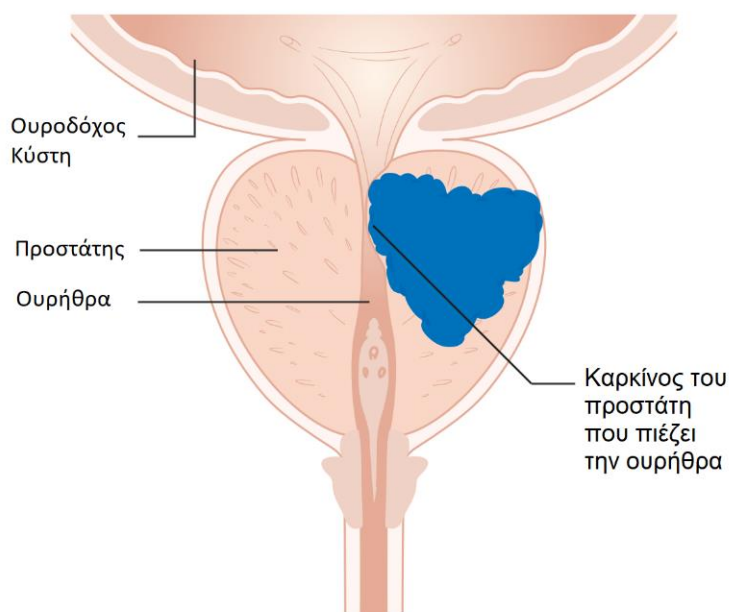
Greece Source: Globocan								
Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site								
Cancer	New cases				Deaths			
	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Rank	(%)	Cum.risk
Lung	8 960	1	13.9	4.52	7 662	1	23.1	3.67
Breast	7 772	2	12.0	7.63	2 333	3	7.0	1.50
Colon	6 529	3	10.1	2.54	3 431	2	10.3	0.90
Prostate	6 217	4	9.6	6.31	1 835	5	5.5	0.55
Bladder	5 645	5	8.7	2.67	1 543	6	4.7	0.42
Pancreas	2 302	6	3.6	0.96	2 097	4	6.3	0.84
Corpus uteri	2 117	7	3.3	2.35	483	16	1.5	0.35
Leukaemia	1 847	8	2.9	0.80	1 314	9	4.0	0.41
Liver	1 833	9	2.8	0.78	1 522	7	4.6	0.57
Kidney	1 808	10	2.8	0.89	692	11	2.1	0.23
Stomach	1 780	11	2.8	0.70	1 347	8	4.1	0.45
Non-Hodgkin lymphoma	1 554	12	2.4	0.84	606	13	1.8	0.22
Brain, central nervous system	1 401	13	2.2	0.70	1 082	10	3.3	0.51
Melanoma of skin	1 313	14	2.0	0.75	295	18	0.89	0.12
Thyroid	1 251	15	1.9	0.83	86	24	0.26	0.03
Rectum	1 220	16	1.9	0.52	499	15	1.5	0.14
Ovary	1 020	17	1.6	0.99	677	12	2.0	0.54
Multiple myeloma	917	18	1.4	0.38	590	14	1.8	0.18
Larynx	811	19	1.3	0.44	379	17	1.1	0.15
Cervix uteri	697	20	1.1	0.77	282	19	0.85	0.23
Lip, oral cavity	603	21	0.93	0.28	217	20	0.65	0.08
Hodgkin lymphoma	361	22	0.56	0.22	108	22	0.33	0.04
Testis	321	23	0.50	0.48	22	32	0.07	0.03
Oesophagus	247	24	0.38	0.11	210	21	0.63	0.09

Εικόνα 8. Συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητα των καρκίνων στην Ελλάδα (2020).

Πηγή: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/300-greece-fact-sheets>

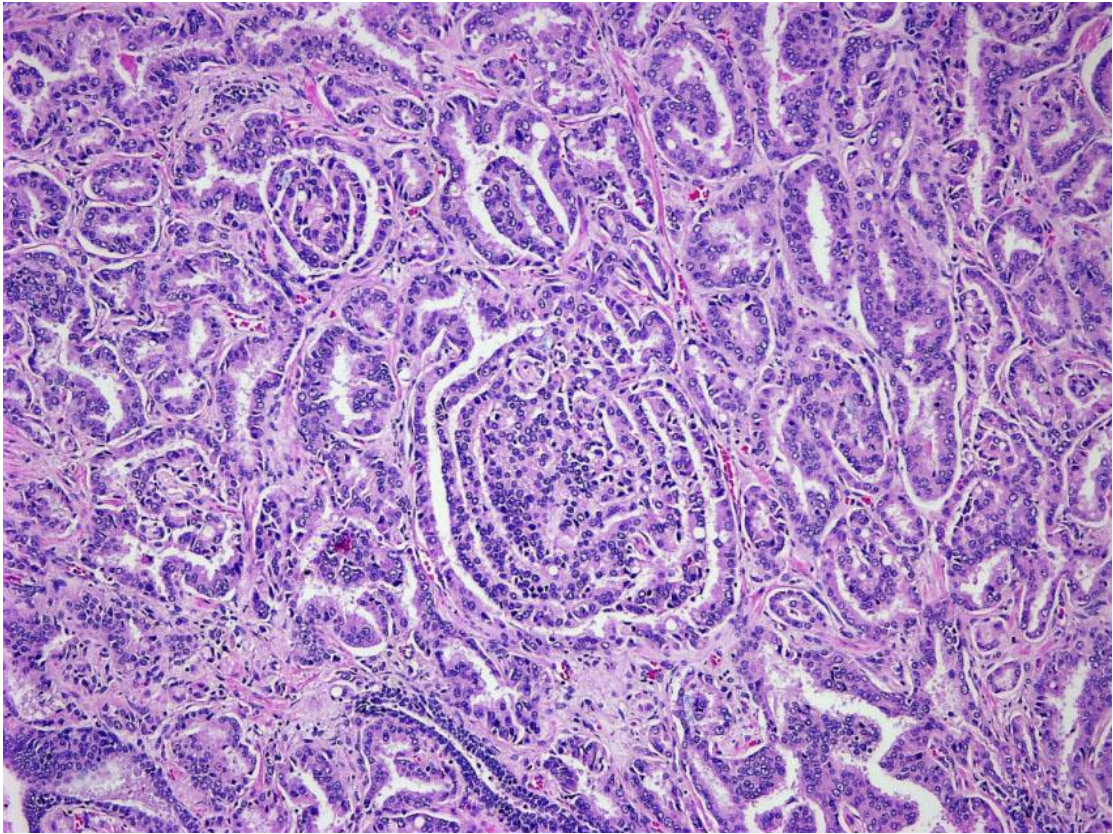
1.2.2 Ιστολογική ταξινόμηση

Ο καρκίνος του προστάτη δεν προκαλεί συνήθως συμπτώματα έως ότου ο όγκος έχει αυξηθεί αρκετά, ώστε να ασκήσει πίεση στην ουροδόχο κύστη. Ο προστάτης για να λειτουργήσει απαιτεί την παρουσία ανδρογόνου και συγκεκριμένα της τεστοστερόνης. Αυτός είναι και ένας από τους λόγους για τον οποίο η ορμονική θεραπεία στέρησης της τεστοστερόνης, είναι αποτελεσματική στην καταπολέμηση της νόσου.



Εικόνα 9. Απεικόνιση καρκίνου του προστάτη που πιέζει την ουρήθρα. CRUK 182.svg.(2020, July 27). Wikimedia Commons, the free media repository. Retrieved 08:57, October 10, 2020 from <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?>

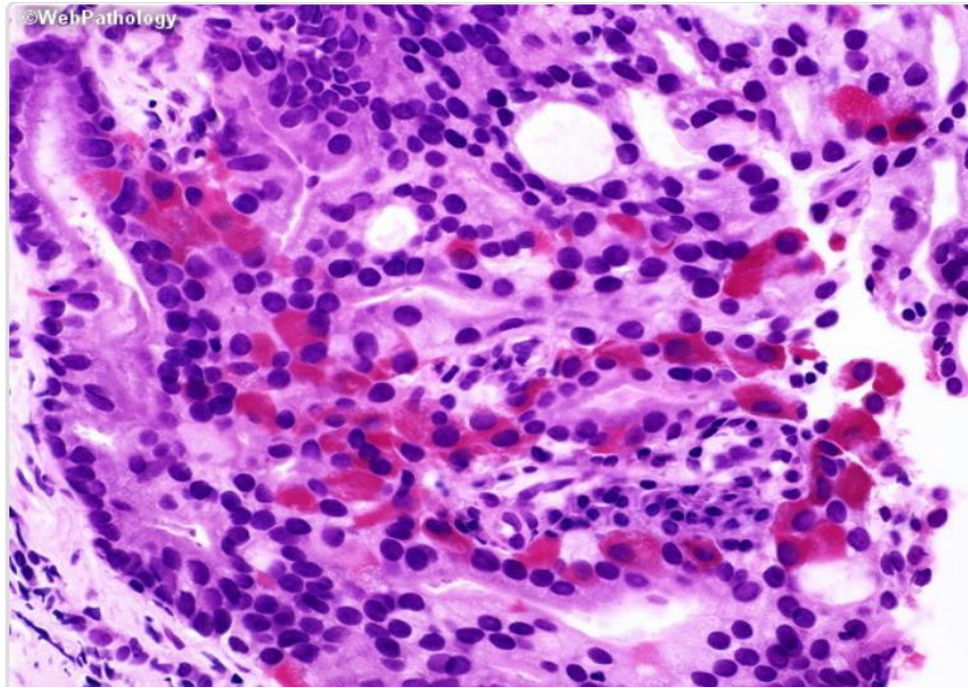
Η πλειοψηφία των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη (95%) αφορά σε αδενοκαρκινώματα, νεοπλάσματα επιθηλιακής προέλευσης. Η μορφολογία του αδενοκαρκινώματος ποικίλει από καλώς διαφοροποιημένο με σαφείς αδενικούς σχηματισμούς, έως χαμηλής διαφοροποίησης, συχνά δύσκολα ταυτοποιήσιμο. Κοινό χαρακτηριστικό αποτελεί η απουσία των βασικών κυττάρων (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Μορφολογικά χαρακτηριστικά αδενοκαρκινώματος προστάτη (X10).

Πηγή: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/prostateadenoNOS>

Οι υπόλοιποι ιστολογικοί τύποι αποτελούν το υπόλοιπο 5% των προστατικών νεοπλασμάτων και εδώ ανήκουν το νευροενδοκρινές και το ουροθηλιακό καρκίνωμα, καθώς και τα προερχόμενα από το στρώμα ραβδομυοσάρκωμα και λειομυοσάρκωμα (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Καρκίνος προστάτη με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση. Παρατηρούνται νευροενδοκρινή κύτταρα με μεγάλα ηωσινόφιλα κοκκία (χρώση H/E).

Πηγή: <https://www.webpathology.com/image.asp?n=23&Case=23>

Τα νεοπλασματικά κύτταρα αναπτύσσονται, πολλαπλασιάζονται και επεκτείνονται στον αμέσως προσκείμενο ιστό του προστάτη σχηματίζοντας μία μάζα όγκου. Ένας τέτοιος όγκος μπορεί να αναπτυχθεί και έξω από τον προστάτη ως εξωκαψική επέκταση ή μπορεί να παραμείνει εντός του για δεκαετίες^{10,11}.

Ο καρκίνος του προστάτη συνήθως κάνει μεταστάσεις στα οστά και τους λεμφαδένες. Οι μεταστάσεις στο οστό πιστεύεται ότι είναι εν μέρει αποτέλεσμα της σύνδεσης του προστατικού φλεβικού πλέγματος με τις σπονδυλικές φλέβες^{12,13}.

1.3 Διάγνωση

Η πλειοψηφία των καρκίνων του προστάτη αναπτύσσονται συνήθως αργά, ωστόσο υπάρχουν πάντα και εξαιρέσεις. Όπως ισχύει για όλους τους καρκίνους, έτσι και ο καρκίνος του προστάτη μπορεί να αντιμετωπιστεί επιτυχώς, εάν ανακαλυφθεί νωρίς. Παραδοσιακά μπορεί να διαγνωστεί με δακτυλική εξέταση από τον ουρολόγο (DRE), εξέταση αίματος για τη μέτρηση των επιπέδων του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA), ακολουθούμενη από βιοψία καθοδηγούμενη από υπερηχογράφημα (TRUS)¹⁴.

1.3.1 Δακτυλική εξέταση (DRE, Digital Rectal Exam)

Η δακτυλική εξέταση του προστάτη DRE πρέπει να πραγματοποιείται σε όλους τους άντρες ηλικίας άνω των 50 ετών. Γίνεται με τον δείκτη του χεριού του ουρολόγου, μέσω του ορθού. Είναι μία βασική εξέταση αφού δίνει τις πρώτες πληροφορίες για το μέγεθος, το σχήμα, την υφή του προστάτη και την πιθανή ύπαρξη σκληρίας κάτι το οποίο στη συνέχεια υπαγορεύει τη διενέργεια επιπλέον εξετάσεων, όπως το υπερηχογράφημα ή η βιοψία προστάτη [14]. Η δακτυλική εξέταση έχει περιορισμένη ικανότητα ανίχνευσης όγκων δυνητικώς ιάσιμων. Παρουσιάζει ευαισθησία και ειδικότητα που δεν ξεπερνούν το 70%, έχει μικρή θετική προγνωστική αξία (11-26%) και σχετικά υψηλή αρνητική προγνωστική αξία (85-96%). Στα πλεονεκτήματα συγκαταλέγεται επίσης το γεγονός ότι είναι ανέξοδη και μη επεμβατική εξέταση.

1.3.2 Μέτρηση επιπέδων ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA, Prostate Specific Antigen)

Ο έλεγχος των επιπέδων PSA στο αίμα ως δείκτης για την ύπαρξη του καρκίνου στον προστάτη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1987. Το PSA (Prostate-Specific Antigen) ή Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του προστατικού αδένου και κωδικοποιείται από το γονίδιο *KLK3* που βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 19q 13.3-13.4. Έχει μοριακό βάρος 33KD και αποτελείται από 240 αμινοξικά κατάλοιπα. Το PSA ανήκει στην οικογένεια των καλλικρεϊνών και έχει δράση πρωτεάσης σερίνης. Ανιχνεύεται φυσιολογικά σε χαμηλά επίπεδα στον ορό του αίματος και η εκτίμηση των επιπέδων του στο αίμα αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους κλινικούς δείκτες για την ανίχνευση του καρκίνου αλλά και άλλων παθήσεων του προστάτη. Ο δείκτης παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία, ωστόσο χαρακτηρίζεται από μειωμένη ειδικότητα, καθώς υψηλές τιμές ανιχνεύονται και σε μη νεοπλασματικές περιπτώσεις (π.χ. φλεγμονές, καλοήθεις αλλοιώσεις).

Το PSA στον ορό του αίματος εμφανίζεται σε δύο μορφές, είτε ελεύθερο, είτε δεσμευμένο με κάποια πρωτεΐνη αναστολέα, όπως η άλφα-1-αντιχυμοτροψίνη και η άλφα-2-μακροσφαιρίνη. Οι κυριότερες μορφές του PSA είναι οι εξής:

- Ελεύθερο PSA το οποίο είναι μια ενζυματικά ανενεργή μορφή, η οποία δεν συνδέεται με αναστολείς και αποτελεί τη κυριότερη μορφή του PSA. Απαντάται σε τρεις μοριακές μορφές που υπάρχουν ισόποσα στον ορό.
- PSA-ACT, το οποίο προκύπτει από τη σύνδεση του ελεύθερου PSA με τον αναστολέα άλφα-1-αντιχυμοτροψίνη (alfa-1-antichymotrypsin). Πρόκειται για την επικρατέστερη και ενεργό μορφή του PSA στον ορό. Οι ασθενείς με καρκίνο του προστάτη εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα της μορφής αυτής στον ορό τους σε σύγκριση με τα υγιή άτομα ή με άτομα που έχουν καλοήγη υπερπλασία του προστάτη.
- PSA-a₂M, δηλαδή PSA συνδεδεμένο με την άλφα-2-μακροσφαιρίνη (alpha-2-macroglobulin, a₂M) δημιουργώντας μία μορφή που δεν είναι ανιχνεύσιμη¹⁵.

Οι τιμές του PSA ανιχνεύονται με μία απλή εξέταση αίματος. Η μέγιστη φυσιολογική τιμή είναι 4 ng/mL. Για τιμές από 2.5-44 ng/mL γίνεται εξέταση ελεύθερου PSA και προσδιορίζεται η αναλογία ελεύθερου/ολικού PSA. Τιμές του PSA μεγαλύτερες από 4 ng/mL αξιολογούνται μαζί με άλλα ευρήματα, ενώ στις περιπτώσεις που οι τιμές που ξεπερνούν τα 10 ng/mL απαιτείται βιοψία.

Αυξημένα επίπεδα PSA, σε τιμές που δεν ξεπερνούν τα 10 ng/mL, παρατηρούνται επίσης και σε καλοήγη υπερτροφία του προστάτη, η οποία αυξάνει το PSA και δημιουργεί υψηλότερη αναλογία ελεύθερου προς ολικό PSA. Τα μεγαλύτερης ηλικίας άρρενα άτομα παρουσιάζουν ελαφρώς υψηλότερες τιμές PSA. Επιπρόσθετα, αξιολογείται και η ανοδική τάση στα επίπεδα τιμών του PSA. Ακόμη και αν η τιμή του PSA είναι εντός των φυσιολογικών ορίων, αν η τιμή του PSA αυξάνεται κατά 0.75 ng/mL ανά έτος, η αύξηση αυτή θεωρείται μη φυσιολογική και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (Πίνακας 1)¹⁶⁻¹⁸.

Πίνακας 1. Αξιολόγηση των επιπέδων του PSA στον ορό.

Επίπεδα PSA (ng/mL)	Ερμηνεία
<4	Φυσιολογικά επίπεδα PSA
4-10	20-25% πιθανότητα ύπαρξης καρκίνου. Πιθανώς να διεξαχθεί εξέταση βιοψίας.
>10	>50% πιθανότητα ύπαρξης καρκίνου. Η βιοψία ενδείκνυται συνήθως.
Αύξηση >0,75 ng/mL/έτος	Απαραίτητη η εξέταση από ουρολόγο.

1.3.3 Διορθικό Υπερηχοτομογράφημα (TRUS, TransRectal UltraSound)

Μία άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την διάγνωση του καρκίνου του προστάτη είναι το διορθικό υπερηχοτομογράφημα TRUS (Transrectal Ultrasound). Αποτελεί τη βασική απεικονιστική εξέταση με την οποία εντοπίζονται ύποπτες περιοχές στον προστατικό αδένα. Το υπερηχογράφημα γίνεται με ένα μηχάνημα υπερήχων το οποίο διαθέτει ειδική κεφαλή για την εξέταση του προστάτη. Η εξέταση γίνεται συνήθως από ακτινολόγο ή ουρολόγο. Η μέθοδος έχει χαμηλή ειδικότητα και συνήθως συνοδεύεται από βιοψία. Χρησιμοποιείται όμως ευρέως γιατί είναι απλή στη χρήση μέθοδος, με την οποία μπορεί να προσδιοριστεί το μέγεθος και το σχήμα του προστάτη και του πιθανού όγκου. Ωστόσο, δεν μπορεί να διακρίνει τους καλοήθεις και κακοήθεις ¹⁹.

Ο βαθμός της υπόηχης περιοχής στον καρκίνο του προστάτη ποικίλλει και πιθανόν εξαρτάται από τη πυκνότητα των καρκινικών κυττάρων ανά μονάδα όγκου²⁰. Η ποικιλία στη πυκνότητα και στην υποηχογένεια δεν σχετίζεται απαραίτητα με το μέγεθος της νεοπλασματικής εστίας. Ο καρκίνος του προστάτη επεκτείνεται με διήθηση και δεν προκαλεί αντιδραστικό ιστό²¹.

1.3.4 Διορθική Βιοψία προστάτη

Η διορθική κατευθυνόμενη διά βελόνης βιοψία του προστάτη για την ανεύρεση καρκίνου είναι ευρέως διαδεδομένη μέθοδος στα περισσότερα κέντρα του κόσμου^{22,23}. Πρόκειται για απλή μέθοδο, η οποία πραγματοποιείται σε εξωτερικούς ασθενείς και επιτρέπει τη λήψη πολλαπλών βιοψιών κατά κανόνα χωρίς αναισθησία²⁴.

Ο προστάτης εντοπίζεται με τη βοήθεια ειδικής κεφαλής υπερήχων που εισάγεται από το ορθό. Στη συνέχεια με τη βοήθεια ειδικής λεπτής βελόνας, η οποία είναι προσαρμοσμένη σε ένα αυτόματο εργαλείο που ονομάζεται πιστόλι βιοψίας, γίνεται λήψη δύο δειγμάτων από τη βάση, το μέσο τμήμα και την κορυφή του προστάτη και στις δύο πλευρές του. Συνολικά λαμβάνονται 10 με 13 τομές ιστών από τον προστατικό αδένα. Ο σκοπός της βιοψίας είναι να προσδιοριστεί καλύτερα η έκταση και η ακριβής θέση του όγκου. Η βιοψία δεν ενδείκνυται σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή, την οποία θα πρέπει να σταματήσουν μία εβδομάδα νωρίτερα, ώστε να υποβληθούν σε βιοψία. Οι επιπλοκές της βιοψίας διακρίνονται σε χαμηλής και υψηλής βαρύτητας με τη σηψαιμία να αποτελεί τη σοβαρότερη, αλλά σπάνια επιπλοκή^{25,26}.

Οι τομές αξιολογούνται από ιατρό παθολογοανατόμο. Η βιοψία μπορεί να είναι αρνητική, χωρίς ενδείξεις κακοήθειας, ή να είναι θετική, επιβεβαιώνοντας νεόπλασμα ή ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία PIN (Prostatic Intraepithelial Neoplasia)^{27,28}.

1.3.5 Μαγνητική τομογραφία (MRI, Magnetic Resonance Imaging)

Μία άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ενεργό παρακολούθηση του προστάτη είναι η μαγνητική τομογραφία MRI. Αποτελεί ένα τυπικό μέσο απεικόνισης του προστάτη που επιτρέπει την εντόπιση και αξιολόγηση ύποπτων οζιδίων (μικροί ψηλαφητοί καλοήθεις ή κακοήθεις όγκοι) στον προστάτη. Συμβάλλει στον εντοπισμό της θέσης του πιθανού καρκίνου, στη σταδιοποίησή του, στον έλεγχο της εξωκαψικής επέκτασης και στην διεύρυνση των περιφερειακών λεμφαδένων για πρόωμη μετάσταση του όγκου. Η ακρίβεια της σταδιοποίησης ποικίλλει από 83 έως 89% και η ευαισθησία κυμαίνεται μεταξύ 88 -90 %²⁹.

1.4. Σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη

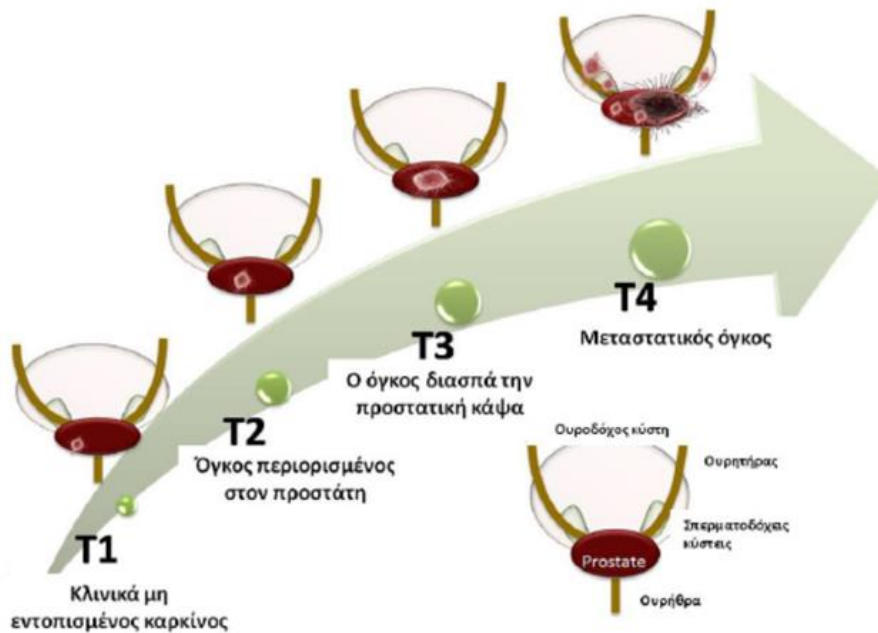
Η διάγνωση του καρκίνου του προστάτη συνοδεύεται από ορισμένα χαρακτηριστικά που καθορίζουν το στάδιο και τον βαθμό κακοηθείας του συγκεκριμένου νεοπλασματος. Εκτιμάται το μέγεθος του όγκου αλλά και η πιθανή παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Το σύστημα σταδιοποίησης κατά TNM και το σύστημα ταξινόμησης κατά Gleason αποτελούν τα δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα ταξινόμησης στον καρκίνο του προστάτη^{30,31}.

1.4.1 Σταδιοποίηση με το σύστημα TNM

Το σύστημα σταδιοποίησης κατά TNM (Tumor – Lymph node – Metastasis) των οργανισμών UICC (Union for International Cancer Control) και AJCC (American Joint Committee on Cancer) είναι το συχνότερα χρησιμοποιούμενο σύστημα ταξινόμησης των όγκων. Το σύστημα περιγράφει την εστία του πρωτοπαθούς όγκου (T), το βαθμό προσβολής των επιχώριων λεμφαδένων (N) και την πιθανή ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων (M).

Η κλινική ταξινόμηση (cTNM) σχετίζεται κυρίως με τα αποτελέσματα της φυσικής εξέτασης ή της απεικόνισης και πραγματοποιείται πριν τη θεραπεία ή όταν δεν είναι εφικτή η παθολογοανατομική ταξινόμηση. Ο συμβολισμός (p) αναφέρεται στην παθολογοανατομική ταξινόμηση του TNM και βασίζεται στα ευρήματα της ιστολογικής εξέτασης (μακροσκοπικά και μικροσκοπικά) μετά τη χειρουργική επέμβαση.

Το pT συνεπάγεται εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου ή βιοψία κατάλληλη προς αξιολόγηση. Ο συμβολισμός pN προϋποθέτει την αξιολόγηση αντιπροσωπευτικού αριθμού λεμφαδένων, ώστε να βεβαιωθεί η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και το pM αφορά στη μικροσκοπική εξέταση των απομακρυσμένων εστιών (μεταστάσεις) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σταδιοποίηση κατά TNM του καρκίνου του προστάτη. Με ροζ χρώμα απεικονίζεται η έκταση του καρκίνου προστάτη. Πηγή: <https://poulakis-urology.com/article/pathiseis-prostati-eisagogi/stadiopoiisi-staging-tou-karkinou-tou-prostati/>

Αναλυτικά, ο συμβολισμός (T) περιγράφει το μέγεθος του όγκου. Υπάρχουν τέσσερα κύρια στάδια, T1 έως T4. Το T1 σημαίνει ότι ο όγκος είναι πολύ μικρός για να φανεί σε κάποια σάρωση ή εξέταση του προστάτη. Το T2 σημαίνει ότι ο όγκος περιορίζεται μέσα στον προστάτη. Το T3 σημαίνει ότι ο καρκίνος έχει σπάσει την προστατική κάψα. Το T4 σημαίνει ότι ο όγκος έχει εξαπλωθεί σε γειτονικά όργανα όπως, η ουροδόχος κύστη ή το πυελικό τοίχωμα.

Ο συμβολισμός (N) περιγράφει εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες και διακρίνεται σε N0 και N1. N0 σημαίνει ότι οι κοντινοί λεμφαδένες δεν περιέχουν νεοπλασματικά κύτταρα, ενώ N1 δηλώνει παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων στους λεμφαδένες. Ο συμβολισμός (M) δηλώνει την παρουσία ή απουσία μεταστάσεων. Το M0 δηλώνει την απουσία μεταστάσεων, ενώ το M1 δηλώνει παρουσία μεταστάσεων (Πίνακας 2)³².

Πίνακας 2. Σύστημα ταξινόμησης του καρκίνου του προστάτη κατά TNM (Tumor-Node-Metastasis) 8η Έκδοση³³.

T	Πρωτοπαθής όγκος
TX	Ο πρωτοπαθής όγκος δε δύναται να εκτιμηθεί
T0	Χωρίς ενδείξεις πρωτοπαθούς όγκου
T1	Κλινικά μη εμφανής όγκος, μη ψηλαφητός ή ορατός με απεικονιστικές μεθόδους
T1a	Τυχαίο ιστολογικό εύρημα σε λιγότερο από το 5% του αφαιρεθέντος ιστού
T1b	Τυχαίο ιστολογικό εύρημα σε περισσότερο από το 5% του αφαιρεθέντος ιστού
T1c	Όγκος που ανευρέθηκε με βιοψία προστάτη (π.χ. αυξημένο PSA)
T2	Όγκος εντοπισμένος στον προστάτη ¹
T2a	Ο όγκος καταλαμβάνει το ήμισυ ή λιγότερο του ενός λοβού
T2b	Ο όγκος καταλαμβάνει περισσότερο από το ήμισυ του ενός λοβού, όχι όμως και τους δύο λοβούς
T2c	Ο όγκος καταλαμβάνει και τους δύο λοβούς
T3	Όγκος που επεκτείνεται πέραν της προστατικής κάψας ²
T3a	Εξωκαψική επέκταση (ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη)
T3b	Ο όγκος επεκτείνεται στη σπερματοδόχο κύστη(εις)
T4	Ο όγκος είναι καθηλωμένος ή διηθεί γειτονικές δομές εκτός των σπερματοδόχων κύστεων: έξω σφιγκτήρα, ορθό, ανελκτήρα του πρωκτού και/ή πυελικά τοιχώματα.
N	Επιχώριοι λεμφαδένες³
NX	Μη εκτιμητέοι λεμφαδένες
N0	Απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων
N1	Μετάσταση σε επιχώριους λεμφαδένες
M	Απομακρυσμένες μεταστάσεις⁴
M0	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	Απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1a	Σε μη-επιχώριο λεμφαδένα(ες)
M1b	Οστικές μεταστάσεις
M1c	Εντόπιση σε άλλα όργανα (ήπαρ, πνεύμονες κ.α.)

Επεξηγήσεις:

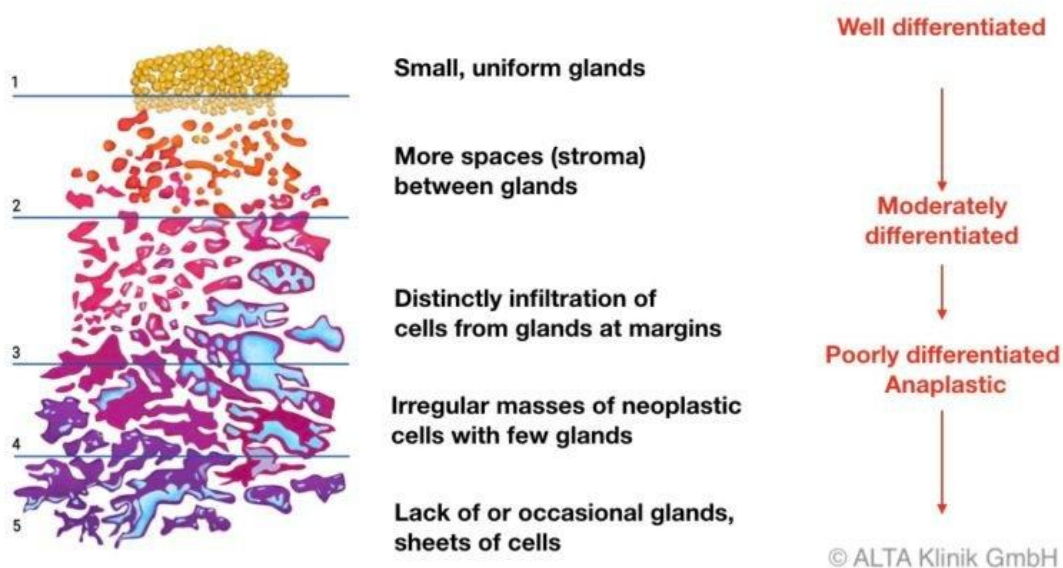
1. Όγκος που ανευρίσκεται και στους δύο λοβούς στη βιοψία, αλλά είναι μη ψηλαφητός ή δεν απεικονίζεται, ταξινομείται ως T1c.
2. Επέκταση στην κορυφή του προστάτη ή εντός (αλλά όχι πέραν) της προστατικής κάψας δεν ταξινομείται ως T3, αλλά T2.
3. Επιχώριοι είναι οι λεμφαδένες κάτω από τον διχασμό της κοινής λαγονίου αρτηρίας. Η εντόπιση δεν μεταβάλλει την ταξινόμηση.
4. Όταν εντοπίζονται περισσότερες από μια μεταστατικές εστίες, χρησιμοποιείται αυτή με το μεγαλύτερο στάδιο.

1.4.2 Βαθμονόμηση κατά Gleason.

Το σύστημα βαθμονόμησης κατά Gleason αναπτύχθηκε το 1966. Από τότε έχουν γίνει αρκετές τροποποιήσεις, ωστόσο παραμένει έως σήμερα σημαντικός προγνωστικός παράγοντας εξέλιξης της νόσου. Λαμβάνει υπόψη κι αξιολογεί μικροσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως το σχήμα και η διεύθυνση των λοβιδίων, τα χαρακτηριστικά και τα όρια μεταξύ των κυττάρων, ο βαθμός της παραμόρφωσης του πυρήνα, ο αριθμός και το μέγεθος των πυρηνίων, η διήθηση των λεμφικών ή αγγειακών κλάδων και το μέγεθος της νεοπλασματικής εστίας. Το σύστημα Gleason χρησιμοποιεί αποκλειστικά το λοβίδιο³⁴.

Το σύστημα βαθμονόμησης κατά Gleason περιλαμβάνει μία κλίμακα 5 επιπέδων με βάση την αρχιτεκτονική του όγκου και τα χαρακτηριστικά των αδενίων. Το επίπεδο 1 αντιστοιχεί στο καλύτερης διαφοροποίησης πρότυπο, ενώ το επίπεδο 5 στο χαμηλότερης διαφοροποίησης πρότυπο. Δεδομένου ότι ο καρκίνος του προστάτη έχει συνήθως ετερογενή μορφή με δύο και πλέον αρχιτεκτονικά πρότυπα, η τελική βαθμολογία (Gleason score) προκύπτει από το άθροισμα των βαθμολογιών της επικρατέστερης περιοχής (πρωτεύον πρότυπο) και της αμέσως επόμενης περιοχής (δευτερεύον πρότυπο) (Εικόνα 13)³⁵⁻³⁷.

Gleason's Pattern Scale



Εικόνα 13. Σύστημα βαθμονόμησης κατά Gleason. Πηγή: <https://www.altaklinik.com/prostate/prostate-cancer/gleason-score/>

Αναλυτικότερα:

- Το **Gleason πρότυπο 1**, χαρακτηρίζεται από ομοιόμορφα, μεσαίου μεγέθους ως επί το πλείστον, πυκνά διατεταγμένα αδένια χωρίς διεισδυτικό μοτίβο.
- Το **Gleason πρότυπο 2 (1+1)**, αφορά σε στρογγυλά ή ωοειδή αδένια, όχι τόσο ομοιόμορφα όσο στο πρότυπο 1, με ομαλούς αυλούς.
- Το **Gleason πρότυπο 3** είναι το συχνότερο πρότυπο ανάπτυξης. Τα αδένια συχνά διηθούν μεταξύ των φυσιολογικών αδένων και είναι ποικίλου μεγέθους, ανομοιόμορφα.
- Το **Gleason πρότυπο 4** αφορά σε πιο προχωρημένη νόσο. Χαρακτηρίζεται από σύντηξη των αδενίων, ηθμοειδείς σχηματισμούς ή υποτυπώδη αδένια. Συχνά δεν παρατηρείται στρώμα μεταξύ των αδενίων και τα όρια είναι ανώμαλα και διηθητικά.
- Το **Gleason πρότυπο 5** είναι το πιο επιθετικό μοτίβο. Εδώ τα αδένια απουσιάζουν και τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζονται ως συμπαγείς αθροίσεις, νησίδες ή μεμονωμένα κύτταρα που διηθούν το στρώμα. Σπάνια διακρίνονται αυλοί. Στο κέντρο των συμπαγών ομάδων μπορεί να υπάρχει νέκρωση (Πίνακας 3) ³⁸.

Πίνακας 3. Κλίμακα βαθμονόμησης κατά Gleason.

Gleason Score	Grade Group	Characteristics
6	Grade Group 1	<ul style="list-style-type: none">• Less aggressive• Very slow growing• Low risk
3 + 4 = 7	Grade Group 2	<ul style="list-style-type: none">• Slightly aggressive• Slow growing• Low to Intermediate risk
4 + 3 = 7	Grade Group 3	<ul style="list-style-type: none">• Moderately aggressive• Fast growing• Intermediate to High risk
8	Grade Group 4	<ul style="list-style-type: none">• Aggressive• Rapidly growing• High risk
9-10	Grade Group 5	<ul style="list-style-type: none">• Highly aggressive• Rapidly growing• High risk

Πηγή: <https://news.navigateprostate.com.au/2019/07/03/what-is-the-gleason-score-for-prostate-cancer/>

1.5 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη

Όπως προαναφέρθηκε στους κύριους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη συγκαταλέγονται η ηλικία, φυλή, το οικογενειακό ιστορικό-κληρονομικότητα και η διατροφή (παχυσαρκία).

Ηλικία: Ο καρκίνος του προστάτη θεωρείται πάθηση της τρίτης ηλικίας. Σύμφωνα με μελέτες ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αρχίζει να αυξάνεται απότομα στην ηλικία άνω των 55 ετών και κορυφώνεται στην ηλικία των 70-74 ετών³⁹. Το 75% περίπου των ανδρών άνω των 80 ετών παρουσιάζουν ορισμένες ενδείξεις λανθάνουσας νόσου.

Διατροφή - Παχυσαρκία: Οι διατροφικές συνήθειες, το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ και η παχυσαρκία θεωρούνται από την επιστημονική κοινότητα ως παράγοντες προδιάθεσης. Οι υπέρβαροι άνδρες παρουσιάζουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου αργά εξελισσόμενου, αλλά υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ταχέως αναπτυσσόμενου, δηλαδή πιο επιθετική μορφή καρκίνου. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά, καλοψημένα κρέατα και ασβέστιο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προχωρημένης νόσου. Βέβαια, σε αρκετές μελέτες τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Πιστεύεται ότι οι αλλαγές στον μεταβολισμό και οι μεταβολές των ενδογενών ορμονών επιδρούν στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Στις περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες δεν βρέθηκε εμφανής συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης ψαριών και ψευδαργύρου και του καρκίνου ⁴⁰⁻⁴⁴.

Φυλή: Πλήθος επιδημιολογικών μελετών έχει αναδείξει διακυμάνσεις ως προς τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη μεταξύ διαφορετικών φυλών. Οι Αφροαμερικανοί κατέχουν τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, και παρουσιάζουν σχεδόν διπλάσια θνησιμότητα έναντι των Καυκάσιων. Οι διαφορές που παρατηρούνται αποδίδονται κυρίως σε περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες ⁴⁵.

Οικογενειακό ιστορικό -κληρονομικότητα: Ο καρκίνος του προστάτη είναι κατά 85% σποραδικός και κατά 15% οικογενής. Η ύπαρξη συγγενούς πρώτου βαθμού αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Σε έναν αριθμό ασθενών, της τάξης 30-40% με πρώιμη εμφάνιση καρκίνου του προστάτη, σε ηλικία μικρότερη των 55 ετών, εμπλέκονται γενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με την κληρονομική προδιάθεση. Αυτό υποδεικνύει το γενετικό υπόβαθρο της νόσου ⁴⁶⁴⁷⁴⁸⁴⁹⁵⁰.

Μεταλλάξεις του *BRCA* γονιδίου είναι σχετικά σπάνιες σε ασθενείς με καρκίνο προστάτη (<0.3%), ωστόσο υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του προστάτη σε άρρενα άτομα άνω των 65 ετών που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* (x 3.5 φορές) και *BRCA2* (x 8 φορές). Επιπρόσθετα, γονίδια που σχετίζονται με μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, όπως τα *PALB2*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* και *PMS2* ενοχοποιούνται για αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του προστάτη.

1.6. Γενετικό υπόβαθρο καρκίνου του προστάτη

Τα ποικίλα μορφολογικά χαρακτηριστικά του καρκίνου του προστάτη συνοδεύονται από πλήθος γενετικών αλλαγών. Οι συνηθέστερες αλλαγές που παρατηρούνται στο γονιδίωμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη είναι συντήξεις γονιδίων που οδηγούν σε υπερέκφραση των χιμαιρικών γονιδίων που προκύπτουν. Το οικογενειακό ιστορικό αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Ένας άντρας με έναν πρώτου βαθμού συγγενή, όπως είναι ο πατέρας ή ο αδελφός, με καρκίνο του προστάτη έχει διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ποσοστό το οποίο πενταπλασιάζεται σε περίπτωση που νοσούν περισσότεροι από ένας συγγενείς.

Κατά κανόνα, σε ποσοστό της τάξης του 10% περίπου των αρρένων ατόμων που εμφανίζουν καρκίνο του προστάτη, αυτό είναι αποτέλεσμα παρουσίας κάποιου σχετιζόμενου κληρονομικού συνδρόμου εμφάνισης. Μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο μαστού και ωοθηκών, όπως τα *BRCA1* και *BRCA2*, ενοχοποιούνται επίσης και στον κληρονομικό καρκίνο του προστάτη. Μεταλλάξεις σε γονίδια σχετιζόμενα με το σύνδρομο Lynch έχουν βρεθεί επίσης σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Επιπρόσθετα, ανιχνεύονται σε σημαντικά ποσοστά μεταλλάξεις σε γονίδια όπως το *HOXB13*, *TP53*, *CHEK2*, *ATM* που εμπλέκονται σε οδούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA.

Η πρώτη αναφορά για τη συσχέτιση του καρκίνου του προστάτη με κάποιον γενετικό τόπο δημοσιεύθηκε το 1996. Μια ομάδα ερευνητών από το Πανεπιστήμιο John Hopkins, στις ΗΠΑ ανέφερε συσχέτιση με τον γενετικό τόπο *1q24-25*, το οποίο ονομάστηκε *HPC1* (Hereditary Prostate Cancer 1). Έκτοτε, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες συσχέτισης του καρκίνου με γενετικούς τόπους⁵¹.

Η μελέτη του κληρονομικού καρκίνου του προστάτη επικεντρώθηκε κυρίως σε γενετικές αναλύσεις οικογενειών σε πληθυσμούς ευρωπαϊκής προέλευσης. Στις οικογένειες αυτές προσδιορίστηκε μια σειρά γονιδίων που ενοχοποιούνται για τον κληρονομικό καρκίνο του προστάτη. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται τα γονίδια *HPC1* (*1q24-25*), *PCAP* (*1q42-43*), *HPCX* (*Xq27-28*), *CAPB* (*1q36*), *HPC20* (*20q13*), *HOXB13*. Ανάλογες μελέτες έγιναν και σε άλλους πληθυσμούς. Πολλοί από αυτούς τους γενετικούς τόπους επικυρώθηκαν σε εθνικούς και γεωγραφικούς πληθυσμούς, υποδηλώνοντας κάποια κοινή προέλευση των γονιδίων προδιάθεσης καρκίνου του προστάτη⁵²⁻⁶³.

Ορισμένοι γενετικοί τόποι που εντοπίστηκαν από μελέτες σε οικογένειες έχουν επίσης εμπλακεί σε μελέτες GWAS (Genome Wide Association Study), δηλαδή μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος, και έχουν επιβεβαιωθεί σε πολλές εθνικές και φυλετικές ομάδες. Μεταξύ αυτών είναι οι γενετικοί τόποι *12q24*, *1q24-25* και *8q24*. Κλινικά σημαντικές συσχετίσεις έχουν εντοπιστεί ακόμα ανάμεσα στις κληρονομικές μεταλλάξεις του γονιδίου *BRCA2* και την επιθετική μορφή του καρκίνου του προστάτη⁶⁴⁻⁶⁶. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1*, *BRCA2* και *HOXB13* κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονόμησης, που σημαίνει ότι ένα αντίγραφο του μεταλλαγμένου γονιδίου σε κάθε κύτταρο είναι αρκετό για να αυξήσει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Πρέπει να σημειωθεί ότι κληρονομείται η προδιάθεση για την εμφάνιση της νόσου, χωρίς απαραίτητα να οδηγήσει σε εκδήλωση της ασθένειας. Οι μεταλλάξεις του *TP53* γονιδίου στον πρωτοπαθή καρκίνο του προστάτη είναι σχετικά σπάνιες και παρατηρούνται συχνότερα σε προχωρημένη και μεταστατική μορφή της νόσου, θεωρούνται επομένως δυσοίωνο εύρημα.

Παράλληλα, εκτός των μεταλλάξεων ένας μεγάλος αριθμός μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms) έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Οι πολυμορφισμοί αυτοί έχουν καταγραφεί σε γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς ανδρογόνων και βιταμίνης D, στο *HPC1*, στο *HPC2*, στο *HPCX*, στο *CAPB*, στα γονίδια επιδιόρθωσης *MLH1*, *MSH2* και *MSH6*, *PMS2*, καθώς και σε γονίδια όπως τα *HOXB13*, *CHEK2*, *BRIP1* που αλληλοεπιδρά με το γονίδιο *BRCA1*, και στην οικογένεια των γονιδίων *TMPRSS2-ETS* τα οποία τείνουν να προάγουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων⁶⁷⁻⁷⁵.

Τελευταία μελετώνται πολυμορφισμοί που επηρεάζουν την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων και προκαλούν αύξηση ή μείωση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Ορισμένοι από τους πολυμορφισμούς αυτούς ενδέχεται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μίας νόσου και ως εκ τούτου εκτιμάται η συχνότητά τους σε ποικίλους πληθυσμούς. Μεταξύ των πολυμορφισμών αυτών συγκαταλέγονται οι πολυμορφισμοί rs10993994 και rs2735839 των γονιδίων *MSMB* και *KLK3* αντίστοιχα^{76,77}.

1.7 Το γονίδιο *MSMB*

Μελέτες ευρείας γενωμικής ανάλυσης έχουν ταυτοποιήσει τον πολυμορφισμό rs10993994 (T>C) στο γονίδιο της μικροσεμινοπρωτεΐνης β (*MSMB*). Ο εν λόγω πολυμορφισμός ωστόσο παρουσιάζει αντικρουόμενα αποτελέσματα, καθώς ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η παρουσία τους σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, ενώ σύμφωνα με άλλες δεν έχει καμία επίδραση.

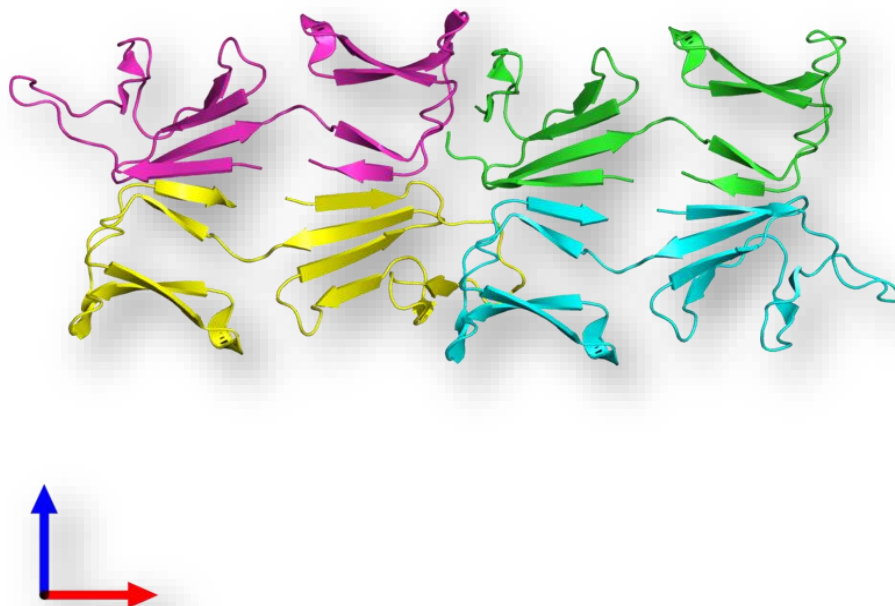
Το γονίδιο *MSMB* εδράζεται στο χρωμόσωμα 10 στη θέση 10q11.22. Κωδικοποιεί την προστατική εκκριτική πρωτεΐνη-94 (PSP94), μία από τις τρεις κύριες εκκρινόμενες πρωτεΐνες του προστάτη. Το γονίδιο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον προστάτη, στο ήπαρ, στο νεφρό και στο στήθος. Εκφράζεται επίσης στο πάγκρεας, στον οισοφάγο, στο στομάχι, στο δωδεκαδάκτυλο, στο παχύ έντερο, στην τραχεία, στους πνεύμονες, στους σιελογόνους αδένες και στη σάλπιγγα.

Η πρωτεΐνη PSP94 η οποία αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ως προστατική εκκριτική πρωτεΐνη 94 (PSP94), μικροσεμινοπρωτεΐνη (MSP), βήτα-μικροσεμινοπρωτεΐνη (*MSMB*), βήτα-ανασταλτίνη, προστατικό ανασταλτικό πεπτίδιο (PIP), είναι μια απλή, μη γλυκοζυλιωμένη, πολυπεπτιδική αλυσίδα 104 αμινοξέων και μοριακού βάρους 12 kDa (Εικόνα 14). Η PSP94 είναι μία από τις τρεις κύριες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη και έχει συγκέντρωση στο σπερματικό πλάσμα 0,5 έως 1 mg/mL ⁷⁸.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μέλος της οικογένειας των παραγόντων δέσμευσης της ανοσοσφαιρίνης. Έχουν περιγραφεί δύο διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης οι οποίες προκύπτουν ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος κατά τη μεταγραφή.

Το γονίδιο *MSMB* έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο του προστάτη αλλά και άλλες μορφές καρκίνου. Η πρωτεΐνη PSP94 έχει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες και φαίνεται να μην εκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη ⁷⁹. Συγκεκριμένα, στο φυσιολογικό προστάτη ή/και σε περιπτώσεις καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη, σχεδόν όλα τα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν το *MSMB* γονίδιο. Ωστόσο, στις περιπτώσεις κακοήθους υπερπλασίας το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν το *MSMB* δεν ξεπερνά το 10%. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία της PSP94 πρωτεΐνης ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης ενδέχεται να είναι αρκετή ώστε να ασκήσει οποιαδήποτε ογκοκατασταλτική δράση στα καρκινικά κύτταρα.

In vitro και in vivo μελέτες έδειξαν ότι το *MSMB* γονίδιο ίσως να ασκεί ογκοκατασταλτική δράση. Η υπερέκφραση του γονιδίου θα μπορούσε να επάγει την απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων του προστάτη και να καταστείλει την κυτταρική αύξηση, τη διήθηση και τη μετάσταση⁸⁰⁻⁹⁵.



Εικόνα 14. Κρυσταλλική δομή ανθρώπινης πρωτεΐνης πλάσματος *PSP94*, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *MSMB*). Στη κρυσταλλική δομή της εκκριτικής πρωτεΐνης του προστάτη *PSP94* φαίνεται η σύνδεση από άκρη σε άκρη των δύο μονομερών για το σχηματισμό ενός ομοδιμερούς. Η δομή είναι χρωματισμένη ανά αλυσίδα. Περιέχονται 4 αντίγραφα της βήτα-μικροσεμινοπρωτεΐνης (*MSMB*) [96].

Πρόσφατα το γονίδιο *MSMB* έχει αποκτήσει ενδιαφέρον ως υποψήφιο γονίδιο προδιάθεσης για τον καρκίνο του προστάτη. Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs10993994 εδράζεται στον υποκινητή του γονιδίου *MSMB*. Σήμερα αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι ο εν λόγω πολυμορφισμός σχετίζεται με τον καρκίνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη και το πολυμορφικό αλληλόμορφο σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα έκφρασης τόσο σε mRNA όσο και σε πρωτεΐνη. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης του *MSMB* φαίνεται να περιορίζει την ογκοκατασταλτική του δράση στα νεοπλασματικά κύτταρα του προστάτη, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη.

Ο ίδιος πολυμορφισμός έχει προταθεί ότι επηρεάζει επίσης τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γειτονικού γονιδίου *NCOA4*, του οποίου το προϊόν είναι ένας

ενεργοποιητής της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα του ανδρογόνου και έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο μεταστατικού καρκίνου του προστάτη.

Η παρουσία του T αλληλομόρφου σε ετεροζυγωτία (CT) ή ομοζυγωτία (TT) φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη κατά 1.2x και 1.6x αντίστοιχα, έναντι του CC γονοτύπου. Ο εν λόγω πολυμορφισμός φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια του προστάτη σε Καυκάσιους πληθυσμούς, αλλά όχι στους Ασιάτες, ενώ παρουσιάζεται αδύναμη συσχέτιση σε μεικτούς πληθυσμούς και στους Αφροαμερικανούς, γεγονός που αντικατοπτρίζει τη γεωγραφική ετερογένεια παγκοσμίως⁹⁷⁻¹⁰². Επιπρόσθετα, η παρουσία του πολυμορφικού C αλληλομόρφου έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με υψηλότερα επίπεδα PSA¹⁰³. Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα με αποτέλεσμα να ενισχύεται η ανάγκη για περισσότερες μελέτες σε μεγάλο αριθμό ατόμων.

1.8 Το γονίδιο *KLK3*

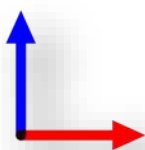
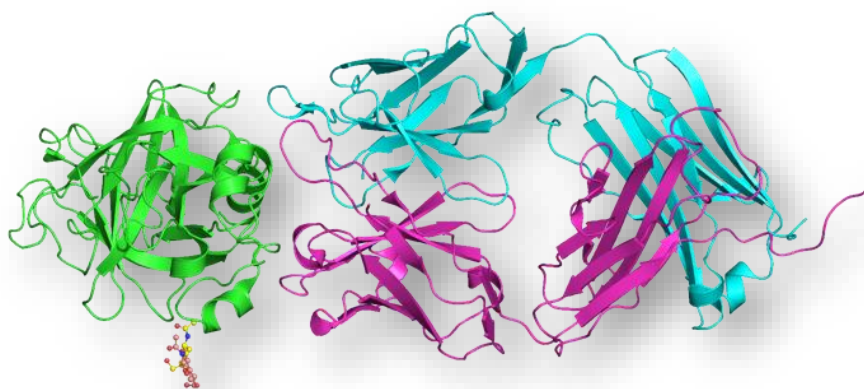
Το γονίδιο *KLK3* εδράζεται στο χρωμόσωμα 19 στη θέση 19q13.33 και κωδικοποιεί το ειδικό προστατικό αντιγόνο PSA. Το PSA είναι επίσης γνωστό ως γ-σεμινοπρωτεΐνη ή καλλικρεΐνη-3 (*KLK3*). Το γονίδιο *KLK3* είναι ένα από τα δεκαπέντε μέλη της οικογένειας της καλλικρεΐνης που αποτελούν ένα σύμπλεγμα στο χρωμόσωμα 19. Οι καλλικρεΐνες είναι μια υποομάδα πρωτεασών σερίνης, ικανές να διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς. Το εναλλακτικό μάτισμα αυτού του γονιδίου δημιουργεί πολλές παραλλαγές, οι οποίες κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές της παραγόμενης πρωτεΐνης.

Το PSA είναι ένα γλυκοπρωτεϊνικό ένζυμο μήκους 261 αμινοξέων και μοριακού βάρους 28.741 Da. Συντίθεται στα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη και αποτελεί μέρος του πλάσματος. Η εκτίμηση των επιπέδων του PSA στον ορό του πλάσματος αποτελεί χρήσιμο δείκτη για τη διάγνωση και την παρακολούθηση του καρκίνου του προστάτη.

Πολλές καλλικρεΐνες φαίνονται να εμπλέκονται στην καρκινογένεση και μερικές ενδεχομένως να αποτελέσουν νέους βιοδείκτες τόσο για τον καρκίνο του προστάτη όσο και για άλλους καρκίνους. Ωστόσο, αν και το PSA θεωρείται ένας σημαντικός καρκινικός δείκτης και χρησιμοποιείται ευρέως για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη, οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την αυξημένη έκφρασή του στους όγκους παραμένουν άγνωστοι.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53* υπάρχουν ενδείξεις ότι επιδρά στον υποκινητή του *KLK3* γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η αδρανοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53* προκαλεί 4 έως 8 φορές αύξηση της έκκρισης της πρωτεΐνης PSA σε μέσο καλλιέργειας, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του γονιδίου *KLK3* βρίσκεται υπό αρνητικό έλεγχο από την p53 πρωτεΐνη. Το *TP53* αδρανοποιείται στην πλειονότητα των όγκων, συμπεριλαμβανομένου και του προχωρημένου καρκίνου του προστάτη.

Το ειδικό προστατικό αντιγόνο υπάρχει και σε άλλους επιθηλιακούς ιστούς εκτός του προστάτη. Το PSA εκφράζεται επίσης στο μαστό, σε νεοπλασματικό και υγιή ιστό. Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα PSA αποτελούν ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο του μαστού, ωστόσο ο ρόλος του PSA σε αυτούς τους όγκους χρήζει περαιτέρω διερεύνησης ¹⁰⁴⁻¹¹⁴.



Εικόνα 15. Κρυσταλλική δομή ανθρώπινου ειδικού προστατικού αντιγόνου, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *KLK3*, σε σύμπλοκο με ένα αντίσωμα ενεργοποιητή. Η δομή είναι χρωματισμένη ανά αλυσίδα και απεικονίζονται 1 αντίγραφο του ειδικού προστατικού αντιγόνου (πράσινο χρώμα), 2 αντίγραφα του μονοκλωνικού αντισώματος 8G8F Fab 1 και 2 αντίγραφα του μορίου της 2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-βήτα-D-γλυκοκυρανόζης [115].

Η πρόσφατη βιβλιογραφία αναφέρει πλήθος πολυμορφισμών στο γονίδιο *KLK3*. Σχεδόν 60 πολυμορφισμοί φαίνεται να έχουν καταγραφεί και τουλάχιστον 21 γενετικοί τόποι αναφέρονται σε τουλάχιστον δύο μελέτες. Ωστόσο, για την πλειοψηφία αυτών τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και χρειάζονται περαιτέρω μελέτες, σε μεγάλο αριθμό ατόμων ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τον ρόλο και την πιθανή τους συσχέτιση με τον καρκίνο του προστάτη.

Ο πολυμορφισμός rs2735839 (G/A) που απαντάται κοντά στο γονίδιο *KLK3* θεωρείται ότι σχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα καρκίνου του προστάτη. Είναι από τους συχνότερα μελετημένους πολυμορφισμούς με αντικρουόμενα ωστόσο αποτελέσματα. Εντοπίζεται 600 ζεύγη βάσεων καθοδικά της αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου *KLK3* που κωδικοποιεί το ειδικό προστατικό αντιγόνο PSA¹¹⁶¹¹⁷¹¹⁸.

Πρόκειται για έναν πολυμορφικό γενετικό τόπο με τέσσερα διαφορετικά αλληλόμορφα καθώς στην ίδια γενετική θέση μπορεί να υπάρχουν τα A, C, G ή T νουκλεοτίδια.

Ο γονότυπος AA δε σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Η παρουσία του αλληλομόρφου G σε ετεροζυγωτία (GA) ή ομοζυγωτία (GG) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πιο επιθετικής μορφής καρκίνου του προστάτη κατά 1.6x και 1.8x φορές. Σε ασθενείς με Gleason score 7 ειδικότερα, ο πολυμορφισμός rs2735839 φαίνεται να συσχετίζεται περισσότερο με ασθενείς κατηγορίας GS 4 + 3 έναντι ασθενών με GS 3 + 4, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή χρήση του για τη διαστρωμάτωση των ασθενών με GS 7. Παράλληλα, άλλη μελέτη επιβεβαιώνει τη συσχέτιση του rs2735839 πολυμορφισμού με τον υψηλό βαθμό επιθετικότητας (GS \geq 8).

Οι γενετικές παραλλαγές που εκτείνονται στον γενετικό τόπο *KLK3* συσχετίζονται σε αρκετές μελέτες με τα επίπεδα του PSA. Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ το προγονικό αλληλόμορφο (A) συνδέεται με αυξημένα επίπεδα PSA, το παραλλαγμένο αλληλόμορφο (G) είναι συχνότερο στις πιο επιθετικές μορφές της νόσου. Υπάρχουν ενδείξεις από δύο ανεξάρτητες μελέτες ότι το πολυμορφικό αλληλόμορφο A σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα από καρκίνο του προστάτη¹¹⁹⁻¹²⁶.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η συσχέτιση του rs2735839 πολυμορφισμού με πιο επιθετική μορφή καρκίνου του προστάτη αφορά σε Καυκάσιους πληθυσμούς της Ευρώπης, σε χώρες όπως η Γαλλία, η Νορβηγία και η Φιλανδία, αλλά και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Ωστόσο δεν παρατηρείται ανάλογη συσχέτιση

στους Ασιατικής προέλευσης πληθυσμούς. Στον ελληνικό πληθυσμό δεν υπάρχει επίσης ανάλογη μελέτη.

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των πολυμορφισμών rs10993994 (T>C) του γονιδίου *MSMB* και rs2735839 (A>G) του γονιδίου *KLK3*, σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου), προκειμένου να εκτιμηθεί η συχνότητα εμφάνισής τους στον ελληνικό πληθυσμό και να προσδιορισθεί ο πιθανός τους ρόλος στην εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη.

Η κατανομή των πολυμορφισμών χαρακτηρίζεται από μεγάλη γεωγραφική ετερογένεια παγκοσμίως και αυτό οδηγεί στα αντικρουόμενα αποτελέσματα των μελετών αναφορικά με τη συσχέτισή τους με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Με βάση τα όσα γνωρίζουμε δεν υπάρχει ανάλογη μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό. Η πιθανή συσχέτιση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών με τον καρκίνο του προστάτη θεωρούμε ότι θα προσθέσει πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια προδιάθεσης για τον καρκίνο του προστάτη. Επιπρόσθετα, τα πιθανά ευρήματα που θα προκύψουν ενδέχεται να επιτρέψουν τη χρήση των ανωτέρω γονιδίων στα πλαίσια της πρόληψης και της έγκαιρης διάγνωσης της νόσου.

Μεθοδολογία

2.1 Υλικό μελέτης

Στην παρούσα εργασία συμπεριελήφθησαν 49 ασθενείς με καρκίνο προστάτη και 50 υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Οι ασθενείς χειρουργήθηκαν στην Ουρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Συλλέξαμε περιφερικό αίμα από το σύνολο των ατόμων (ασθενείς – υγιή άτομα) για τη μελέτη των πολυμορφισμών rs10993994 (T>C) του γονιδίου MSMB και rs2735839 (A>G) του γονιδίου KLK3. Παράλληλα έγινε συλλογή κλινικοεργαστηριακών στοιχείων σχετικά με το στάδιο της νόσου και το βαθμό κακοηθείας, τον αριθμό και τη διάμετρο του όγκου, καθώς και την πιθανή υποτροπή, με την έγγραφη συγκατάθεση των ατόμων και διασφαλίζοντας την ανωνυμία των συμμετεχόντων.

2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του κιτ της εταιρείας Macherey-Nagel. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση στηλών/μεμβρανών από πηκτή σιλικόνης, οι οποίες δεσμεύουν εκλεκτικά τα νουκλεϊκά οξέα παραμένοντας παράλληλα μη διαπερατές σε πρωτεΐνες και δισθενή ιόντα, που μπορεί να αναστείλουν τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης κατά την PCR αντίδραση.

2.2.1 Υλικά

Αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό Διάλυμα B3 (διάλυμα λύσης/πρόσδεσης) 200 µL
- Ρυθμιστικό διάλυμα Wash (πρώτο διάλυμα πλύσης) BW 500 µL
- Ρυθμιστικό διάλυμα Wash (δεύτερο διάλυμα πλύσης) B5 600 µL
- Διάλυμα έκλουσης (διάλυμα έκλουσης) BE 100 µL
- Πρωτεΐνάση K 25 µL
- Στήλες δέσμευσης DNA και σωληνάρια συλλογής (2 mL)
- 96-100% αιθανόλη 210 µL

2.2.2 Πειραματική διαδικασία.

- Προσθήκη 25 μL πρωτεΐνάσης K και 200 μL διαλύματος λύσης/πρόσδεσης (B3) σε 200 μL δείγματος περιφερικού αίματος
- Καλή ανακίνηση (vortex) για ανάδευση των υλικών και σύντομη φυγοκέντρηση (spin down)
- Επώαση για 15 λεπτά στους 70°C σε θερμοκρασιακή πλάκα
- Προσθήκη 210 μL απόλυτης αιθανόλης 96-100%
- Καλή ανακίνηση για ανάδευση των υλικών και σύντομη φυγοκέντρηση
- Τοποθέτηση του δείγματος σε στήλη
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής
- Προσθήκη στη στήλη 500 μL πρώτου διαλύματος πλύσης (BW)
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής
- Προθήκη στη στήλη 600 μL δεύτερου διαλύματος πλύσης (B5)
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής
- Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο τύπου erpendorf
- Προσθήκη στην στήλη 100 μL προθερμασμένου στους 70°C διαλύματος έκλουσης
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Τοποθέτηση ξανά του δείγματος στην στήλη
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Αποθήκευση του δείγματος στους 4°C μέχρι τη χρήση του

2.2.3 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση του γενωμικού DNA

Φωτομέτρηση

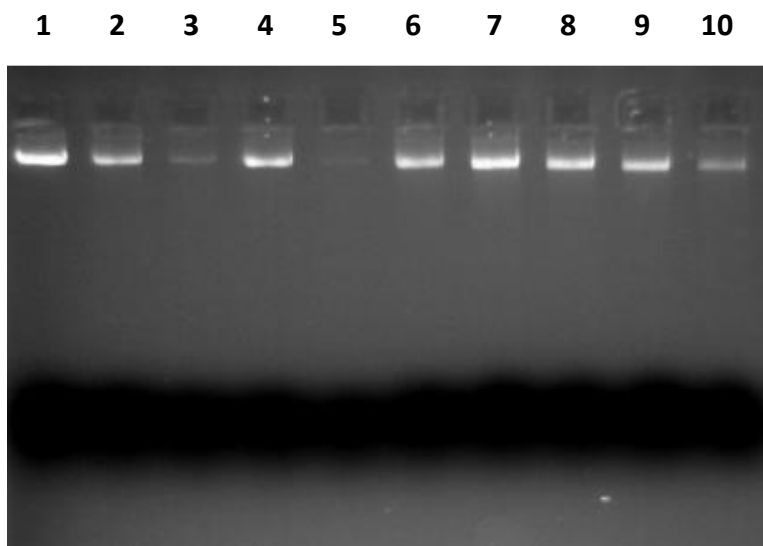
Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του γενωμικού DNA αξιολογήθηκε με φωτομέτρηση. Η καθαρότητα του δείγματος εκτιμήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 260nm και στα 280nm και υπολογισμό του λόγου OD260/OD280. Οι τιμές μεταξύ 1.7-1.9, προσδιορίζουν ένα υψηλής καθαρότητας DNA. Τιμές <1.7 είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων, συνήθως πρωτεϊνών ή φαινόλης, ενώ τιμές >1.9 είναι ενδεικτικές πρόσμιξης με άλλα μακρομόρια.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA υπολογίζεται με βάση με τον τύπο:

$$C_{\text{dsDNA}}(\mu\text{g/ml}) = \text{τιμή OD}_{260} \times 50 \times \text{συντελεστής αραίωσης}$$

Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων

Τα δείγματα ελέγχθηκαν ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και εκτίμηση υπό υπεριώδες φως (UV).



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση σε 2% πήκτη αγαρόζης δειγμάτων γενωμικού DNA

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μετά την απομόνωση του DNA των δειγμάτων ακολούθησε η διαδικασία ενίσχυσης των γονιδιακών τμημάτων που περιέχουν τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Όλες οι PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf. Αρχικά έγινε η προετοιμασία του μείγματος της PCR αντίδρασης. Ο συνολικός όγκος για κάθε μείγμα ήταν 50 μl, ενώ η ποσότητα DNA που χρησιμοποιήθηκε από κάθε δείγμα ήταν από 5 έως 7 μl ανά αντίδραση.

Αναλυτικά, σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 0.2 mL προστίθεται το γενωμικό DNA. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται το μείγμα των αντιδραστηρίων το οποίο περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, ιόντα μαγνησίου, τα δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs τους δύο εκκινητές, την πολυμεράση (FIREPol DNA πολυμεράση, Solis BioDyne) και κατάλληλη ποσότητα δις- απεσταγμένου νερού ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης. Το μείγμα κατανέμεται στα σωληνάρια που περιέχουν το γενωμικό DNA. Σε κάθε PCR χρησιμοποιείται ένας αρνητικός μάρτυρας (Non Template Control, NTC), που περιέχει δις απεσταγμένο νερό αντί γενωμικού DNA για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τους δύο πολυμορφισμούς καθώς και τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν κατά τις PCR αντιδράσεις ακολουθούν στη συνέχεια.

Πίνακας 4. Αλληλουχία εκκινητών για την ενίσχυση των υπό εξέταση πολυμορφισμών

Εκκινητής	Αλληλουχία Εκκινητών 5'→ 3'
rs10993994 πρόσθιος εκκινητής	5'-TCCTTTTGATAGTCAACCCTCTGT
rs10993994 ανάστροφος εκκινητής	5'-TTATACTGGAGAGGGCAAC
rs2735839 πρόσθιος εκκινητής	5'-ACCGCCTAGGGATCTGGTTC
rs2735839 ανάστροφος εκκινητής	5'-CCTTCCTCAACCTTCCCCTATT

Πίνακας 5. Μείγμα αντίδρασης για την ενίσχυση τμήματος του *MSMB* γονιδίου (rs10993994) με τη χρήση της FIREPol DNA πολυμεράσης (Solis BioDyne)

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα (μL)
10X Ρυθμιστικό διάλυμα	5
25mM MgCl ₂	3
dNTPs (40 mM)	3
Πρόσθιος εκκινητής (10 pm/μl)	4
Ανάστροφος εκκινητής (10 pm/μl)	2
FirePol DNA Πολυμεράση (5 u/μl)	0.4
ddH ₂ O	Έως 50

Πίνακας 6. Μείγμα αντίδρασης για την ενίσχυση τμήματος του *KLK3* γονιδίου (rs2735839) με τη χρήση της FIREPol πολυμεράσης (Solis BioDyne)

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα (μL)
10X Ρυθμιστικό διάλυμα	5
25mM MgCl ₂	5
dNTPs (40 mM)	3
Πρόσθιος εκκινητής (10 pm/μl)	2
Ανάστροφος εκκινητής (10 pm/μl)	2
FirePol Πολυμεράση (5 u/μl)	0.5
ddH ₂ O	Μέχρι τα 50

Η PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών σταδίων: αποδιάταξη, υβριδοποίηση και επιμήκυνση. Αρχικά πραγματοποιείται ένα στάδιο αποδιάταξης στους 94°C για πέντε λεπτά, ώστε να αποδιαταχθεί η διπλή έλικα του DNA και να δημιουργηθούν μονές έλικες. Μετά την αρχική αποδιάταξη ακολουθούν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι: αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, επιτρέποντας τη σύνθεση νέων μορίων με εκθετικό ρυθμό. Η ολοκλήρωση των επαναλαμβανόμενων κύκλων της PCR αντίδρασης ακολουθείται από ένα τελευταίο στάδιο επιμήκυνσης, ώστε να εξασφαλιστεί η επιτυχημένη επέκταση των δίκλωνων τμημάτων του DNA. Τα πρωτόκολλα για τους δύο εξεταζόμενους πολυμορφισμούς απεικονίζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 7. Πρωτόκολλο PCR αντίδρασης για τον πολυμορφισμό rs10993994

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος(λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5
40 κύκλοι:		
Αποδιάταξη	94°C	1
Υβριδισμός	56°C	1
Επιμήκυνση	72°C	1
Τελική επιμήκυνση	72°C	10
Ψύξη	4°C	∞

Πίνακας 8. Πρωτόκολλο PCR αντίδρασης για τον πολυμορφισμό rs2735839

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5
40 κύκλοι:		
Αποδιάταξη	94°C	1
Υβριδισμός	59°C	1
Επιμήκυνση	72°C	1
Τελική επιμήκυνση	72°C	10
Ψύξη	4°C	∞

2.5 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR αντίδρασης έγινε ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Η πυκνότητα του πηκτώματος αγαρόζης που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το αναμενόμενο μέγεθος των υπό εξέταση τμημάτων του DNA που θα ηλεκτροφορηθούν. Στην προκειμένη περίπτωση παρασκευάσαμε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3%, ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

1. Μέτρηση σε ζυγό ακριβείας της 9 γραμμαρίων αγαρόζης (3%) και μεταφορά της σε ογκομετρική φιάλη.
2. Προσθήκη 300 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE (TRIS-BORIC-EDTA) 1X και ανάδευση.
3. Τοποθέτηση της ογκομετρικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων και θέρμανση του μίγματος ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές το διάλυμα.
4. Προσθήκη 20 μl βρωμιούχου αιθιδίου στο μείγμα (τυπικά 0.5μg/ml). Η ένωση αυτή εισχωρεί στις βάσεις του DNA (γνωστός μεταλλαξογόνος παράγοντας) και φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.
5. Ανάδευση του μίγματος και τοποθέτηση του περιεχομένου σε κατάλληλο εκμαγείο. Παραμονή σε ανοιχτό απαγωγό μέχρι να πολυμεριστεί η αγαρόζη και να δημιουργηθεί το πήκτωμα.
6. Αφαίρεση του πηκτώματος από το εκμαγείο και αποθήκευσή του στο ψυγείο.

2.6 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων

Μόλις στερεοποιηθεί το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 1x, ώστε να καλύπτεται το πήκτωμα αγαρόζης και να μπορεί να λειτουργήσει το κύκλωμα της ηλεκτροφόρησης. Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιείται κατάλληλη χρωστική ουσία (loading dye). Η χρωστική περιέχει γλυκερόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης. Η γλυκερόλη βοηθά στο να κάθεται λόγω βάρους το δείγμα μέσα στο πηγάδι φόρτωσης και να μην διαχέεται, ενώ το μπλε της βρωμοφαινόλης καθιστά ορατή την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

Στην προκειμένη περίπτωση αναμιγνύονται 10 μl PCR προϊόντος με 7 μl χρωστικής ουσίας και κάθε μίγμα φορτώνεται σε θέση που έχει σχηματιστεί στο πήκτωμα της αγαρόζης κατά τον πολυμερισμό της. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται και ηλεκτροφορείται παράλληλα με τα δείγματα μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους - εδώ χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp της εταιρείας Invitrogen (Life Sciences) - που επιτρέπει τον σαφή προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται υπό υπεριώδες φως και η εικόνα αποθηκεύεται σε υπολογιστή, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.7 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα για τους πολυμορφισμούς rs10993994 και rs2735839

Ο έλεγχος του γονοτύπου των ασθενών και των υγιών ατόμων (ομάδα ελέγχου) για τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς πραγματοποιήθηκε με πέψεις με περιοριστικά ένζυμα, που αναγνωρίζουν και πέπτουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στα εξεταζόμενα γονίδια. Η επώαση των PCR προϊόντων με τα περιοριστικά ένζυμα λαμβάνει χώρα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C για τουλάχιστον 16 ώρες.

Για τον πολυμορφισμό rs10993994 του *MSMB* γονιδίου χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *AcuI* της εταιρείας New England BioLabs, που αναγνωρίζει και τέμνει την παρακάτω αλληλουχία αναγνώρισης, μεταξύ γουανίνης και θυμίνης, στα δίκλιωνα μόρια του DNA.

5'.....TGG↓CCA.....3'

3'.....ACC↑GGA.....5'

Για τον πολυμορφισμό rs2735839 στο γονίδιο *KLK3* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *MscI* της εταιρείας ThermoFisher Scientific, που αναγνωρίζει και τέμνει την παρακάτω αλληλουχία αναγνώρισης στο δίκλινο DNA.

5'.....CTGAAG(N)₁₆↓.....3'

3'.....GACTTC(N)₁₆↑.....5'

Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 30 μl για τον πολυμορφισμό rs10993994 του γονιδίου *MSMB* και 50 μl για τον πολυμορφισμό rs2735839 του γονιδίου *KLK3*. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε πέψη παρατίθενται παρακάτω. Για κάθε ένζυμο χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο ρυθμιστικό του διάλυμα με τελική συγκέντρωση 1X και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα του ενζύμου αναλόγως της συγκέντρωσής του (units) και του τελικού όγκου της αντίδρασης.

Πίνακας 9. Πρωτόκολλο πέψης με το περιοριστικό ένζυμο *AcuI* για τον πολυμορφισμό rs10993994 του γονιδίου *MSMB*

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα CutSmart	2
Ρυθμιστικό διάλυμα SUM	0.6
Ένζυμο <i>AcuI</i>	3
ddH₂O	14.4
DNA	10

Πίνακας 10. Πρωτόκολλο πέψης με το περιοριστικό ένζυμο *MscI* για τον πολυμορφισμό rs2735839 του γονιδίου *KLK3*

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα CutSmart	10
Ένζυμο <i>MscI</i>	1,5
ddH₂O	28,5
DNA	10

Για τον πολυμορφισμό rs10993994 του γονιδίου *MSMB* οι αντιδράσεις των πέψεων επωάστηκαν για 16-19 ώρες στους 37°C σε υδατόλουτρο ώστε να επιτευχθεί η πλήρης πέψη των προϊόντων της PCR.

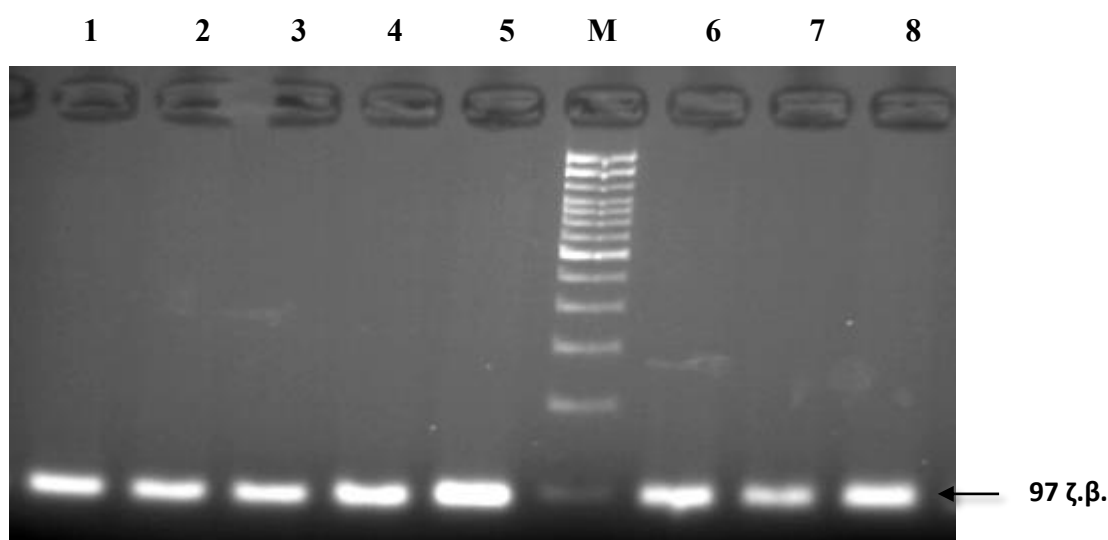
Για τον πολυμορφισμό rs2735839 του γονιδίου *KLK3* οι αντιδράσεις επωάστηκαν για 1-3 ώρες στους 37°C. Τα προϊόντα πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 4%, ώστε να είναι διακριτά ακόμα και τα μικρότερα τμήματα DNA που προέκυψαν από την πέψη, της τάξεως των 20 ζβ.

Αποτελέσματα

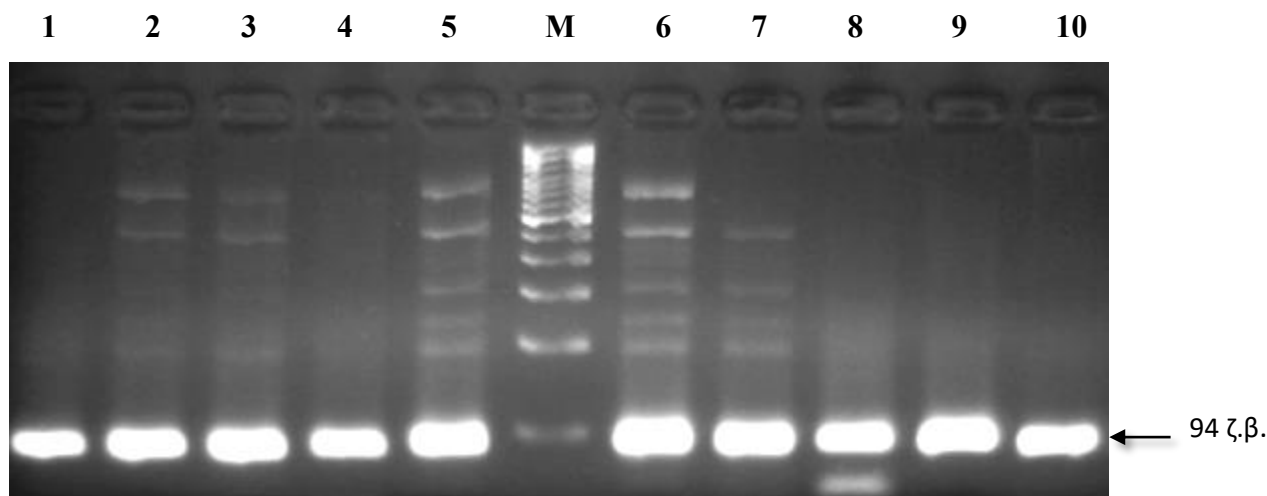
3.1 Αποτελέσματα της PCR

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε συνολικά 99 άτομα, 49 ασθενείς με καρκίνο προστάτη και 50 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου). Συλλέξαμε περιφερικό αίμα από το σύνολο των ατόμων και ακολούθησε απομόνωση γενωμικού DNA. Στη συνέχεια, με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών ενισχύθηκαν επιλεκτικά οι περιοχές που περιέχουν τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς rs10993994 (T/C) του γονιδίου *MSMB* και rs2735839 (G/A) του γονιδίου *KLK3*. Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να ελεγχθεί ότι ενισχύθηκε η σωστή γενετική περιοχή. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100 ζ.β. της εταιρείας Invitrogen (Life Sciences).

Στη συνέχεια παρατίθενται εικόνες από τις ηλεκτροφορήσεις των PCR προϊόντων. Το προϊόν της PCR για τον πολυμορφισμό rs10993994 του γονιδίου *MSMB* έχει μέγεθος 97 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 17), ενώ για τον πολυμορφισμό rs2735839 του γονιδίου *KLK3* το προϊόν της PCR έχει μέγεθος 94 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 18).



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% των PCR προϊόντων για τον πολυμορφισμό rs10993994 του γονιδίου *MSMB*, μεγέθους 97 ζ.β. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen), δείγματα: 1-8.



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% των PCR προϊόντων για τον πολυμορφισμό rs2735839 του γονιδίου *KLK3*, μεγέθους 94 ζ.β. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen), δείγματα: 1-10.

3.2 Αποτελέσματα των πέψεων με περιοριστικά ένζυμα

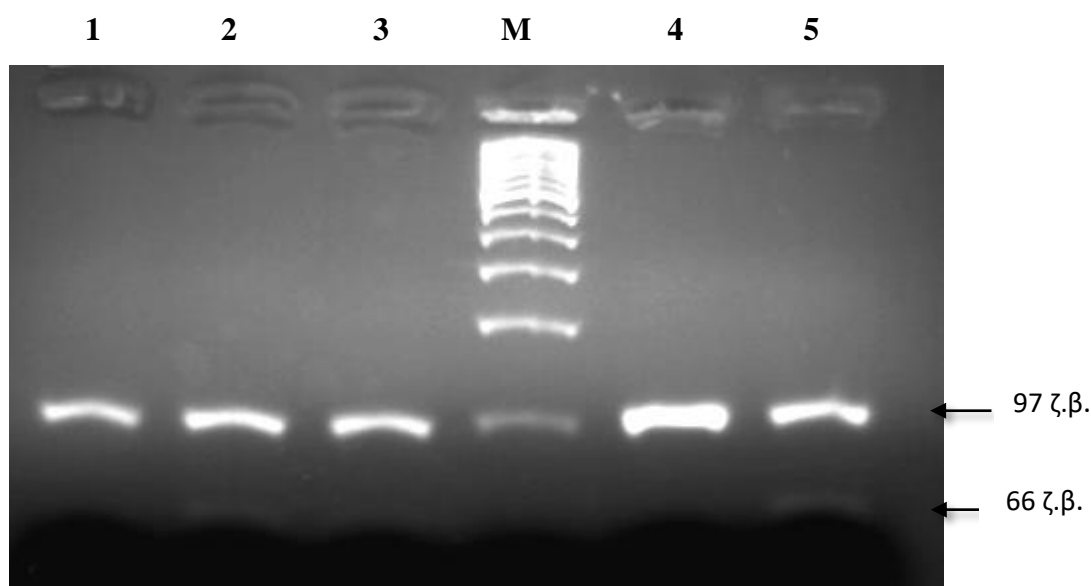
Ο έλεγχος των γονοτύπων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων για τους δύο πολυμορφισμούς. Μετά το πέρας της επώασης τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 4% επιτρέποντας τον προσδιορισμό των μικρών τμημάτων που προκύπτουν λόγω της πέψης.

Για τον πολυμορφισμό rs10993994 εξετάστηκαν 3 γονότυποι: ο γονότυπος TT, ο γονότυπος CT και ο γονότυπος CC. Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *AclI*, της εταιρείας New England BioLabs, για τον πολυμορφισμό rs10993994 του γονιδίου *MSMB* αναμένεται να παρουσιάσει τα ακόλουθα πρότυπα ζωνών:

Πίνακας 11. Γονότυποι και αντίστοιχα μεγέθη για τον πολυμορφισμό rs10993994 του γονιδίου *MSMB*

Γονότυποι πολυμορφισμού rs10993994	Μέγεθος προϊόντων πέψης (ζ.β.)
TT	97
CT	97 + 66 + 31
CC	66 + 31

Η ζώνη μεγέθους 97 ζ.β. αντιστοιχεί στον γονότυπο TT. Οι ζώνες μεγέθους 66 ζ.β. και 31 ζ.β αντιστοιχούν στον γονότυπο CC. Η ζώνη μεγέθους 31 ζ.β. δεν διακρίνεται ευκρινώς, καθώς λόγω του μικρού της μοριακού βάρους, εκπέμπει φθορισμό μικρής έντασης και είναι δύσκολο να εντοπιστεί στο πήκτωμα αγαρόζης σύστασης 4%. Ο γονότυπος CT έχει στην ηλεκτροφόρηση πρότυπο ζωνών μεγέθους 97 ζ.β, 66 ζ.β. και 31 ζ.β. (Εικόνα 19).



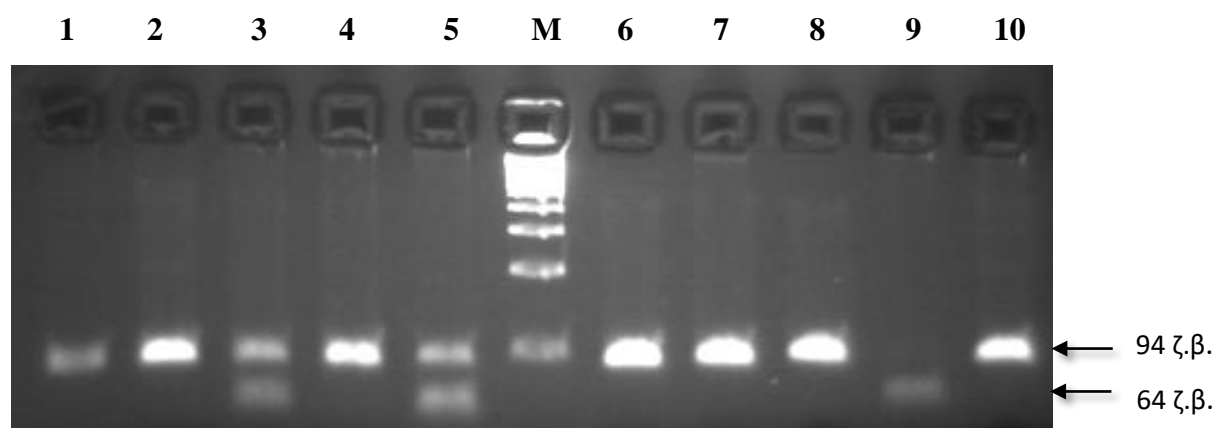
Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης με το ένζυμο *AcuI*, για τον πολυμορφισμό rs10993994 σε πήκτωμα αγαρόζης 4%. Γονότυπος CC: 1,4, γονότυπος CT: 2, 3, 5. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen).

Αντιστοίχως για τον πολυμορφισμό rs2735839 του *KLK3* γονιδίου έχουν μελετηθεί 3 γονότυποι: ο γονότυπος GG, ο γονότυπος GA και ο γονότυπος AA. Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MseI της εταιρείας ThermoFisher SCIENTIFIC, για τον πολυμορφισμό rs2735839 του γονιδίου *KLK3* αναμένεται να παρουσιάσει τα ακόλουθα πρότυπα ζωνών:

Πίνακας 12. Γονότυποι και αντίστοιχα μεγέθη για τον πολυμορφισμό rs2735839 του γονιδίου *KLK3*

Γονότυποι πολυμορφισμού rs2735839	Μέγεθος προϊόντων πέψης (ζ.β.)
AA	94
GA	94 + 64 + 30
GG	64 + 30

Κατά την ηλεκτροφόρηση, η ζώνη μεγέθους 94 ζ.β. αντιστοιχεί στον γονότυπο GG, ενώ οι ζώνες ηλεκτροφόρησης μεγέθους 64 ζ.β. και 30 ζ.β. αντιστοιχούν στον γονότυπο AA. Η ετεροζυγωτία των δύο αλληλομόρφων αντιστοιχεί σε ζώνες ηλεκτροφόρησης μεγέθους 94 ζ.β., 64 ζ.β. και 30 ζ.β. (γονότυπος GA). Η ζώνη μεγέθους 30 ζ.β. δεν διακρίνεται κι εδώ λόγω του μικρού της μεγέθους και της μικρής διακριτικής ικανότητας της αγαρόζης (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης με το ένζυμο MseI, για τον πολυμορφισμό rs2735839 σε πήκτωμα αγαρόζης 4%. Γονότυπος GG: 1,2,4,6,7,8,10, γονότυπος GA: 3,5 και γονότυπος AA: 9. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen).

3.3 Στατιστική Ανάλυση

3.3.1 Συσχέτιση της κατανομής των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών rs10993994 και rs2735839 με την ύπαρξη του καρκίνου του προστάτη.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την παρουσία δύο πολυμορφισμών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εκκρινόμενες από τον προστάτη, τόσο σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη όσο και σε υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα μελετήσαμε την κατανομή των πολυμορφισμών rs10993994 και rs2735839 των γονιδίων *MSMB* και *KLK3* στον ελληνικό πληθυσμό και εξετάσαμε τον πιθανό τους ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου του προστάτη. Παράλληλα, για τους ασθενείς της μελέτης συλλέξαμε πληροφορίες σχετικά με το Gleason score και τις τιμές του PSA στο πλάσμα.

Στη μελέτη συμπεριλάβαμε 49 ασθενείς με καρκίνο του προστάτη ηλικίας 65 ± 13.5 έτη (εύρος: 40-82 έτη). 17/49 ασθενείς (34.7%) κατηγοριοποιήθηκαν με Gleason score 6, 21/49 ασθενείς (42.9%) κατηγοριοποιήθηκαν με Gleason score 7, 2/48 ασθενείς (4.2%) κατηγοριοποιήθηκαν με Gleason score 8 και 4/49 ασθενείς (8.2%) κατηγοριοποιήθηκαν με Gleason score 9. Δεν υπήρχαν δεδομένα για το Gleason score 5 ασθενών (10.1%). Όσον αφορά το PSA, μετρήσεις είχαμε σε 36/49 ασθενείς (73.5%). Η μέση τιμή PSA των ασθενών υπολογίστηκε 12.19 ± 15.48 ng/ml (εύρος 0.007- 87.6).

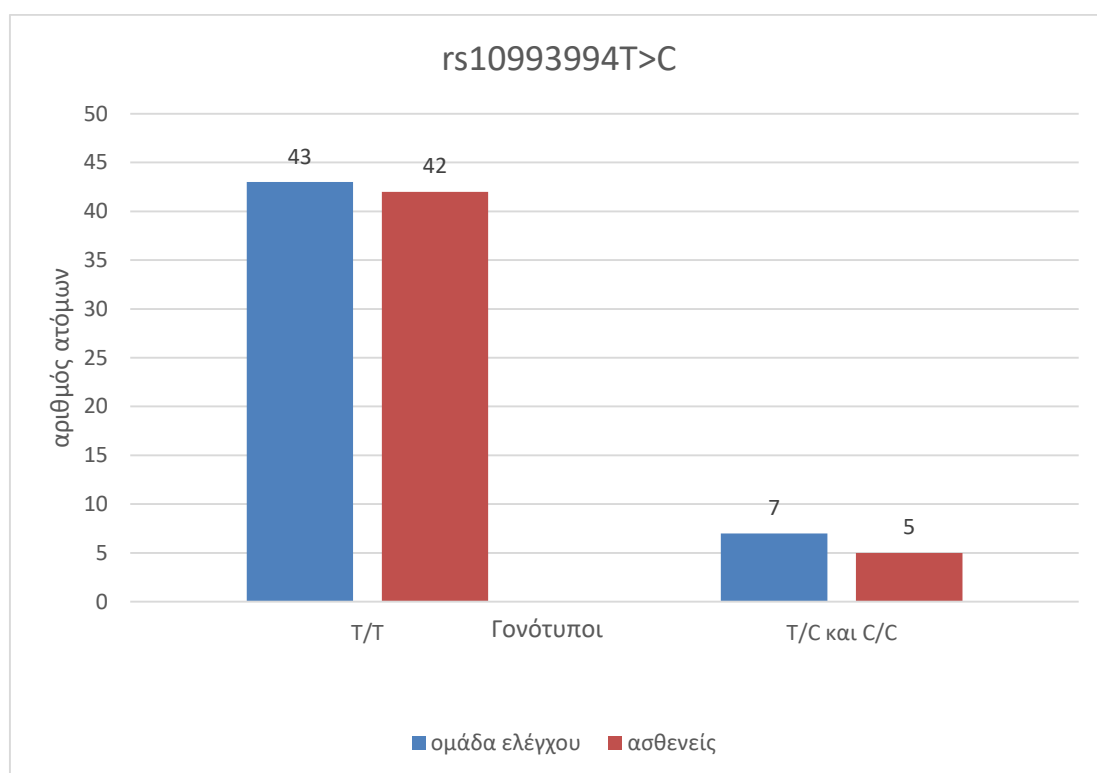
Προκειμένου να εξετάσουμε την πιθανή συσχέτιση των εξεταζόμενων πολυμορφισμών με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη συμπεριλάβαμε στη μελέτη και 50 υγιείς άνδρες χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου, ηλικίας μικρότερης των 30 ετών.

Τα αποτελέσματα των πέψων αξιολογήθηκαν και καταγράφηκαν, ώστε να ακολουθήσει η στατιστική τους επεξεργασία. Χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα SPSS version 22 και η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας το chi-square με κατώφλι σημαντικότητας $p < 0.05$, CI 95%.

Ο πρώτος πολυμορφισμός που εξετάστηκε είναι ο rs10993994T>C του *MSMB* γονιδίου. 43/50 υγιή άτομα (86.0%) φέρουν το συχνότερο αλληλόμορφο T σε ομοζυγωτία (γονότυπος TT), ενώ το λιγότερο συχνό στον γενικό πληθυσμό αλληλόμορφο C ανιχνεύθηκε σε 7/50 υγιή άτομα (14.0%), είτε σε ομοζυγωτία (1/50

άτομα, 2.0%) (γονότυπος CC), είτε σε ετεροζυγωτία (6/50 άτομα, 12.0%) (γονότυπος CT).

Στους ασθενείς, η πλειοψηφία έφερε το συχνότερο αλληλόμορφο T σε ομοζυγωτία (42/47, 89.4%) (γονότυπος TT), ενώ οι υπόλοιποι ασθενείς (5/47, 10.6%) έφεραν το λιγότερο συχνό αλληλόμορφο C σε ετεροζυγωτία (γονότυπος CT). Κανένας ασθενής δεν παρουσίασε γονότυπο CC. Σε δύο ασθενείς δεν ήταν επιτυχής η ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής μέσω της PCR αντίδρασης, ως εκ τούτου δεν έδωσαν αποτελέσματα προς αξιολόγηση.



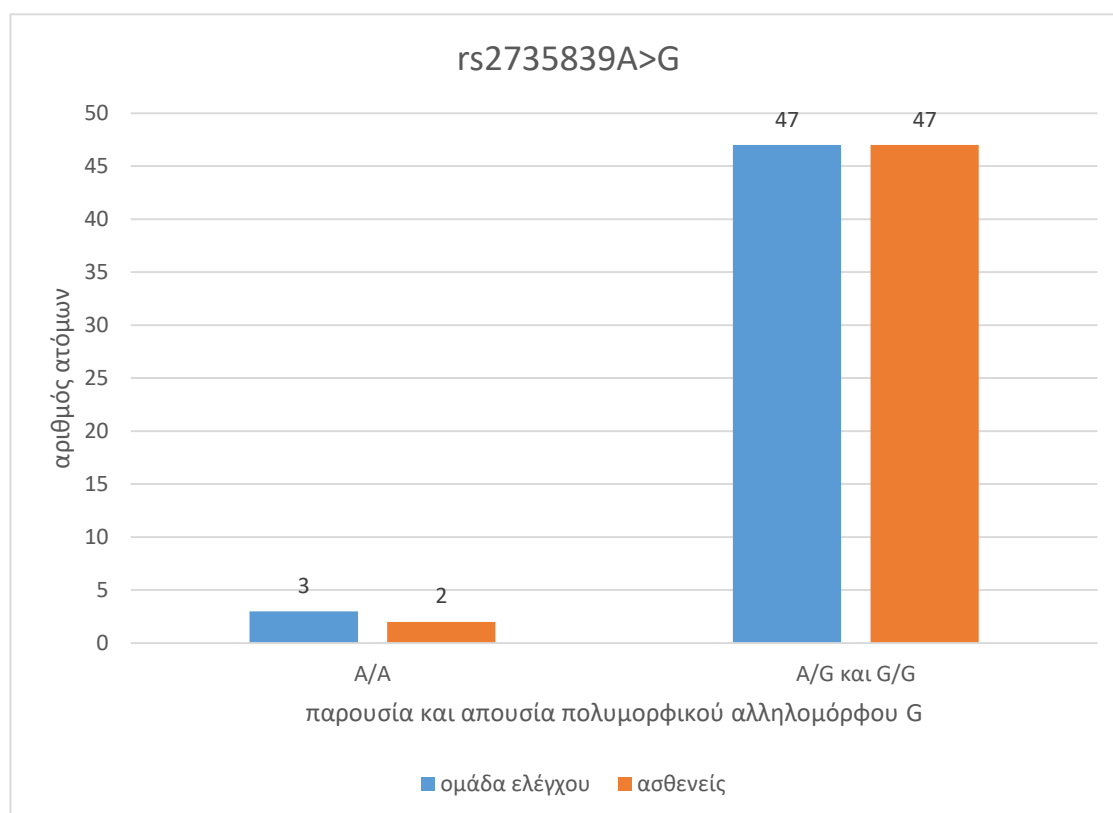
Διάγραμμα 1. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs10993994 του *MSMB* γονιδίου στις ομάδες των ασθενών και στα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου).

Η συσχέτιση που προέκυψε δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p > 0.05$), καθώς, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 1, η κατανομή των αλληλομόρφων είναι παρόμοια στις δύο εξεταζόμενες ομάδες (ασθενείς, υγιή άτομα).

Ο επόμενος πολυμορφισμός που εξετάστηκε ήταν ο rs2735839A>G του *KLK3* γονιδίου. Στα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου) 3/50 άρρενες (6.0%) έφεραν το γονότυπο AA. 21/50 υγιή άτομα (42.0%) έφεραν τον γονότυπο GA και 26/50 άτομα (52.0%)

είχε τον γονότυπο GG. Συνολικά, η παρουσία του αλληλομόρφου G ανιχνεύθηκε σε 47/50 υγιή άτομα (94.0%) σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία (AG, GG).

Στην ομάδα των ασθενών, 2/49 ασθενείς (4.1%) είχαν γονότυπο AA, ενώ το αλληλόμορφο G ανιχνεύθηκε σε 47/49 ασθενείς (95.9%) σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία (AG, GG γονότυποι).



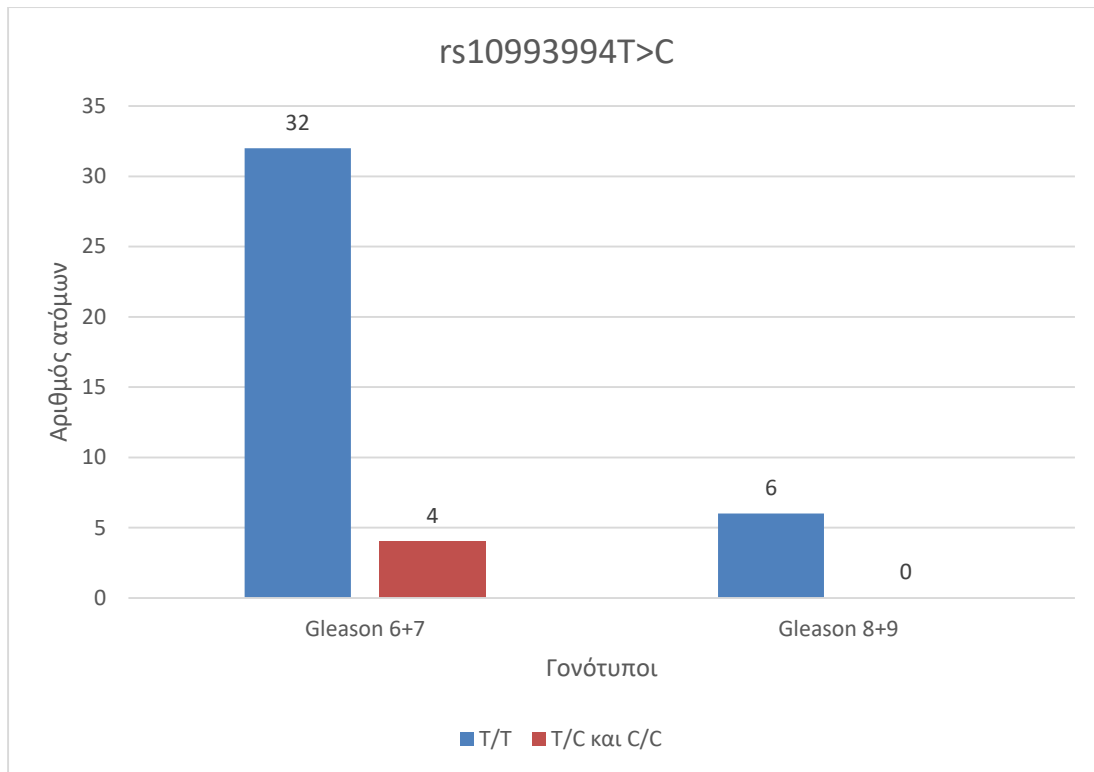
Διάγραμμα 2. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs2735839 του *KLK3* γονιδίου στις ομάδες των ασθενών και στα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου).

Η συσχέτιση που προέκυψε δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p > 0.05$), καθώς, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 2, η κατανομή των αλληλομόρφων είναι παρόμοια για τις δύο εξεταζόμενες ομάδες (ασθενείς, υγιή άτομα).

3.3.2 Συσχέτιση της κατανομής των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών rs10993994 και rs2735839 με την βαθμολογία κατά Gleason.

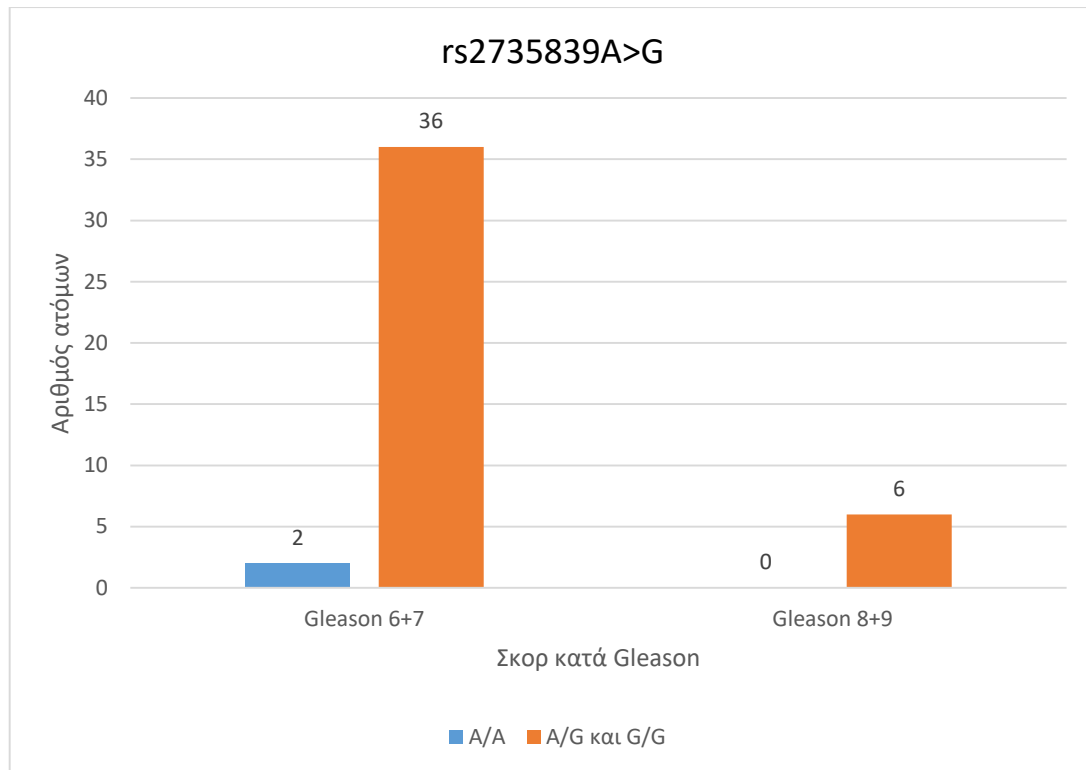
Στη συνέχεια εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση των προαναφερόμενων πολυμορφισμών με τις κλινικές πληροφορίες που συλλέξαμε από τους ασθενείς, όπου αυτό ήταν εφικτό. Από τους 49 ασθενείς που μελετήθηκαν υπήρχαν διαθέσιμες μετρήσεις του σκορ κατά Gleason για 44 ασθενείς. Από αυτούς, 2 ασθενείς που διέθεταν μέτρηση για το σκορ κατά Gleason δεν ήταν δυνατό να εξαχθούν γονότυποι για τον πολυμορφισμό rs10993994T>C και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τα δεδομένα αυτών των ασθενών (42 ασθενείς). Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε δύο κατηγορίες: ασθενείς με χαμηλή βαθμολογία κατά Gleason (6+7) και ασθενείς με υψηλή βαθμολογία κατά Gleason (8+9). Διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών με το Gleason score των ασθενών.

Για τον πολυμορφισμό rs10993994 του *MSMB* γονιδίου, 36/42 ασθενείς (85.7%) διαγνώστηκαν με χαμηλό σκορ κατά Gleason (6+7) και 6/42 ασθενείς (14.3%) διαγνώστηκαν με υψηλό σκορ κατά Gleason (8+9). Στην ομάδα των ασθενών με χαμηλό σκορ κατά Gleason, 32/36 ασθενείς (88.9%) έφεραν το γονότυπο TT και 4/36 ασθενείς (11.1%) έφεραν το λιγότερο συχνό αλληλόμορφο σε ετεροζυγωτία (TC). Στην ομάδα των ασθενών με υψηλό σκορ κατά Gleason, όλοι οι ασθενείς (6/6, 100%) έφεραν τον γονότυπο TT. Η στατιστική επεξεργασία των ευρημάτων δεν ανέδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($p>0.05$).



Διάγραμμα 2. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs10993994 του *MSMB* γονιδίου και Gleason score ασθενών.

Για τον πολυμορφισμό rs2735839 του *KLK3*, 38/44 ασθενείς (86.4%) διαγνώστηκαν με χαμηλό σκορ κατά Gleason (6+7) και 6/44 ασθενείς (13.6%) διαγνώστηκαν με υψηλό σκορ κατά Gleason (8+9). Στην ομάδα των ασθενών με χαμηλό σκορ κατά Gleason, 2/38 ασθενείς (5.3%) έφεραν το γονότυπο AA και 36/38 ασθενείς (94.7%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο G σε ετεροζυγωτία (AG) ή ομοζυγωτία (GG). Στην ομάδα των ασθενών με υψηλό σκορ κατά Gleason, το σύνολο των ασθενών (6/6, 100%) φέρει το πολυμορφικό αλληλόμορφο G σε ετεροζυγωτία (AG) ή ομοζυγωτία (GG). Και στην περίπτωση αυτή η κατανομή των αλληλομόρφων μεταξύ των ομάδων είναι ανάλογη και δεν αναδεικνύεται στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($p>0.05$).



Διάγραμμα 3. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs2735839 του *KLK3* γονιδίου και Gleason score ασθενών.

Η συσχέτιση των τιμών του δείκτη PSA με την κατανομή των αλληλομόρφων των εξεταζόμενων πολυμορφισμών δεν ήταν εφικτή, καθώς ο περιορισμένος αριθμός των ατόμων στα οποία είχαμε μετρήσεις δεν επιτρέπει την περαιτέρω ανάλυση και συσχέτιση των ευρημάτων με ασφάλεια.

Συζήτηση

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα τύπο καρκίνου στους άρρενες και την πέμπτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη και τα ποσοστά θνησιμότητας συσχετίζονται με την ηλικία, με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης να παρατηρείται σε άνδρες ηλικίας άνω των 65 ετών.

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί πολυπαραγοντική νόσο που σχετίζεται άμεσα με την εθνικότητα και την κληρονομικότητα. Σημαντικός παράγοντας κινδύνου θεωρείται επίσης η διατροφή (παχυσαρκία). Η εθνικότητα με τα υψηλότερα ποσοστά καρκίνου προστάτη είναι οι Αφροαμερικανοί, ενώ οι άνδρες Ασιατικής καταγωγής παρουσιάζουν τα χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης της νόσου. Οι Ευρωπαίοι και ιδιαίτερα οι Καυκάσιοι εμφανίζουν ενδιάμεσα ποσοστά εμφάνισης της νόσου¹²⁷.

Όσο αναφορά την Ελλάδα, σύμφωνα με τα δεδομένα του WHO το 2018 καταγράφηκαν συνολικά 2.048 θάνατοι που οφείλονταν στον καρκίνο του προστάτη. Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί σε ποσοστό 2.05% των συνολικών θανάτων στη χώρα. Το ποσοστό θνησιμότητας που καταγράφηκε, προσαρμοσμένο στην ηλικία που προσβάλλει ο καρκίνος, ήταν 13.51 ανά 100.000 άτομα του πληθυσμού⁶.

Στα γενετικά αίτια του καρκίνου του προστάτη προσμετρώνται και το οικογενειακό ιστορικό. Άνδρες με οικογενειακό ιστορικό πρώτου βαθμού συγγενή εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου, ο οποίος αυξάνεται περαιτέρω με την αύξηση του αριθμού των νοσούντων συγγενών.

Το γενετικό υπόβαθρο του κληρονομικού καρκίνου του προστάτη περιλαμβάνει μια σειρά γονιδίων, όπως τα *HPC1*, *PCACP*, *HPCX*, *CAPB*, *HPC20*^{44,45,38}, αλλά και μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1*, *BRCA2* που έχουν συσχετιστεί ήδη με τον καρκίνο του μαστού και ενοχοποιούνται επίσης για τον καρκίνο του προστάτη^{59,60}. Άλλα γονίδια που αποτελούν πιθανούς παράγοντες κινδύνου στη σποραδική μορφή του καρκίνου του προστάτη είναι τα *TP53*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *HOXB13*, *CHEK2* και *ATM*⁶¹⁻⁶⁷. Παρόλα αυτά, μέχρι στιγμής δεν υπάρχει ένας ή περισσότεροι καλά καθορισμένοι παράγοντες κινδύνου, γεγονός που καθιστά την αναζήτηση επιπλέον υποψήφιων παραγόντων κινδύνου αναγκαία.

Σε αυτή την αναζήτηση, δύο γονίδια, που συνδέονται άμεσα με τη φυσιολογική λειτουργία του προστάτη, εμφανίζουν ενδιαφέρον ως υποψήφιοι παράγοντες κινδύνου. Το πρώτο εκ των γονιδίων είναι το *MSMB*, το οποίο κωδικοποιεί την προστατική εκκριτική πρωτεΐνη-94 (PSP94), η οποία είναι μία από τις τρεις κύριες εκκρινόμενες πρωτεΐνες του προστάτη^{70,71}.

Το γονίδιο *MSMB* έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο του προστάτη αλλά και άλλες μορφές καρκίνου. Σύμφωνα με μελέτες, η έκφραση της πρωτεΐνης PSP94 είναι μειωμένη στον καρκίνο του προστάτη. Σε περιπτώσεις φυσιολογικού προστάτη, αλλά και καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη, σχεδόν όλα τα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν το γονίδιο *MSMB*. Αντίθετα, σε περιπτώσεις κακοήθους υπερπλασίας, το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν το *MSMB* μειώνεται σε ποσοστό κάτω του 10%. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι, ακόμη και σε χαμηλό επίπεδο έκφρασης, η PSP94 που παράγεται μπορεί να είναι αρκετή για να ασκήσει οποιαδήποτε ογκοκατασταλτική δράση στα καρκινικά κύτταρα^{72,75}.

Αρκετά από τα αλληλόμορφα που διαθέτει το συγκεκριμένο γονίδιο έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη και ένα από αυτά είναι ο πολυμορφισμός rs10993994. Ο πολυμορφισμός εντοπίζεται 57 ζεύγη βάσεων πριν το πρώτο εξόνιο του γονιδίου *MSMB* και εδράζεται στον υποκινητή του, όπου ασκεί τη δράση του στο γονίδιο σε επίπεδο έκφρασης¹²⁸. Ο πολυμορφισμός αφορά τη νουκλεοτιδική αλλαγή T>C. Μελέτες GWAs έχουν δείξει τη συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη¹²⁹¹³⁰¹³¹¹³². Συγκεκριμένα, ο γονότυπος TT φέρει το μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου, οι ετεροζυγώτες TC φέρουν ενδιάμεσο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου και οι ομοζυγώτες CC φέρουν το μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη¹²⁹.

Το *KLK3* γονίδιο είναι ένας ακόμη υποψήφιος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη. Το γονίδιο *KLK3* κωδικοποιεί το ειδικό προστατικό αντιγόνο PSA, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του προστάτη, καθώς εκφράζεται σε ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα σε άνδρες με διαταραχές στον προστάτη. Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs2735839 απαντάται κοντά στο γονίδιο *KLK3* και έχει καταγραφεί ότι σχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα της νόσου. Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs2735839 βρίσκεται 600 ζεύγη βάσεων καθοδικά του γονιδίου *KLK3* στη θέση 19q13.33. Υπάρχουν δύο αλληλόμορφα για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό το (A), και το (G). Ο γονότυπος (AG) θεωρείται ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης πιο επιθετικής μορφής

καρκίνου του προστάτη κατά 1.6 φορές, ενώ ο γονότυπος (GG) κατά 1.8 φορές σε σχέση με τον γονότυπο (AA) σε ασθενείς με βαθμολογία κατά Gleason 7. Οι ασθενείς με βαθμολογία κατά Gleason 7 έχουν διαγνωστεί με όγκο στον προστάτη, ενδιάμεσου βαθμού επικινδυνότητας, γρήγορα αναπτυσσόμενο, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως όγκος μετρίου προς υψηλού κινδύνου. Η συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με ασθενείς κατηγορίας GS3 + 4 (Βαθμολογία κατά Gleason) και GS4 + 3 υποδηλώνει ότι μπορεί να βοηθήσει στην αξιολόγηση της διαστρωμάτωσης των ασθενών με GS7¹³³.

Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να εξετάσουμε την κατανομή των πολυμορφισμών rs2735839 του *KLK3* γονιδίου και rs10993994 του *MSMB* γονιδίου στον Ελληνικό πληθυσμό, δεδομένου ότι δεν βρήκαμε ανάλογη μελέτη, και τη συσχέτισή τους με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Επιπλέον, θελήσαμε να εξετάσουμε την πιθανή τους συσχέτιση με τη βαθμονόμηση κατά Gleason και με τα επίπεδα PSA των ασθενών.

Στη μελέτη συμπεριλάβαμε 49 ασθενείς με καρκίνο του προστάτη ηλικίας 65 ± 13.5 έτη (εύρος: 40-82 έτη). 17/49 ασθενείς (34.7%) κατηγοριοποιήθηκαν με Gleason score 6, 21/49 ασθενείς (42.9%) κατηγοριοποιήθηκαν με Gleason score 7, 2/48 ασθενείς (4.1%) κατηγοριοποιήθηκαν με Gleason score 8 και 4/49 ασθενείς (8.2%) κατηγοριοποιήθηκαν με Gleason score 9. Δεν υπήρχαν δεδομένα για το Gleason score 5 ασθενών (10.1%). Οι μετρήσεις του PSA αφορούν σε 36/49 ασθενείς (73.5%). Η μέση τιμή PSA των ασθενών υπολογίστηκε 12.19 ± 15.48 ng/ml (εύρος 0.007- 87.6).

Προκειμένου να εξετάσουμε την πιθανή συσχέτιση της παρουσίας των εξεταζόμενων πολυμορφισμών με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη συμπεριλάβαμε στη μελέτη και 50 υγιείς άνδρες χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου και ηλικίας μικρότερης των 30 ετών. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS version 22 και η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας το chi-square με κατώφλι σημαντικότητας $p < 0.05$, CI 95%.

Δεν ανιχνεύτηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κατανομής του πολυμορφισμού rs2735839 και τους κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη στην ομάδα μελέτης μας. Συγκεκριμένα, η κατανομή του πολυμορφικού αλληλομόρφου G ήταν εξίσου αυξημένη στους ασθενείς και στους υγιείς.

Η αυξημένη εμφάνιση του πολυμορφικού αλληλομόρφου στον υπό μελέτη πληθυσμό είναι αναμενόμενη, καθώς ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός αποτελεί κοινό πολυμορφισμό του *KLK3* γονιδίου και εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα σε

διάφορες πληθυσμιακές ομάδες, όπως και άλλοι πολυμορφισμοί του ευρύτερου γενετικού τόπου που εδράζεται, ο οποίος θεωρείται γονιδιακή έρημος¹³⁴.

Παλαιότερες μελέτες έχουν αναδείξει τη σύνδεση του πολυμορφισμού rs2735839 με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Η μελέτη των Kote-Jarai και συνεργατών (2011) που εξέτασε την κατανομή του πολυμορφισμού σε μία μεγάλη ομάδα μελέτης άνω των 5000 ατόμων, έδειξε πως ο πολυμορφισμός σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, όπως επίσης και με τα επίπεδα PSA στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη¹³⁵.

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με εκείνα μίας πρόσφατης μετα-ανάλυσης που εξέτασε την κατανομή πολυμορφισμών του *KLK3* γονιδίου και την πιθανή συσχέτισή τους με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη¹³⁶. Στη μελέτη απεικονίζεται η διαφοροποιημένη κατανομή του προγονικού και πολυμορφικού αλληλομόρφου, όπου η συχνότητα των δύο αλληλομόρφων είναι παρόμοια ή το αλληλόμορφο G εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα για διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες. Από τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς, ο rs2735839 δε συσχετίστηκε με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη¹³⁶.

Αντίστροφα, στη μελέτη των Motamedi και συνεργατών (2018) παρατηρήθηκε αυξημένη εμφάνιση του πολυμορφικού αλληλομόρφου G σε ετερόζυγη ή ομόζυγη μορφή (AG, GG) στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι ασθενείς που έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ετερόζυγη ή ομόζυγη μορφή διέτρεχαν αρκετά μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη¹³⁷.

Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με τα επίπεδα PSA στον ορό των ασθενών και με το σκορ κατά Gleason. Στη μελέτη των He και συνεργατών (2014), βρέθηκε πως ο πολυμορφισμός rs2735839 σχετίζεται με επιθετικότερη νόσο. Συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο A σχετίστηκε με αυξημένα σκορ κατά Gleason και επιθετικότερη νόσο, ενώ το αλληλόμορφο G σχετίστηκε με χαμηλότερα σκορ κατά Gleason και λιγότερο επιθετική νόσο¹³³. Με τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνεί και η μελέτη των Shu και συνεργατών (2016), η οποία αναφέρει πως το αλληλόμορφο A είναι συχνότερο σε ασθενείς με επιθετικότερη νόσο, ενώ το αλληλόμορφο G εμφανίζεται σε ασθενείς με λιγότερο επιθετική νόσο¹³⁸.

Στη δική μας μελέτη δεν εμφανίστηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs2735839 και του σκορ κατά Gleason. Παρόλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των ασθενών με χαμηλό σκορ κατά Gleason ήταν πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό ασθενών με υψηλό σκορ κατά Gleason.

Η εκτίμηση της συσχέτισης των επιπέδων PSA των ασθενών στον ορό με τον πολυμορφισμό rs2735839 οδηγεί σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, το εύρος του ανιχνεύσιμου PSA που χρησιμοποιήθηκε από όλες τις μελέτες είναι 4-10 ng/ml^{133,137,138}. Στη δική μας μελέτη δεν ήταν δυνατή η σύγκριση των επιπέδων PSA στον ορό των ασθενών και του πολυμορφισμού rs2735839. Το εύρος των μετρήσεων PSA ήταν πολύ μεγαλύτερο από αυτό των υπόλοιπων μελετών, γεγονός που δεν επέτρεπε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Σχετικά με τον πολυμορφισμό rs10993994 του *MSMB* γονιδίου, στην παρούσα εργασία δεν ανιχνεύτηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη ή του σκορ κατά Gleason. Η συχνότητα του προγονικού αλληλομόρφου C ήταν σημαντικά αυξημένη στην ομάδα των ασθενών και της ομάδας ελέγχου.

Δύο πρόσφατες μετα-αναλύσεις εξετάζουν την πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού rs10993994 και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Στη μετα-ανάλυση των Peng και συνεργατών (2017), 11 μελέτες από πληθυσμούς Καυκάσιων, Ασιατών, Αφροαμερικανών και ανάμικτοι εξετάστηκαν για την κατανομή του πολυμορφισμού rs10993994 και τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη. Η μελέτη έδειξε πως η συχνότητα και των δύο αλληλομόρφων του πολυμορφισμού είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες, καθώς αποτελεί κοινό πολυμορφισμό. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη μελέτη, η παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη στους πληθυσμούς των Ασιατών και των Καυκάσιων, ενώ αυτή η συσχέτιση είναι σημαντικά χαμηλότερη σε ανάμικτους πληθυσμούς και πληθυσμούς Αφρο-Αμερικανών¹³⁹.

Αντίστοιχα αποτελέσματα προέρχονται και από τη μετα-ανάλυση των Fu και συνεργατών (2019). Η συγκεκριμένη μελέτη συμπεριέλαβε 13 μελέτες διαφορετικών εθνικοτήτων και αντικρουόμενων αποτελεσμάτων σχετικά με τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs10993994 με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη. Η μελέτη έδειξε πως ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, παρουσία του πολυμορφισμού rs10993994 είναι υψηλός για τους Καυκάσιους και τους Ασιάτες¹²⁷.

Συνοψίζοντας παρατηρούμε ότι υπάρχει μεγάλη απόκλιση και ετερογένεια μεταξύ των διαφόρων μελετών. Οι αποκλίσεις μπορούν να αιτιολογηθούν σε μεγάλο βαθμό από τον αριθμό των δειγμάτων, τη φυλετική προέλευση, τη διαφορετική μεθοδολογία ανάλυσης, καθώς επίσης σημαντικό ρόλο ενδέχεται να παίζουν κι άλλοι παράγοντες όπως η διατροφή και το κάπνισμα. Η παρούσα εργασία αποτελεί μια πρώτη μελέτη,

από όσο γνωρίζουμε, των εν λόγω πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό. Ασφαλώς, χρειάζεται εξέταση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να έχουμε μια καλύτερη εικόνα σχετικά με την συχνότητα των συγκεκριμένων πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό αλλά και τον πιθανό τους ρόλο στην καρκινογένεση του προστάτη.

Βιβλιογραφία

1. Hutch JA, *Rambo ON*: A study of the anatomy of the prostate, prostatic urethra and the urinary sphincter system. *J Urol* 1970,104:443-452
2. Evatt EJ: A contribution to the development of the prostate in man. *J An. Physiol* 1909, 43:314-321
3. Moore RA: The histology of the newborn and prepubertal prostate gland. *Anat Rec* 1936, 66:1-9
4. Farnsworth WE: Prolactin effect on the permeability of benign hyperplastic prostate to testosterone. *Prostate* 1988, 12:222-229
5. Prostate Gland (Human Anatomy): Prostate Picture, Definition, Function, Conditions, Tests, and Treatments. Accessed October 9, 2020. <https://www.webmd.com/men/picture-of-the-prostate#1>
6. Y. Omoto, H. Iwase. Clinical significance of ER β in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Science* 106 2015, (4): 337-343, <https://doi.org/10.1111/cas.12613>
7. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(12). doi:10.1101/cshperspect.a030361
8. Mucci LA, Wilson KM, Giovannucci EL. Epidemiology of prostate cancer. In: *Pathology and Epidemiology of Cancer*. 2016(10):107-125. doi:10.1007/978-3-319-35153-7_9
9. Epidemiology of prostate cancer in Europe | EU Science Hub. Accessed October 9, 2020. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/epidemiology-prostate-cancer-europe>
10. Toivanen R, Shen MM. Prostate organogenesis: Tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Dev*. 2017;144(8):1382-1398. doi:10.1242/dev.148270
11. McClure T, Basourakos SP, Sandhu JS, Schlegel PN, Colt JJ. Prostate cancer. In: *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Elsevier; 2018:784-792. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.95929-4
12. Lee CL, Kuo HC. Pathophysiology of benign prostate enlargement and lower urinary tract symptoms: Current concepts. *Tzu Chi Med J*. 2017;29(2):79-83. doi:10.4103/tcmj.tcmj_20_17
13. Crawford ED, Miller GJ, Labrie F, Hirano D, Batuello J, Glodé LM. Prostate cancer pathology, screening, and epidemiology. *Rev Urol*. 2001;3 Suppl 2(Suppl 2):S2-S10. Accessed November 22, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985996>
14. Descotes JL. Diagnosis of prostate cancer. *Asian J Urol*. 2019;6(2):129-136. doi:10.1016/j.ajur.2018.11.007

15. PSA: Prostate-Specific Antigen, Persisting Scientific Ambiguities - Harvard Health. Accessed October 14, 2020. https://www.health.harvard.edu/newsletter_article/PSA-Prostate-Specific-Antigen-Persisting-Scientific-Ambiguities
16. Makarov D V., Carter HB. The Discovery of Prostate Specific Antigen as a Biomarker for the Early Detection of Adenocarcinoma of the Prostate. *J Urol*. 2006;176(6):2383-2385. doi:10.1016/j.juro.2006.08.019
17. Stephan C, Jung K, Lein M, Diamandis EP. PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection. *Eur J Cancer*. 2007;43(13):1918-1926. doi:10.1016/j.ejca.2007.06.006
18. Prostate cancer - PSA testing - NHS. Accessed October 9, 2020. <https://www.nhs.uk/conditions/prostate-cancer/psa-testing/>
19. Harvey CJ, Pilcher J, Richenberg J, Patel U, Frauscher F. Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. *Br J Radiol*. 2012;85(SPEC. ISSUE 1):S3. doi:10.1259/bjr/56357549
20. Katz A, Olsson C, Raffo A, et al. Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase PCR assay. *Urology* 1994; 43:765
21. Fournier GR Jr, AND Narayan P. Reevaluation of the need for pelvic node dissection in surgical treatment of low grade prostate cancer. *J Urol* 1993, 149:380A
22. Sweeney PJ, Resnick MI. The role of ultrasound in prostate cancer. *Urol Annu* 1992, 6:35
23. Abi-Aad AS, Macfarlane MT, Stein A, and deKernion JB. Detention of local recurrence after radical prostatectomy by prostate specific antigen and transrectal ultrasound. *J Urol* 1992, 147: 952- 956
24. Onik GM, Cohen JK, Reyes GD, Rubinsky B, Chang Z, Baust J. Transrectal ultrasound-guided percutaneous radical cryosurgical ablation of the prostate. *Cancer* 1993, 72:1291-1299
25. Agatsein EH, Hernandez FJ, Layfield LJ, et al. Use of fine needle aspiration for detection of stage A prostatic carcinoma before transurethral resection of the prostate: A clinical trial. *J Urol* 1987; 138:551-553
26. Andriole GL, Kavoussi LR, Torrence RJ, et al. Transrectal ultrasonography in the diagnosis and staging of prostate cancer. *J Urol* 1988; 140:758-760.
27. Streicher J, Meyerson BL, Karivedu V, Sidana A. A review of optimal prostate biopsy: indications and techniques. *Ther Adv Urol*. 2019; 11:175628721987007 doi:10.1177/1756287219870074
28. Shariat SF, Roehrborn CG. Using biopsy to detect prostate cancer. *Rev Urol*. 2008;10(4):262-280. Accessed November 23, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19145270>

29. Bezzi M, Kressel HY, Allen KS, et al. Prostatic carcinoma: Staging with MR imaging at 1.5T. *Radiology* 1988, 169:339
30. Borley N, Feneley MR. Prostate cancer: Diagnosis and staging. *Asian J Androl.* 2009;11(1):74-80. doi:10.1038/aja.2008.19
31. Rosen RD, Sapra A. *TNM Classification*. StatPearls Publishing; 2020. Accessed October 10, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31985980>
32. TNM staging | Prostate cancer | Cancer Research UK. Accessed October 12, 2020. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/prostate-cancer/stages/tnm-staging>
33. Paner G., Stadler W., Hansel D., Montironi R., Lin D., Amin M. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. *Eur Urol.* 2018,(73)4:570–571
34. Gleason DF, Mellinger GT, and the Veterans, Administration Cooperative Urological Research Group: Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974, 111:58
35. Munjal A, Leslie SW. *Gleason Score*. StatPearls Publishing; 2020. Accessed October 10, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31985971>
36. Chen N, Zhou Q. The evolving gleason grading system. *Chinese J Cancer Res.* 2016;28(1):58-64. doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.04
37. Gordetsky J, Epstein J. Grading of prostatic adenocarcinoma. Current state and prognostic implications. *Diagn Pathol.* 2016;11(1). doi:10.1186/s13000-016-0478-2
38. Braunhut B, Punnen S, Kryvenko O. Updates on Grading and Staging of Prostate Cancer. *Surg Pathol Clin* 2018,11(4):759-774. doi: 10.1016/j.path.2018.07.003
39. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: International comparisons. *BJU Int.* 2002;90(2):162-173. doi:10.1046/j.1464-410X.2002.2822.x
40. Matsushita M, Fujita K, Nonomura N. Influence of diet and nutrition on prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4). doi:10.3390/ijms21041447
41. Wigle DT, Turner MC, Gomes J, Parent M-É. Role of Hormonal and Other Factors in Human Prostate Cancer. *J Toxicol Environ Heal Part B.* 2008;11(3-4):242-259. doi:10.1080/10937400701873548
42. Qin X, Cui Y, Shen L, et al. Folic acid supplementation and cancer risk: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cancer.* 2013;133(5):1033-1041. doi:10.1002/ijc.28038
43. Alexander DD, Mink PJ, Cushing CA, Scourman B. A review and meta-analysis of prospective studies of red and processed meat intake and prostate cancer. *Nutr J.* 2010;9(1):50. doi:10.1186/1475-2891-9-50

44. Gathirua-Mwangi WG, Zhang J. Dietary factors and risk for advanced prostate cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2014;23(2):96-109. doi:10.1097/CEJ.0b013e3283647394
45. Tao Z, Shi A, Wang K, Zhang W. Epidemiology of prostate cancer: current status. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(5):805-12.
46. O Bratt. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol.* 2002;168(3). doi:10.1097/01.JU.0000024402.67529.CA
47. Wallis CJD, Nam RK. Prostate Cancer Genetics: A Review. *EJIFCC.* 2015;26(2):79-91. Accessed October 9, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27683484>
48. Venkateswaran V, Klotz LH. Diet and prostate cancer: Mechanisms of action and implications for chemoprevention. *Nat Rev Urol.* 2010;7(8):442-453. doi:10.1038/nrur.2010.102
49. McClure T, Basourakos SP, Sandhu JS, Schlegel PN, Colt JJ. Prostate cancer. In: *Encyclopedia of Endocrine Diseases.* Elsevier; 2018:784-792. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.95929-4
50. Hayes RB, Liff JM, Potters LM, et al. Prostate cancer risk in U.S. blacks and whites with a family history of cancer. *Int J Cancer.* 1995;60(3):361-364. doi:10.1002/ijc.2910600315
51. Smith JR, Freije D, Carpten JD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science (80-).* 1996;274(5291):1371-1374. doi:10.1126/science.274.5291.1371
52. Rebbeck TR. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Semin Radiat Oncol.* 2017;27(1):3-10. doi:10.1016/j.semradonc.2016.08.002
53. Ostrander EA, Stanford JL. Genetics of prostate cancer: Too many loci, too few genes. *Am J Hum Genet.* 2000;67(6):1367-1375. doi:10.1086/316916
54. Keetch DW, Rice JP, Suarez BK, Catalona WJ. Familial Aspects of Prostate Cancer: A Case Control Study. *J Urol.* 1995;154(6):2100-2102. doi:10.1016/S0022-5347(01)66705-3
55. Singh R, Eeles RA, Durocher F, et al. High risk genes predisposing to prostate cancer development do they exist? *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2000;3(4):241-247. doi:10.1038/sj.pcan.4500478
56. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(8):3367-3371. doi:10.1073/pnas.89.8.3367
57. Page WF, Braun MM, Partin AW, Caporaso N, Walsh P. Heredity and prostate cancer: A study of world war II veteran twins. *Prostate.* 1997;33(4):240-245. doi:10.1002/(SICI)1097-0045(19971201)33:4<240::AID-PROS3>3.0.CO;2-L

58. Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML, Thibodeau SN. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet.* 1998;62(6):1425-1438. doi:10.1086/301862
59. Narod SA, Dupont A, Cusan L, et al. The impact of family history on early detection of prostate cancer. *Nat Med.* 1995;1(2):99-101. doi:10.1038/nm0295-99
60. Monroe KR, Yu MC, Kolonel LN, et al. Evidence of an x-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk. *Nat Med.* 1995;1(8):827-829. doi:10.1038/nm0895-827
61. Tulinius H, Olafsdottir GH, Sigvaldason H, Tryggvadottir L, Bjarnadottir K. Neoplastic diseases in families of breast cancer patients. *J Med Genet.* 1994;31(8):618-621. doi:10.1136/jmg.31.8.618
62. Sigurdsson S, Thorlacius S, Tomasson J, et al. BRCA2 mutation in Icelandic prostate cancer patients. *J Mol Med.* 1997;75(10):758-761. doi:10.1007/s001090050162
63. Goode EL, Stanford JL, Chakrabarti L, et al. Linkage analysis of 150 high-risk prostate cancer families at 1q24-25. *Genet Epidemiol.* 2000;18(3):251-275. doi:10.1002/(SICI)1098-2272(200003)18:3<251::AID-GEPI5>3.0.CO;2-X
64. Yeager M, Orr N, Hayes RB, et al. Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nat Genet.* 2007;39(5):645-649. doi:10.1038/ng2022
65. Gudmundsson J, Sulem P, Manolescu A, et al. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nat Genet.* 2007;39(5):631-637. doi:10.1038/ng1999
66. Kote-Jarai Z, Olama AA Al, Giles GG, et al. Seven prostate cancer susceptibility loci identified by a multi-stage genome-wide association study. *Nat Genet.* 2011;43(8):785-791. doi:10.1038/ng.882
67. El-Shirbiny AM. Prostatic Specific Antigen. In: *Advances in Clinical Chemistry.* Vol 31. Adv Clin Chem; 1994:99-133. doi:10.1016/S0065-2423(08)60334-0
68. McClure T, Basourakos SP, Sandhu JS, Schlegel PN, Colt JJ. Prostate cancer. In: *Encyclopedia of Endocrine Diseases.* Elsevier; 2018:784-792. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.95929-4
69. Stephan C, Jung K. Advances in biomarkers for PCa diagnostics and prognostics—A way towards personalized medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10). doi:10.3390/ijms18102193
70. Rebbeck TR. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Semin Radiat Oncol.* 2017;27(1):3-10. doi:10.1016/j.semradonc.2016.08.002
71. Chen H, Liu X, Brendler CB, et al. Adding genetic risk score to family history identifies twice as many high-risk men for prostate cancer: Results from the prostate cancer prevention trial. *Prostate.* 2016;76(12):1120-1129. doi:10.1002/pros.23200

72. Kiciński M, Vangronsveld J, Nawrot TS. An epidemiological reappraisal of the familial aggregation of prostate cancer: A meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(10):27130. doi:10.1371/journal.pone.0027130
73. Bruner DW, Moore D, Parlanti A, Dorgan J, Engstrom P. Relative risk of prostate cancer for men with affected relatives: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2003;107(5):797-803. doi:10.1002/ijc.11466
74. Barfeld SJ, East P, Zuber V, Mills IG. Meta-analysis of prostate cancer gene expression data identifies a novel discriminatory signature enriched for glycosylating enzymes. *BMC Med Genomics*. 2014;7(1):513. doi:10.1186/s12920-014-0074-9
75. Rebbeck TR. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Semin Radiat Oncol*. 2017;27(1):3-10. doi:10.1016/j.semradonc.2016.08.002
76. Peng T, Zhang L, Zhu L, Mi YY. MSMB gene rs10993994 polymorphism increases the risk of prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8(17):28494-28501. doi:10.18632/oncotarget.15312
77. Thorek DLJ, Evans MJ, Carlsson S V., Ulmert D, Lilja H. Prostate-specific kallikrein-related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection. *Thromb Haemost*. 2013;110(3):484-492. doi:10.1160/TH13-04-0275
78. Valtonen-André C, Sävsblom C, Fernlund P, Lilja H, Giwercman A, Lundwall A (2008). "Beta-microseminoprotein in serum correlates with the levels in seminal plasma of young, healthy males". *J. Androl*. 29 (3): 330–7. doi:10.2164/jandrol.107.003616
79. Beke L, Nuytten M, Van Eynde A, Beullens M, Bollen M. The gene encoding the prostatic tumor suppressor PSP94 is a target for repression by the Polycomb group protein EZH2. *Oncogene*. 2007; 26:4590-4595
80. Xu B, Wang J, Tong N, Mi Y, Min Z, Tao J, Li P, Cheng G, Li J, Wang M, Tang J, Song N, Zhang Z, et al. A functional polymorphism in MSMB gene promoter is associated with prostate cancer risk and serum MSMB expression. *The Prostate*. 2010; 70:1146-1152.
81. Beta-Microseminoprotein, Human Recombinant Protein [228-11336]. Accessed November 13, 2020. https://www.raybiotech.com/beta-microseminoprotein-human-recombinant-en/?variation_id=55779
82. Beta Microseminoprotein - an overview | ScienceDirect Topics. Accessed November 13, 2020. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/beta-microseminoprotein>
83. Reeves JR, Xuan JW, Arfanis K, et al. Identification, purification and characterization of a novel human blood protein with binding affinity for prostate secretory protein of 94 amino acids. *Biochem J*. 2005;385(1):105-114. doi:10.1042/BJ20040290
84. MSMB Gene - GeneCards | MSMB Protein | MSMB Antibody. Accessed November 13, 2020. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MSMB>

85. Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet.* 2008;40(3):310-315. doi:10.1038/ng.91
86. Ghasriani H, Teilum K, Johnsson Y, Fernlund P, Drakenberg T. Solution Structures of Human and Porcine β -Microseminoprotein. *J Mol Biol.* 2006;362(3):502-515. doi:10.1016/j.jmb.2006.07.029
87. MSMB microseminoprotein beta [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Accessed November 13, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4477>
88. Valtonen-Andre C, Savblom C, Fernlund P, Lilja H, Giwercman A, Lundwall A. Beta-Microseminoprotein in Serum Correlates With the Levels in Seminal Plasma of Young, Healthy Males. *J Androl.* 2008;29(3):330-337. doi:10.2164/jandrol.107.003616
89. Dahlman A, Rexhepaj E, Brennan DJ, et al. Evaluation of the prognostic significance of MSMB and CRISP3 in prostate cancer using automated image analysis. *Mod Pathol.* 2011;24(5):708-719. doi:10.1038/modpathol.2010.238
90. Garde S V., Basrur VS, Li L, et al. Prostate secretory protein (PSP94) suppresses the growth of androgen- independent prostate cancer cell line (PC3) and xenografts by inducing apoptosis. *Prostate.* 1999;38(2):118-125. doi:10.1002/(SICI)1097-0045(19990201)38:2<118::AID-PROS5>3.0.CO;2-G
91. Shukeir N, Arakelian A, Chen G, et al. A synthetic 15-mer peptide (PCK3145) derived from prostate secretory protein can reduce tumor growth, experimental skeletal metastases, and malignancy-associated hypercalcemia. *Cancer Res.* 2004;64(15):5370-5377. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0788
92. Garde S, Fraser JE, Nematpoor N, et al. Cloning, expression, purification and functional characterization of recombinant human PSP94. *Protein Expr Purif.* 2007;54(2):193-203. doi:10.1016/j.pep.2007.03.008
93. Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, et al. A PSP94-derived peptide PCK3145 inhibits MMP-9 secretion and triggers CD44 cell surface shedding: Implication in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22(5):429-439. doi:10.1007/s10585-005-2669-1
94. Shukeir N, Arakelian A, Chen G, et al. A synthetic 15-mer peptide (PCK3145) derived from prostate secretory protein can reduce tumor growth, experimental skeletal metastases, and malignancy-associated hypercalcemia. *Cancer Res.* 2004;64(15):5370-5377. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0788
95. Annabi B, Currie JC, Bouzeghrane M, et al. Contribution of the 37-kDa laminin receptor precursor in the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 cell surface binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346(1):358-366. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.139
96. Crystal structure of prostate secretory protein PSP94 shows an edge-to-edge association of two monomers to form a homodimer. Kumar A, Jagtap DD, Mahale SD, Kumar M, J. Mol. Biol. 397 947-56 (2010), doi: 10.1016/j.jmb.2010.02.035, <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3ix0>.

97. Mhatre DR, Mahale SD, Khatkhatay MI, et al. The rs10993994 in the proximal MSMB promoter region is a functional polymorphism in Asian Indian subjects. *Springerplus*. 2015;4(1). doi:10.1186/s40064-015-1164-7
98. rs10993994 - SNPedia. Accessed November 16, 2020. <https://www.snpedia.com/index.php/Rs10993994>
99. Peng T, Zhang L, Zhu L, Mi YY. MSMB gene rs10993994 polymorphism increases the risk of prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8(17):28494-28501. doi:10.18632/oncotarget.15312
100. Mhatre DR, Mahale SD, Khatkhatay MI, et al. The rs10993994 in the proximal MSMB promoter region is a functional polymorphism in Asian Indian subjects. *Springerplus*. 2015;4(1):380. doi:10.1186/s40064-015-1164-7
101. Trujillo-Cáceres SJ, Torres-Sánchez L, Burguete-García AI, et al. Contribution of MSMB promoter region gene polymorphism to early-onset prostate cancer risk in Mexican males. *Oncotarget*. 2019;10(7):738-748. doi:10.18632/oncotarget.26592
102. Xu X, Valtonen-André C, Sävbblom C, Halldén C, Lilja H, Klein RJ. Polymorphisms at the microseminoprotein- β locus associated with physiologic variation in β -microseminoprotein and prostate-specific antigen levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(8):2035-2042. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0431
103. Shui IM, Lindstrom S, Kibel AS, Berndt SI, Campa D, Gerke T, et al. Prostate cancer (PCa) risk variants and risk of fatal PCa in the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *Eur Urol* 2014; 65: 1069-1075
104. KLK3 Gene - GeneCards | KLK3 Protein | KLK3 Antibody. Accessed November 16, 2020. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KLK3>
105. Mittal RD, Mishra DK, Thangaraj K, Singh R, Mandhani A. Is there an inter-relationship between prostate specific antigen, kallikrein-2 and androgen receptor gene polymorphisms with risk of prostate cancer in north Indian population? *Steroids*. 2007;72(4):335-341. doi:10.1016/j.steroids.2006.12.004
106. Cunningham JM, Hebring SJ, McDonnell SK, et al. Evaluation of genetic variations in the androgen and estrogen metabolic pathways as risk factors for sporadic and familial prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(5):969-978. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0767
107. 3QUM: Crystal Structure Of Human Prostate Specific Antigen (Psa) In Fab Sandwich With A High Affinity And A Pca Selective Antibody. Accessed November 6, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/3QUM>
108. Klein RJ, Halldén C, Cronin AM, et al. Blood biomarker levels to aid discovery of cancer-related single-nucleotide polymorphisms: Kallikreins and prostate cancer. *Cancer Prev Res*. 2010;3(5):611-619. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0206

109. Fuhrman-Luck RA, Loessner D, Clements JA. Kallikrein-Related Peptidases in Prostate Cancer: From Molecular Function to Clinical Application. *EJIFCC*. 2014;25(3):269-281. Accessed October 21, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27683474>
110. KLK3|Cancer Genetics Web. Accessed November 18, 2020. <http://www.cancerindex.org/geneweb/KLK3.htm>
111. Li HF, Xie Q, Nie QW, Ye X. Prostate specific antigen as a biomarker for breast cancer: A meta-analysis study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(13):4188-4195. doi:10.26355/eurrev_201807_15412
112. Levesque M, Hu H, Diamandis EP, D'Costa M. Prostate-Specific antigen expression by various tumors. *J Clin Lab Anal*. 1995;9(2):123-128. doi:10.1002/jcla.1860090209
113. Bonk S, Kluth M, Hube-Magg C, et al. Prognostic and diagnostic role of PSA immunohistochemistry: A tissue microarray study on 21,000 normal and cancerous tissues. *Oncotarget*. 2019;10(52):5439-5453. doi:10.18632/oncotarget.27145
114. Gurova K V., Roklin OW, Krivokrysenko VI, et al. Expression of prostate specific antigen (PSA) is negatively regulated by p53. *Oncogene*. 2002;21(1):153-157. doi:10.1038/sj.onc.1205001
115. Ménez R, Michel S, Muller BH, Bossus M, Ducancel F, Jolivet-Reynaud C, Stura EA. Crystal structure of a ternary complex between human prostate-specific antigen, its substrate acyl intermediate and an activating antibody, *J. Mol. Biol.* 2008,376 1021-33, PMID: 18187150, doi: 10.1016/j.jmb.2007.11.052, <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2zcl>
116. Kote-Jarai Z, Al Olama AA, Leongamornlert D, Tymrakiewicz M, Saunders E, Guy M, et al. Identification of a novel prostate cancer susceptibility variant in the KLK3 gene transcript. *Hum Genet*. 2011;129(6):687
117. Hsu F-C, Sun J, Wiklund F, Isaacs SD, Wiley KE, Purcell LD, et al. A novel prostate cancer susceptibility locus at 19q13. *Cancer Res*. 2009;69(7): 2720–3
118. He Y, Gu J, Strom S, Logothetis CJ, Kim J, Wu X. The prostate cancer susceptibility variant rs2735839 near KLK3 gene is associated with aggressive prostate cancer and can stratify Gleason score 7 patients. *Clin Cancer Res*. 2014;20(19):5133 –9
119. rs2735839 - SNPedia. Accessed November 19, 2020. <https://www.snpedia.com/index.php/Rs2735839>
120. Parikh H, Wang Z, Pettigrew KA, et al. Fine mapping the KLK3 locus on chromosome 19q13.33 associated with prostate cancer susceptibility and PSA levels. *Hum Genet*. 2011;129(6):675-685. doi:10.1007/s00439-011-0953-5
121. Calle EE, Rodriguez C, Jacobs EJ, et al. The American Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort: Rationale, study design, and baseline characteristics. *Cancer*. 2002;94(9):2490-2501. doi:10.1002/cncr.101970

122. Næss Ø, Sjøgaard AJ, Arnesen E, et al. Cohort profile: Cohort of Norway (CONOR). *Int J Epidemiol.* 2008;37(3):481-485. doi:10.1093/ije/dym217
123. Prorok PC, Andriole GL, Bresalier RS, et al. Design of the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Control Clin Trials.* 2000;21(6 Suppl). doi:10.1016/s0197-2456(00)00098-2
124. Valeri A, Briollais L, Azzouzi R, et al. Segregation analysis of prostate cancer in France: Evidence for autosomal dominant inheritance and residual brother-brother dependence. *Ann Hum Genet.* 2003;67(2):125-137. doi:10.1046/j.1469-1809.2003.00022.x
125. Pomerantz MM, Werner L, Xie W, et al. Association of prostate cancer risk loci with disease aggressiveness and prostate cancer-specific mortality. *Cancer Prev Res.* 2011;4(5):719-728. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0292
126. Beikzadeh B, Angaji SA, Abolhasani M. Association study between common variations in some candidate genes and prostate adenocarcinoma predisposition through multi-stage approach in Iranian population. *BMC Med Genet.* 2020;21(1):81. doi:10.1186/s12881-020-01014-0
127. Fu S., Huang Y.L., Luan T., Wang H-F., Wang, J-s. A meta-analysis of influence of MSMB promoter rs10993994 polymorphisms on prostate cancer risk. *Eu Rev Med Pharmacol Sci,* 2019, 23: 9295-9303
128. Sutcliffe S., De Marzo A.M., Sfanos K.S., Lawrence M. MSMB Variation and Prostate Cancer Risk: Clues Towards a Possible Fungal Etiology. *Prostate.* 2014,74(6): 569–578. doi:10.1002/pros.22778.
129. Kote-Jarai Z, Easton DF, Stanford JL, Ostrander EA, Schleutker J, Ingles SA, et al. Multiple novel prostate cancer predisposition loci confirmed by an international study: The PRACTICAL Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(8):2052–2061. [PubMed: 18708398]
130. Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet.* 2008; 40(3):310–315. [PubMed: 18264096]
131. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, Mulholland S. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet.* 2008; 40(3):316–321. [PubMed: 18264097]
132. Chang BL, Spangler E, Gallagher S, Haiman CA, Henderson B, Isaacs W. Validation of genome-wide prostate cancer associations in men of African descent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20(1):23–32. [PubMed: 21071540]

133. He Y., Gu J., Strom S., Logothetis CJ., Kim J, Wu X. The Prostate Cancer Susceptibility Variant rs2735839 Near KLK3 Gene Is Associated with Aggressive Prostate Cancer and Can Stratify Gleason Score 7 Patients. *Clin Cancer Res.* 2014,1; 20(19): 5133–5139. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0661.
134. Beikzadeh, B., Angaji, S.A., Abolhasani, M. Association study between common variations in some candidate genes and prostate adenocarcinoma predisposition through multi-stage approach in Iranian population. *BMC Medical Genetics* 2020,21:81. <https://doi.org/10.1186/s12881-020-01014-0>
135. Kote-Jarai, Z., Olama, A.A, Leongamornlert, D., Tymrakiewicz, M., saunders., E. et al. (2011). Identification of a novel prostate cancer susceptibility variant in the KLK3 gene transcript. *Hum Genet* 129:687–694DOI 10.1007/s00439-011-0981-1
136. Ding, W.H., Ren, K.W., Yue, C., Zou, JG., Zuo, L., ZHANG, LF., Bai, Y. Okada, A., Yasui, T., Mi, Y.Y. (2019). Association between three genetic variants in kallikrein 3 and prostate cancer risk. *Bioscience Reports.* 38 BSR20181151 <https://doi.org/10.1042/BSR20181151>
137. Motamedi, R.K., Sarhangi, N., Afshari, M., Sattari, M., Jamaldini, S.H., Samzadeh, M., Mohsen Ziaei, S.A., Pourmand, G.R, Hasanzad, M. (2018). Kallikarein-related peptidase 3 common genetic variant and the risk of prostate cancer. *J Cell Biochem.* DOI: 10.1002/jcb.28743
138. Shu, X., Ye, Y., Gu, J. He, Y. Davis, J.W., Thompson, T.C., Logothetis, C.J., Kim, J., Wu, X. (2016). Genetic variants of the Wnt signaling pathway as predictors of aggressive disease and reclassification in men with early stage prostate cancer on active surveillance. *Carcinogenesis Vol. 37, No. 10, 965–971*
139. Peng, T., Zhang, L., Zhu, L., Mi, Y.Y. (2017). MSMB gene rs10993994 polymorphism increases the risk of prostate cancer. *Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 17), pp: 28494-2850*