

POLIMORFIZAM IL-1fi, IL-8 I VEGF GENA U KARCINOMU

Horvat, Vesna

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:590294>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

Vesna Horvat

**POLIMORFIZAM *IL-1 β* , *IL-8* I *VEGF* GENA U KARCINOMU
PROSTATE**

Doktorska disertacija

Osijek, 2015.

Mentor: prof. prim. dr. sc. Josip Galić, dr. med.

Rad ima 108 listova.

Ova je doktorska disertacija izrađena u okviru znanstvenog projekta „Imunološki čimbenici razvoja i progresije karcinoma prostate“ (219-0000000-3363) podržanog od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, voditelja prof. prim. dr. sc. Josipa Galića, dr. med.

Zahvaljujem se mentoru prof. prim. dr. sc. Josipu Galiću koji je usprkos svojim bezbrojnim obavezama pristao biti mentorom mojoj doktorskoj disertaciji. Zahvaljujem mu se na neizrecivom povjerenju koje mi je ukazao uključivši me u svoj znanstveno-istraživački projekt, na materijalnoj potpori, velikoj i nesebičnoj pomoći te podršci koja je ugrađena u ovaj rad.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ljubici Glavaš - Obrovac i dr. sc. Saški Marczy na stručnim savjetima, izradi svih genskih analiza te na prijateljskoj podršci i ohrabrenju.

Hvala prof. dr. sc. Milanki Mrčeli na trudu i dragocjenom vremenu koje je utrošila tijekom patohistološke analize uzoraka.

Također se zahvaljujem svim djelatnicima Klinike za urologiju koji su nesebično pomogli u izradi ove disertacije.

Posebna zahvala mom šefu, doc. dr. sc. Vatroslavu Šeriću na prijateljskim i stručnim savjetima te na stalnoj podršci i vjeri u mene.

Hvala mojoj kolegici i prijateljici dr. sc. Sanji Mandić bez koje ništa ne bi bilo isto i njenom suprugu na stalnoj tehničkoj potpori.

Hvala i mojim dragim kolegicama iz Doma zdravlja Boženi Helfrich Krmek, Branki Bojčić i nažalost pokojnoj Ljerki Brijaček što su me svojim nesebičnim savjetima, stalnom podrškom i vjerom u mene prvo oblikovale kao medicinskog biokemičara, a zatim usmjerile u pravcu znanosti.

Hvala mojim dragim suradnicima na svesrdnoj podršci svih ovih godina i svima onima koji su svojom podrškom i savjetima doprinijeli izradi ove disertacije.

Ovaj rad posvećujem mojim roditeljima **Zorki i Hubertu** i suprugu **Zorislavu**. Hvala vam na ljubavi, bezuvjetnoj podršci i neizmjernej vjeri u moj uspjeh.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Prostata	2
1.2. Benigna hiperplazija prostate (BHP)	2
1.3. Prostatična intraepitelna neoplazija (PIN)	4
1.4. Karcinom prostate	4
1.4.1. Epidemiologija karcinoma prostate	4
1.4.2. Čimbenici rizika.....	6
1.4.2.1. Endogeni čimbenici.....	7
1.4.2.2. Egzogeni čimbenici.....	9
1.4.3. Patologija	11
1.4.4. Gleason zbroj i TNM klasifikacija.....	12
1.5. Dijagnostika karcinoma prostate	14
1.5.1. Digitorektalni pregled (DRP).....	14
1.5.2. Tumorski markeri	15
1.5.3. Transrektalni ultrazvuk (TRUZ).....	20
1.5.4. Biopsija prostate	20
1.6. Angiogeneza	20
1.6.1. Tumorska angiogeneza	22
1.7. Citokini	24
1.7.1. Interleukin-1 β (IL-1 β).....	26
1.7.2. Interleukin-8 (IL-8).....	27
1.7.3. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF).....	28
2. HIPOTEZA	30
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
4. ISPITANICI I METODE	32
4.1. Ustroj studije	32
4.2. Ispitanici	32
4.3. Metode	33

4.3.1. Klinički pregled	33
4.3.2. Laboratorijski testovi	34
4.3.2.1. Određivanje koncentracije PSA-a.....	34
4.3.2.2. Analiza polimorfizama gena <i>IL-1β</i> , <i>IL-8</i> i <i>VEGF</i>	34
4.4. Statistička obrada podataka	39
5. REZULTATI.....	40
5.1. Demografski i klinički parametri ispitivanih skupina.....	40
5.1.1. Dob ispitanika	40
5.1.2. Indeks tjelesne težine ispitanika	41
5.1.3. Serumske vrijednosti PSA ispitanika	42
5.1.4. Obiteljska anamneza karcinoma prostate ispitanika	43
5.1.5. Status pušenja u ispitivanim skupinama	43
5.1.6. Konzumiranje alkohola u ispitivanim skupinama	44
5.1.7. Vrijednosti Gleason zbroja kod bolesnika s karcinomom prostate	44
5.1.8. Stadiji tumora kod bolesnika s karcinomom prostate	45
5.1.9. Status limfnih čvorova kod bolesnika s karcinomom prostate	46
5.1.10. Status metastaza kod bolesnika s karcinomom prostate	46
5.2. Analiza polimorfizama u <i>IL-1β</i>, <i>IL-8</i> i <i>VEGF</i> genima.....	47
5.2.1. Polimorfizam <i>IL-1β</i> gena	47
5.2.2. Polimorfizam <i>IL-8</i> gena	51
5.2.3. Polimorfizam <i>VEGF</i> gena	54
5.3. Analiza međudjelovanja polimorfizama <i>IL-1β</i>, <i>IL-8</i> i <i>VEGF</i> gena s etiološkim i kliničko-patološkim odlikama skupine	57
5.3.1. Međudjelovanje polimorfizama <i>IL-1β</i> , <i>IL-8</i> i <i>VEGF</i> gena s obiteljskom anamnezom	57
5.3.2. Međudjelovanje polimorfizama <i>IL-1β</i> , <i>IL-8</i> i <i>VEGF</i> gena s indeksom tjelesne težine	59
5.3.3. Međudjelovanje polimorfizama <i>IL-1β</i> , <i>IL-8</i> i <i>VEGF</i> gena sa statusom pušenja	63
5.3.4. Međudjelovanje polimorfizama <i>IL-1β</i> , <i>IL-8</i> i <i>VEGF</i> gena s konzumiranjem alkohola	65
5.3.5. Međudjelovanje polimorfizama <i>IL-1β</i> , <i>IL-8</i> i <i>VEGF</i> gena sa serumskim koncentracijama PSA	67

6. RASPRAVA	74
7. ZAKLJUČCI.....	86
8. SAŽETAK	87
9. SUMMARY	89
10. LITERATURA.....	91
11. ŽIVOTOPIS	107

Popis kratica i pojmova

A2M	α 2-makroglobulin
ACT	α 1-antikimotripsin
AK	aminokiseline
API	α 1-proteaza inhibitor
AR	androgeni receptor
bFGF	bazični faktor rasta fibroblasta (engl. <i>basic fibroblast growth factor</i>)
BHP	benigna hiperplazija prostate
BMI	indeks tjelesne težine (engl. <i>body mass index</i>)
CMV	citomegalo virus
cPSA	kompleksirani PSA (engl. <i>complexed PSA</i>)
DHT	dihidrottestosteron
DRP	digitorektalni pregled
ECLIA	elektrokemiluminiscentna imunoanaliza
ECM	izvanstanični matriks (engl. <i>extracellular matrix</i>)
EPC	endotelne prekursorske stanice (engl. <i>endotelial progenitor cells</i>)
FGF-2	faktor rasta fibroblasta 2
fPSA	slobodni PSA (engl. <i>free PSA</i>)
GS	Gleason zbroj (engl. <i>Gleason score</i>)
HDL-C	kolesterol visoke gustoće lipoproteina
HIF-1	hipoksijom inducirani faktor 1 (engl. <i>hypoxia-inducible factor-1</i>)
hK	humani kalikrein
HPC1	gen nasljednog tumora prostate (engl. <i>Hereditary prostate cancer 1 gene</i>)
HPV	humani papiloma virus
HSV	herpes simpleks virus
IFN-γ	interferon- γ
IGF	inzulinu sličan faktor rasta
IGFBP	IGF vezujući protein

IL	interleukin
IL-1Ra	interleukin 1 receptor
IL-1β	interleukin 1 β
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IL-8R	interleukin 8 receptor
NIDDM	o inzulinu neovisna šećerna bolest
OR	omjer izgleda
PAP	prostatična kiselna fosfataza
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	faktor rasta podrijetlom iz trombocita (engl. <i>platelet-derived growth factor</i>)
PIA	proliferativna inflamatorna atrofija
PIGF	placentarni faktor rasta (engl. <i>placenta growth factor</i>)
PIN	prostatična intraepitelna neoplazija
PSA	prostata specifični antigen
PSAD	gustoća PSA (engl. <i>PSA density</i>)
PSAV	brzina PSA (engl. <i>PSA velocity</i>)
PSDT	vrijeme udvostručenja PSA (engl. <i>PSA doubling time</i>)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
RTPCR	lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. <i>real-time polymerase chain reaction</i>)
SHBG	protein koji veže spolne hormone
SNP	polimorfizam u jednom nukleotidu (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SRD5A2	gen koji kodira tip2 5- α -reduktaze
TAM	makrofagi koji podržavaju tumore (engl. <i>tumor-supporting macrophages</i>)
Tm	temperatura taljenja
TNF	tumor nekroza faktor
TNM	tumor-limfni čvor-metastaze (engl. <i>tumour-nodes-metastasis</i>)
TRUZ	transrektalni ultrazvuk
VDBP	vitamin D vezujući protein

VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR	VEGF receptor

1. UVOD

Karcinom prostate je multifaktorijalan poremećaj koji uključuje kompleksne interakcije među endokrinim, genetičkim i okolišnim čimbenicima. Pripada među najčešće maligne neoplazme u muškaraca a rizik razvitka raste sa starošću (1, 2).

Trenutno dostupni pretskazatelji progresije i preživljavanja pacijenata s karcinomom prostate (prostata specifični antigen, Gleason zbroj i stadij tumora) često su nedovoljni za procjenu agresivnijeg oboljenja pa postoji potreba za novim biljezima.

Kao i kod svih solidnih tumora, rast, progresija i metastaziranje karcinoma prostate ovisi o sposobnosti formiranja krvnih žila. Tumorske stanice mogu poticati stanice strome prostate ili same lučiti čimbenike koji mogu inducirati neovaskularizaciju. Suvišak proangiogenih čimbenika u odnosu na antiangiogene potiču proces nazvan „angiogeni okidač“ koji potiče stvaranje novih krvnih žila i omogućava rast tumora veći od 2 do 3 mm (3, 4).

Angiogene čimbenike čine i citokini čija je ključna uloga u reguliranju humoralnog i celularnog odgovora. Međutim, danas se zna da su oni na više načina uključeni u maligni proces: djeluju direktno na inhibiciju rasta tumorskih stanica, dovode do regresije tumora, pojačavaju antitumorske imune učinke, ali mogu djelovati i kao čimbenici rasta za maligne stanice, mogu posredovati neoplastičnim učincima i imati proangiogeni ili antiangiogeni učinak na vaskularizaciju tumora (5, 6).

Geni citokina su polimorfni, a neki polimorfizmi mogu imati utjecaj na njihovu funkciju izravnim i neizravnim utjecajem na razinu ekspresije gena i/ili njegove funkcije. Posebna pozornost se posvećuje polimorfizmima u jednoj bazi smještenim najčešće u promotorskim regijama gena koji mijenjaju razinu transkripcije, ali i proteinskog produkta. Nositelji navedenih polimorfizama mogu imati veću sklonost obolijevanja od pojedinih vrsta tumora (7).

U ovom istraživanju ispitivat ćemo polimorfizme sljedećih triju gena citokina:

- *Interleukin 1-β* +3954 C>T polimorfizam - rs1143634
- *Interleukin 8* -251 T>A polimorfizam - rs4073
- *VEGF* +405 G>C polimorfizam - rs2010963.

1.1. Prostata

Prostata je neparan žljezdano-mišićni organ, smješten neposredno ispod mokraćnog mjehura, iza stidne kosti, a ispred završnog dijela debelog crijeva i okružuje početna 3 cm mokraćne cijevi. Ubraja se u pomoćne spolne žlijezde muškog spolnog sustava. Ima egzokrinu funkciju, a najvažniji dio te funkcije jest sudjelovanje u stvaranju i izlučivanju sperme.

Normalna težina prostate odrasla čovjeka iznosi ~18 g, duga je ~3 cm, široka ~4 cm, debljine ~2 cm, volumena 20 - 30 ml (8).

1.2. Benigna hiperplazija prostate (BHP)

Benigna hiperplazija prostate je patološki proces koji po definiciji predstavlja dobroćudni rast epitelnih, mišićnih i vezivnih stanica prostate, praćena je smetnjama donjeg mokraćnog trakta (engl. *lower urinary tract symptoms* - LUTS) i dio je procesa starenja muškaraca (9, 10).

Histopatološki BHP je karakteriziran porastom broja stromalnih i epitelnih stanica koji tvore fibroadenomatozne čvoriće u tkivu prostate, uglavnom u periuretralnoj i prijelaznoj zoni. Mikroskopske promjene se odnose na staničnu proliferaciju i povećavaju se sa starenjem. Približno 40, 70, 80 i 90 % muškaraca obuhvaćeno je njima u šestom, sedmom, osmom i devetom desetljeću života (10). Makroskopske se promjene odnose na povećanje prostate. Histološke i mikroskopske promjene su učestalije od makroskopskih (11, 12).

Utvrđene su razlike u pojavnosti i epidemiologiji BHP-a među različitim rasama. U crnoj rasi je češća u odnosu na bijelu rasu i počinje desetljeće ranije. Među azijskim rasama je znatno rjeđa, ali je zabilježen značajan porast pojavnosti u azijskim imigracijskim skupinama na zapadu. Razlozi takvih razlika nisu potpuno jasni (13, 14).

Iako patogeneza BHP-a nije u potpunosti razriješena, čini se da je nekoliko različitih mehanizama uključeno u razvoj i progresiju bolesti.

Dob je najznačajniji čimbenik rizika i postoji čvrsta korelacija između dobi i hiperplazije. Starenjem dolazi do procesa tkivnog remodeliranja (osobito u prijelaznoj zoni) pa poremećaji u ravnoteži između čimbenika rasta signalnih putova u procesima proliferacije i

stanične smrti te stromalno-epitelnim međudjelovanjima za posljedicu imaju povećanje prostate (11, 15).

Iako **androgeni** ne uzrokuju BHP, za razvoj BHP-a potrebna je prisutnost androgena testisa. Glavni androgen prostate je dihidrotestosteron (DHT, 3 - 10 puta potentniji od samog testosterona) koji nastaje iz cirkulirajućeg testosterona djelovanjem 5- α -reduktaze (16). U prostati je dominantan tip 2 5- α -reduktaze, primarno lokaliziran u stanicama strome. Smatra se da stromalne stanice imaju središnju ulogu u androgen-ovisnom rastu prostate te da je tip 2 5- α -reduktaze ključni androgeni amplifikacijski korak (17). Također je poznato da prostatične vrijednosti DHT-a, kao i androgenog receptora (AR) starenjem ostaju visoke unatoč niskim perifernim koncentracijama testosterona (18). U eunuha, muškaraca koji su bili kastrirani u mladosti i onih s poremećajima 5- α -reduktaza ne nastaje BHP, što ukazuje na važnu ulogu androgena u razvoju BHP-a (15).

Estrogeni također stimuliraju stromalnu staničnu proliferaciju i kod starijih muškaraca mogu reaktivirati rast prostate (2) jer starenjem raste koncentracija metabolita estrogena, posebice 17- β -estradiola i estrona. U prilog tomu ide i činjenica da hiperplazija pretežito zahvaća proksimalno periuretralno tkivo koje je osjetljivo na estrogen, a u koje su uključeni specijalizirani mezenhim periprostatičnog sfinktera i prijelazna zona (19).

Novija istraživanja bave se povezanošću **metaboličkog sindroma** i BHP-a. Hammarsten i sur. su prvi pokazali da čimbenici rizika za razvoj BHP-a mogu biti: o inzulinu neovisna šećerna bolest (NIDDM), visoki tlak, pretilost i niska koncentracija kolesterola visoke gustoće lipoproteina (HDL-C) (20).

U posljednjih nekoliko godina sve je više istraživanja o ulozi **kronične upale** i lokalne **hipoksije** u razvoju BHP-a (20). Činjenica je da se BHP vrlo često povezuje s kroničnim prostatitisom i da se u većini BHP uzoraka nalaze upalni infiltrati te brojni citokini, npr. interleukini -1, -2, -4, -15, -17 (IL), interferon- γ (IFN- γ), faktor rasta fibroblasta-2 (FGF-2) i drugi (21). Vjeruje se da kronična upala podržava proces fibromuskularnog rasta u BHP-u, a hipoksija može aktivirati rast prostate (20).

Postoje čvrsti dokazi da BHP ima i **nasljedno genetsku komponentu**. Jednojajčani blizanci pokazuju veću stopu podudarnost BHP-a, nego dvojajčani, a oko 50 % muškaraca mlađih od 60 godina (u odnosu na oko 9 % muškaraca starijih od 60 godina) podvrgnutih prostatektomiji zbog BHP-a može se pripisati nasljedni oblik bolesti (20).

1.3. Prostatična intraepitelna neoplazija (PIN)

PIN je stanje abnormalne proliferacija citološki atipičnih stanica u vodovima i acinusima prostate, ali bez invazije strome. Smatra se prekursorskom lezijom mnogih perifernih adenokarcinoma prostate jer pretežno zahvaća perifernu zonu, fenotipske i genotipske promjene pokazuju sličnost s karcinomom, širi se prostatičnim vodovima, a može predstavljati i preteču agresivnijem obliku fenotipa karcinoma prostate (22, 23).

Pojavnost PIN-a u biopsijama prostate iznosi prosječno 5 % i raste s dobi, dok rizik za pojavu karcinoma kod PIN-pozitivnih na sljedećoj biopsiji iznosi 23 - 35 % (24). Osim dobi (22), rasna i geografska pripadnost također utječu na pojavnost PIN-a. Zastupljenija je kod crnaca (posebno američkih) u odnosu na bijelce i Azijate, a Japanci u Osaki imaju značajno nižu pojavnost u odnosu na one koji žive u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (22).

1.4. Karcinom prostate

1.4.1. Epidemiologija karcinoma prostate

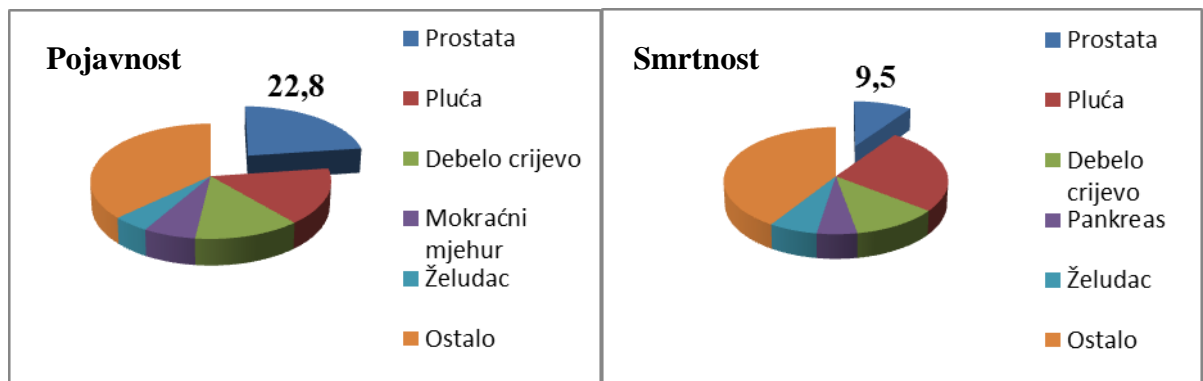
Rak prostate je četvrto najčešće sijelo raka u oba spola, a drugo najčešće u muškaraca pa je zbog svoje učestalosti postao javnozdravstveni problem širom svijeta, posebice razvijenim zemljama koje imaju sve stariju populaciju (kao i Hrvatska) (25, 26). Porast pojavnosti raka prostate posljednjih se godina u velikoj mjeri može pripisati povećanom otkrivanju latentne bolesti zbog dostupnosti testiranja PSA (26).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) 2012. g. u svijetu je otkriveno oko 1,1 milijuna muškaraca s rakom prostate, što čini 15 % od ukupno svih sijela raka dijagnosticiranih u muškaraca, s gotovo 70 % slučajeva (759 000) koji se pojavljuju u razvijenijim područjima. Učestalost raka prostate varira više od 25 puta u cijelom svijetu. Dobno standardizirane stope su najviše u Australiji, Novom Zelandu, Sjevernoj Americi te u zapadnoj i sjevernoj Europi. Stope su također relativno visoke u nekim manje razvijenim područjima, kao što su Karibi, Južna Afrika i Južna Amerika, a najniže u južnoj, istočnoj, središnjoj Aziji te sjevernoj Africi (27).

S 307 000 smrtnih slučajeva u 2012., rak prostate je peti vodeći uzrok smrti od raka u muškaraca (6,6 % od ukupnog broja umrlih muškaraca). Zbog PSA testiranja koje ima mnogo veći utjecaj na pojavnost raka prostate, nego na smrtnost, razlika u stopama smrtnosti manje

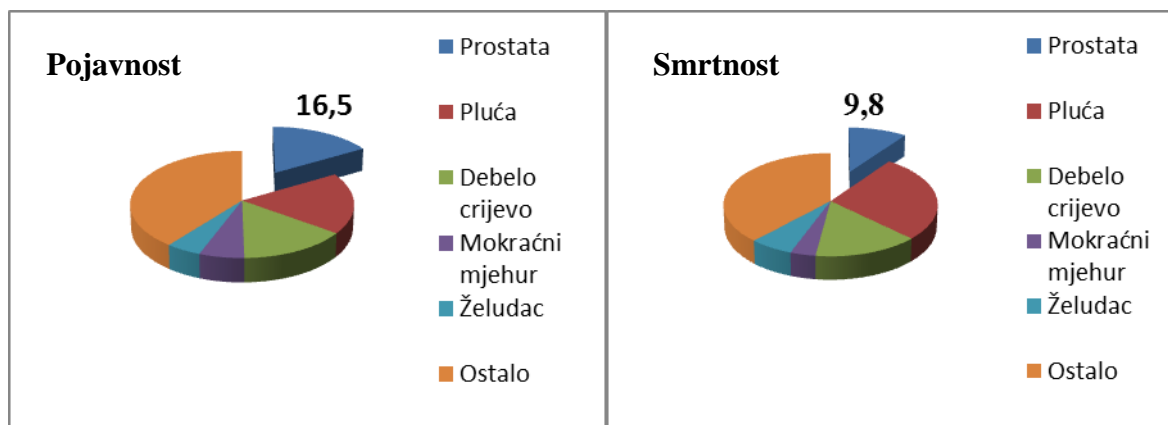
je izražena. Vjerojatno zbog pravodobnog otkrivanja i boljeg terapijskog pristupa, broj smrtnih slučajeva od raka prostate manji je u razvijenijim područjima, nego u manje razvijenim. Smrtnost je općenito visoka u pretežno crne populacije (Karibi, južna i zapadna Afrika), a vrlo niska u Aziji, sjevernoj Africi kao i sjevernoj Americi (21).

U Europi je 2012. registrirano 416 700 (96/100 000) novootkrivenih muškaraca s rakom prostate s najvećom stopom u zapadnoj i sjevernoj Europi. Po pojavnosti je na prvom mjestu (22,8 %) ispred raka pluća (15,9 %) i raka debelog crijeva (13,2 %), a po smrtnosti na trećem mjestu s 92 200 umrlih i stopom od 19,3 (9,5 %) (27) (Slika 1.1.). Stope smrtnosti su više u sjevernim područjima Europe (Danska, Litva) u odnosu na neke središnje i istočne zemlje (npr. Albanija, Ukrajina, Italija, Bosna i Hercegovina) (28).



Slika 1.1. Najčešća sijela raka među muškarcima u Europi 2012. godine (27)

U Hrvatskoj je 2012. g. kod muškaraca rak prostate bio na drugom mjestu (16,5 %), iza raka pluća (18,5 %). Broj novootkrivenih bolesnika iznosio je 2 021, uz stopu pojavnosti 72,8 te smrtnosti 26,0. Po smrtnosti (9,8 %) bio je na trećem mjestu iza raka pluća i raka debelog crijeva (27) (Slika 1.2.). U odnosu na 1996. g., u Hrvatskoj je došlo do više od dvostrukog porasta udjela raka prostate u ukupnoj pojavnosti sa 7 na 16,5 % (26).



Slika 1.2. Najčešća sijela raka među muškarcima u Republici Hrvatskoj 2012. godine (27)

Iz navedenih podataka vide se značajne razlike u pojavnosti i smrtnosti među pojedinim područjima svijeta. Neke od varijacija se mogu objasniti razlikama u medicinskoj skrbi, prijavljivanju uzroka smrti, razlikama u PSA, testiranju i terapijskim postupcima, ali varijacije od skoro 50 puta u pojavnosti raka prostate bile su uočene i prije uvođenja PSA testiranja. Stoga, treba uzeti u obzir i druge čimbenike koji mogu utjecati na rizik: migracija stanovništva, čimbenici okoliša, prehrambene navika, veći sadržaj masnoća u prehrani, pretilost, sjedeći načina života, kao i mijenjanje načina života sve više prema zapadnjačkom. Iako se čini da genska predispozicija igra manju ulogu, razlog ekstremno visoke pojavnosti raka prostate u crnačkoj populaciji američkih država i Kariba, ipak se objašnjava genetskim naslijeđem. Tako se varijacije kromosomskih alela 8q24 i 17q21 specifične za muškarce afričkog podrijetla povezuju s povećanim rizikom (25).

1.4.2. Čimbenici rizika

Rak prostate je najčešće sijelo raka u muškaraca zapadnog svijeta, a etiologija je još uvijek nepoznata. Mnogi muškarci s jednim ili više rizičnih čimbenika neće oboljeti, dok drugi oboljevaju iako nemaju prisutan niti jedan poznati rizični čimbenik (26). Iako se čimbenici rizika poput dobi, rase, obiteljske anamneze ne mogu kontrolirati, najnovije spoznaje o rizičnim čimbenicima (endogenim i egzogenim) ukazuju da bi se neki slučajevi mogli prevenirati (1).

1.4.2.1. Endogeni čimbenici

Dob

Tipično je za epitelne malignosti u koje spada i rak prostate da im rizik raste s dobi. To je rijedak rak koji se pojavljuje prije 45 g. života (manje od 0,3 %), a više od 70 % bolesnika starije je od 65 g. (29). Starenjem dolazi do progresivnog nakupljanja DNA adukata i oštećenja DNA u većini tkiva. To je vjerojatno posljedica oksidativnog stresa koji nastaje zbog neravnoteže prooksidativnog i antioksidativnog sustava. Normalnim metaboličkim procesima nastaju slobodni radikali i reaktivni kisikovi spojevi (ROS), visoko reaktivni spojevi koji mogu oštetiti stanice. Oni mogu dovesti do oštećenja DNA stvaranjem lomova, apurinskih, apiramidinskih mjesta ili adukata, a mogu katalizirati i oksidativnu modifikaciju proteina i enzima uključenih u popravak DNA. Starenjem slabi antioksidativni mehanizam zaštite pa pojačano nakupljanje reaktivnih kisikovih spojeva može dovesti do mutageneze i nastanka raka (30).

Rasa i etnička pripadnost

Najveća stopa pojavnosti raka prostate je u Afroamerikanaca, najniža u istočnoj Aziji, a rijetka u američkih Indijanaca. Osim što je rizik za rak prostate dvaput viši za muškarce afričkog podrijetla, uz veću stopu pojavnosti od bijelaca u svim dobnim skupinama, imaju i agresivniji oblik bolesti (26).

Razlike u riziku među etničkim skupinama još uvijek nisu poznate. Možda su genetski uzrokovane razlikama u alelima gena odgovornih za enzime koji sudjeluju u metabolizmu testosterona, učestalosti polimorfnih varijacija SRD5A2 gena koji kodira tip2 5- α -reduktaze (aktivnost je najniža među Japancima), učestalosti kratkog CAG (visoka kod Afroamerikanaca) i 16 GGC (niska kod Afroamerikanaca) mikrosatelita na AR lokusu ili polimorfizma VDBP (engl. *Vitamin-D binding protein*) gena koji kodira sintezu proteina koji veže D-vitamin u serumu (26, 29, 30).

Neke studije ukazuju i na razlike u serumskim koncentracijama androgena i njihovih metabolita, proteina koji veže spolne hormone (SHBG) (više su kod Afroamerikanaca u odnosu na bijelu populaciju), ali i inzulinu sličnog faktora rasta-1 (IGF-1) i IGF-vezujućeg proteina 3 (IGFBP-3) (više su kod bijelih Amerikanaca) (30).

U posljednje vrijeme se sve više pozornosti posvećuje razlikama u načinu života među etničkim skupinama. Uzimaju se u obzir prehrambene navike, društveni i kulturalni običaji, ali i utjecaj okoliša. Migracijske studije su pokazale da je rizik od raka prostate 5 puta viši kod Japanskih imigranata u SAD u odnosu na Japance u Japanu (29, 31).

Obiteljska predispozicija

Učestalost raka prostate u muškaraca s obiteljskom predispozicijom je dva do četiri puta viša u usporedbi s kontrolnom populacijom (29). Rizik raste s brojem oboljelih članova, dobi kad im je rak prostate otkriven (mlađa dob povećava rizik), veći je ako brat ima rak prostate, nego ako ga ima otac, jednojajčani blizanci imaju veći rizik od dvojajčanih (30), a veći je i kod muškaraca koji imaju obiteljsku anamnezu raka dojke i raka jajnika. Navedeno ide u prilog postojanju nasljednog oblika i ukazuje na recesivno ili X-vezano nasljeđivanje (29). Osim toga, uočeno je da muškarci s obiteljskom anamnezom raka prostate imaju rizik za pojavu raka 6 - 7 godina ranije u odnosu na sporadični oblik (26).

Među genima kandidatima koji se povezuju s nastankom raka prostate nalaze se HPC-1 (engl. *Hereditary prostate cancer 1 gene*) na dugom kraku kromosoma 1 te BRCA1 i BRCA2 geni (26, 29).

Hormoni

Androgeni su neophodni za rast, razvoj i funkciju prostate i mogu biti upleteni u etiologiju raka prostate. Toj tezi ide u prilog činjenica da se rak prostate ne pojavljuje u eunuha, niti muškaraca kastriranih prije puberteta. Povišene koncentracije testosterona i DHT-a mogu povećati rizik za rak prostate. Istraživanja su i utvrdila korelaciju među serumskom razinom testosterona, posebice DHT-a među Afroamerikancima, bijelcima i Japancima. Međutim, epidemiološke studije su pokazale da koncentracije testosterona i DHT-a u serumu bolesnika s rakom prostate mogu biti povišene, snižene pa čak i normalne. Moguće je da cirkulirajući androgeni u normalnim rasponima nemaju ulogu u etiologiji raka prostate ili da još uvijek nisu identificirani prijeko potrebni metaboliti (ako postoje) (26).

Uloga estrogena je još uvijek nejasna. Mladi crnci imaju povišene serumske razine estrona i slobodnog estradiol-17 β u odnosu na mlade bijelce, dok japanski mladići imaju niže vrijednosti u odnosu na mlade bijelce. Uočeno je i da je učestalost raka prostate manja kod muškaraca s cirozom koja je povezana s povišenim cirkulirajućim koncentracijama estrogena, a sniženim koncentracijama testosterona (30).

Pojačana ekspresija receptora za prolaktin kod muškaraca s displazijom prostate potakla je istraživanja o povezanosti prolaktina s karcinogenezom raka prostate. Iako prostata luči prolaktin, eksprimira receptor za prolaktin a dodavanje prolaktina u organske kulture humane prostate potiče DNA sintezu i mijenja morfologiju epitela još nije dokazana povezanost povišenih serumskih vrijednosti sa pojačanim rizikom za rak prostate (32).

Razine IGF-1 i IGFBP-3 povezuju se s uznapredovalim rakom prostate, ali ne povezuje se i s ranijim stadijem bolesti. Neki istraživači zaključuju da se mjerenjem njihove razine u serumu može predvidjeti rizik od uznapredovanog raka prostate čak nekoliko godina unaprijed (1, 26).

1.4.2.2. Egzogeni čimbenici

Prehrana

Deskriptivne epidemiološke studije migracija i geografskih različitosti ukazuju na utjecaj prehrambenih navika na razvoj raka prostate. Ne zna se je li povećan rizik od raka prostate povezan s visokim unosom energije samo zbog unosa energije ili hrane osobito bogate energijom. Iako brojne, nisu sve studije pokazale povezanost između prehrambenih navika i rizika od raka prostate (26).

Masnoće

Unos masnoća animalnog podrijetla, bogatih zasićenim masnim kiselinama povezuje se s povećanim rizikom od raka prostate. Točan mehanizam djelovanja nije poznat, ali se pretpostavlja da djeluju na povećanje serumskih vrijednosti androgena, pojačavaju oksidativni stres i dovode do porasta IGF-1. Visok udio crvenog mesa u prehrani koje sadrži mnogo heterocikličkih amina može povećati rizik od raka prostate (33). Nasuprot tomu, tradicionalna azijska prehrana sadrži manje mesa od zapadnjačke, a bogata je sojom i hranom bogatom fitoestrogenima. Fitoestrogeni djeluju na rak prostate smanjenjem veličine tumora, pojačavanjem apoptoze i smanjenjem lučenja PSA (29).

Kalcij

U nekim istraživanjima ustanovljeno je da visok unos mliječnih proizvoda pa tako i kalcija povećava rizik od raka prostate, vjerojatno suprimiranjem sinteze vitamina D3 koji djeluje zaštitno od raka prostate (26, 30, 33).

Debljina

Debljina je jedan od čimbenika rizika od uznapredovalog raka prostate i umiranja od te bolesti (26, 34, 35). Izražava se kao indeks tjelesne težine (engl. *Body Mass Index*, BMI), a zbog utjecaja debljine na metabolizam spolnih hormona i inzulina povezuje se s pojačanim rizikom (1). Međutim, treba uzeti u obzir da pretili muškarci imaju hormonalni profil (visoki estrogene, niski androgeni) koji djeluje zaštitno i smanjuje rizik od raka prostate (29).

Pušenje

Pušenje može povećati rizik ili zbog ekspozicije kemijskim kancerogenima iz duhanskog dima ili utjecajem na cirkulirajuće razine hormona (povišenje razine testosterona i sniženje estradiola) (26, 29, 31).

Alkohol

Konзумiranje alkohola u količinama većim od 8 pića po danu, povećava rizik za rak prostate 1,9 puta u odnosu na osobe koje ne konzumiraju alkohol. Rizik je isti i kod crnaca i kod bijelaca i bez obzira na vrstu alkohola koja se konzumira. Rezultati jedne studije konzumaciju crnog vina povezuju sa smanjenim rizikom (29, 36).

Tjelesna aktivnost

U nekim istraživanjima je nađeno da povećana tjelesna aktivnost posebice u starijih muškaraca, smanjuje rizik od uznapredovalog raka prostate, vjerojatno utjecajem na smanjenje tjelesne težine (26) odnosno masnog tkiva pa time i na smanjenje lučenja spolnih hormona, inzulina, leptina i markera upale (37).

Infekcije

Nema čvrstih dokaza da spolno prenosive infekcije povećavaju rizik od raka prostate (24, 26). Neka istraživanja povezuju klinički bakterijski prostatitis s rakom prostate (26). U tkivu prostate nađeni su patogeni poput humanog papiloma virusa (HPV), citomegalovirusa (CMV), humanog herpes simplex virusa tipa 2 (HSV2) i humanog herpes virusa tipa 8 (HSV8) koji mogu doprinijeti neoplastičnoj transformaciji (24). Međutim, u ispitivanju provedenom u Finskoj, HPV je nađen više u tkivima s BHP-om (49 %), nego s rakom prostate (32 %) u odnosu na normalno tkivo prostate (9 %) (30).

Kronična upala

Histopatološke, epidemiološke i genske studije ukazuju da kronična upala uzrokuje rak u nekoliko organa (npr. želudac, jetra, debelo crijevo) pa bi mogla imati i važnu ulogu u karcinogenezi prostate. Izloženost agensima upale može dovesti do ozljeda epitela prostate odnosno do proliferativne inflamatorne atrofije (PIA). PIA može sadržavati upalne infiltrate, a često se nalazi uz PIN visoke zloćudnosti koja se smatra prekursorom raka prostate. Upala može dovesti do karcinogeneze stimulacijom angiogeneze i proliferacije stanica te oštećenjem DNA putem reaktivnih kisikovih spojeva (npr. dušikov oksid) (1, 24).

Profesionalna izloženost

Ispitivanje karcinogenosti drvene prašine dovelo je do otkrića da je smrtnost od raka prostate značajno povećana u osoba zaposlenih u drvenoj industriji, kao i u osoba izloženih drvenoj prašini. Utvrđeno je i povećanje rizika kod vatrogasaca, ljudi zaposlenih u termoelektranama, na održavanju željezničkih pruga, poljoprivrednika odnosno ljudi izloženih policikličkim aromatskim ugljikovodicima, kadmiju, pesticidima i drugim kancerogenim spojevima (26, 38).

1.4.3. Patologija

Većina karcinoma prostate (70 - 75 %) nastaje u stražnjim i postraničnim dijelovima periferne zone. Manji tumori i tumori nižeg gradusa nastaju u prijelaznoj zoni (15 - 20 %), a samo je 10 % tumora smješteno u središnjoj zoni. Multipli tumori se mogu naći u oko 50 % oboljelih, a drugi karcinom se najčešće vidi u apikalnoj regiji (ne prelazi 0,5 cm³) (39).

S kliničkog stajališta karcinom prostate očituje se kao simptomatski (slučajevi u kojih je moguća klinička dijagnoza), okultni (primarna lezija ostaje mala ili skrivena uz kliničko manifestiranje presadnica, povišene vrijednosti PSA) i latentni (znakovima i simptomima klinički neprepoznatljiv, otkriva se slučajno).

U materijalu dobivenom radikalnom prostatektomijom, makroskopski je moguće prepoznati samo veće tumore (> 0,5 cm) koji su u pravilu i većeg gradusa (tumor stadij T3, Gleason zbroj ≥ 8). Na poprječnim prerezima kroz prostatu područja zahvaćena tumorom su kompaktnija, glađa i tvrđa u odnosu na spužvasto tkivo normalne prostate, sitnozrnate površine i žućkaste do narančaste boje. Makroskopski se granice tumora ne mogu jasno

odrediti i obično se mikroskopski nađe veća količina tumora. Tumori koji difuzno infiltriraju prostatu ne mogu se makroskopski prepoznati (39).

Acinarni ili adenokarcinom prostate čini 90 - 95 % svih primarnih karcinoma prostate. Mikroskopski se mogu protezati od dobro diferenciranih tumora čije se žlijezde teško mogu razlikovati od žlijezda normalnog prostatičnog tkiva do slabo diferenciranih za koje je histološki teško utvrditi da potječu iz prostate. Mikroskopska dijagnostika se temelji na kombinaciji arhitekturnih (infiltrativni rast, odsutnost bazalnih stanica) i citoloških kriterija (prisutnost nukleola $>1 \mu\text{m}$ u jezgri tumorskih stanica). U dijagnostičke svrhe rabe se i dodatni kriteriji, od kojih su najznačajniji perineuralna invazija, prisutnost kolagenih mikronodula te glomerularizacija (24, 39). Periferno lokalizirani adenokarcinomi mogu invadirati u perineuralni, vaskularni i prostor sjemenih mjehurića, a najčešće mjesto metastaziranja su limfni čvorovi, kosti i pluća (23).

Na posebne tipove karcinoma prostate otpada 5 - 10 %. Tu spadaju atrofični adenokarcinom, adenokarcinom prostatičnih duktusa, pseudohiperplastični adenokarcinom, adenokarcinom pjenušavih stanica, mucinozni adenokarcinom, karcinom stanica tipa „prstena pečatnjaka“, onkocitni adenokarcinom, adenoskvamozni i karcinom pločastih stanica, bazaloidni i adenocistični karcinom, urotelni karcinom prostate, neuroendokrini karcinom, sarkomatoidni karcinom i karcinom nalik na limfoepiteliom. Iako rijetki, zbog loše prognoze važno ih je na vrijeme prepoznati (39).

1.4.4. Gleason zbroj i TNM klasifikacija

Prema preporukama SZO-a za određivanje stupnja zloćudnosti raka prostate, koristi se sustav Gleason gradusa odnosno zbroja (engl. *Gleason score*, GS) (40). Sustav se temelji na arhitekturnim značajkama žlijezda karcinoma prostate. Materijal se dobiva biopsijom prostate ili operacijom. Pet je stupnjeva diferenciranosti adenokarcinoma gdje 1 označava najbolje diferencirane, dok 5 označava najslabije diferencirani tumor. Gleason i suradnici su pokazali da je prognoza karcinoma prostate kompatibilna sa zbrojem stupnja diferenciranosti dviju najzastupljenijih komponenti tumora. Zbog toga, u svakoj biopsiji treba odrediti Gleasonov uzorak za najzastupljeniji (primarni) i sljedeći po zastupljenosti (sekundarni histološki oblik). Zbrajanjem vrijednosti uzorka primarne i sekundarne komponente dobije se GS (npr. GS 3 + 4 = 7). Ako tumor ima samo jedan uzorak, GS se dobiva udvostručavanjem (npr. GS 3 + 3 = 6). Budući da postoji pet stupnjeva Gleasonova uzorka, zbroj se može kretati od 2 do 10.

Dobro diferencirani tumori imaju GS 2 do 4, srednje diferencirani 5 do 6, a slabo diferencirani 8 do 10. Tumori zbroja 7 spadaju u slabo do srednje diferencirane, a ovisno o prevladavajućoj komponenti, mogu se svrstati u jednu od ovih dviju kategorija (39).

TNM (engl. *tumour-nodes-metastasis*) klasifikacija se koristi za određivanje stadija karcinoma prostate odnosno anatomske veličine i proširenosti karcinoma (41). Sustavom se ocjenjuju tri parametra: T - veličina primarnog tumora, N - uključenost regionalnih limfnih čvorova i M - postojanje udaljenih metastaza (Tablica 1.1.). Jedan je od najvažnijih postupaka prije liječenja bilo koje zloćudne bolesti kojim se procjenjuje prognoza, odabire najbolji način liječenja i prate rezultati liječenja.

Tablica 1.1. TNM klasifikacija karcinoma prostate

T - Primarni tumor	
TX	Tumor nije moguće odrediti
T0	Nema dokaza za tumorsku bolest
T1	Klinički latentni tumor (nepalpabilan ili ga je nemoguće vizualizirati dijagnostičkim pretragama)
a	Slučajni nalaz, tumor $\leq 5\%$
b	Slučajni nalaz, tumor $\geq 5\%$
c	Utvrđen biopsijom nakon nalaza povećane vrijednosti PSA
T2	Tumor ograničen na prostatu
a	Tumor zahvaća do jedne polovice lobusa prostate
b	Tumor zahvaća više od jedne polovice lobusa prostate
c	Tumor zahvaća oba lobusa prostate
T3	Tumor proširen izvan kapsule prostate
a	Proširenost izvan kapsule
b	Zahvaćeni sjemeni mjehurići
T4	Tumor fiksiran ili proširen na susjedne strukture: vrat mokraćnog mjehura, vanjski sfinkter, rektum, mišići levatore ili zdjeličnu stijenu
N - Limfni čvorovi	
NX	Metastaze u regionalnim limfnim čvorovima ne mogu se ustanoviti
N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	Metastaze u regionalnim limfnim čvorovima
M - Metastaze	
MX	Udaljene metastaze nije moguće odrediti
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze
a	Metastaze u neregionalnim limfnim čvorovima
b	Metastaze u kostima
c	Metastaze u ostala sjela

GS, TNM klasifikacija i vrijednost PSA u konačnici se rabe za prognostičko svrstavanje prema tablici 1.2.

Tablica 1.2. Prognostičko svrstavanje (Union for International Cancer Control, 2009.)

	T	N	M	PSA	GS
Grupa I	T1a-c	0	0	<10	≤6
	T2a	0	0	<10	≤6
Grupa IIa	T1a-c	0	0	<20	7
	T1a-c	0	0	≥10<20	≤6
	T2a, b	0	0	≥10<20	≤7
Grupa IIb	T2c	0	0	Svi	Svi
	T1-2	0	0	≥20	Svi
	T1-2	0	0	Svi	≥8
Grupa III	T3a, b	0	0	Svi	Svi
Grupa IV	T4	0	0	Svi	Svi
	Svi	1	0	Svi	Svi
	Svi	Svi	1	Svi	Svi

1.5. Dijagnostika karcinoma prostate

Karcinom prostate nema nikakve specifične simptome u ranim razvojnim fazama. Zbog nedostatka specifičnih simptoma rane (izlječive) faze bolesti, savjetuje se provesti redoviti godišnji urološki pregled svih muškaraca iznad 50 godina odnosno u slučaju pozitivne obiteljske anamneze i u mlađoj dobi. Današnji dijagnostički algoritam, uz anamnezu i fizikalni pregled bolesnika, obuhvaća biopsiju prostate pod kontrolom transrektalnog ultrazvuka (TRUZ) koju indiciraju vrijednosti serumskog PSA (češće) ili nalaz digitorektalne pretrage (rjeđe) (42, 43).

1.5.1. Digitorektalni pregled (DRP)

DRP predstavlja početni dio fizikalne pretrage bolesnika tijekom kojeg treba odrediti veličinu i konzistenciju tkiva prostate. Klasični znak sumnje na postojanje raka je palpabilni tvrdi čvorić ili tvrdi cijeli lobus, ili čitava prostata. Uredan nalaz palpacije ne isključuje postojanje tumora, a pozitivan nalaz ne potvrđuje karcinom (samo trećina DRP-pozitivnih ima će i pozitivan nalaz biopsije) (42). Osim specifičnosti, nedostatak DRP-a su slaba osjetljivost (nemogućnost uočavanja ranih stadija karcinoma) i reproducibilnost (značajnija

samo kod iskusnog kliničara) (43). Stopa detekcije karcinoma povećala se uvođenjem PSA uz DRP. S obzirom na to da DRP i PSA ne detektiraju uvijek iste karcinome, a međusobno su komplementarni, preporuča se korištenje oba kod procjene rizika od karcinoma prostate (44).

1.5.2. Tumorski markeri

U eri novih tehnologija došlo je do velikih otkrića u području biomarkera za karcinom prostate. Od 90-ih godina prošlog stoljeća, uvođenjem PSA testiranja došlo je do ogromnog porasta u pojavnosti karcinoma prostate. Međutim, s obzirom na manjak specifičnosti PSA, mnogi muškarci prolaze nepotrebne biopsije koje rezultiraju većom pojavom klinički beznačajnih tumora. Kako bi se prevladao taj nedostatak i dalje se traže karcinom specifični biomarkeri koji će razlikovati muškarce s visokim rizikom za karcinom prostate i agresivnim oblikom karcinoma od onih s beznačajnim karcinomom.

Prostatična kisela fosfataza (PAP)

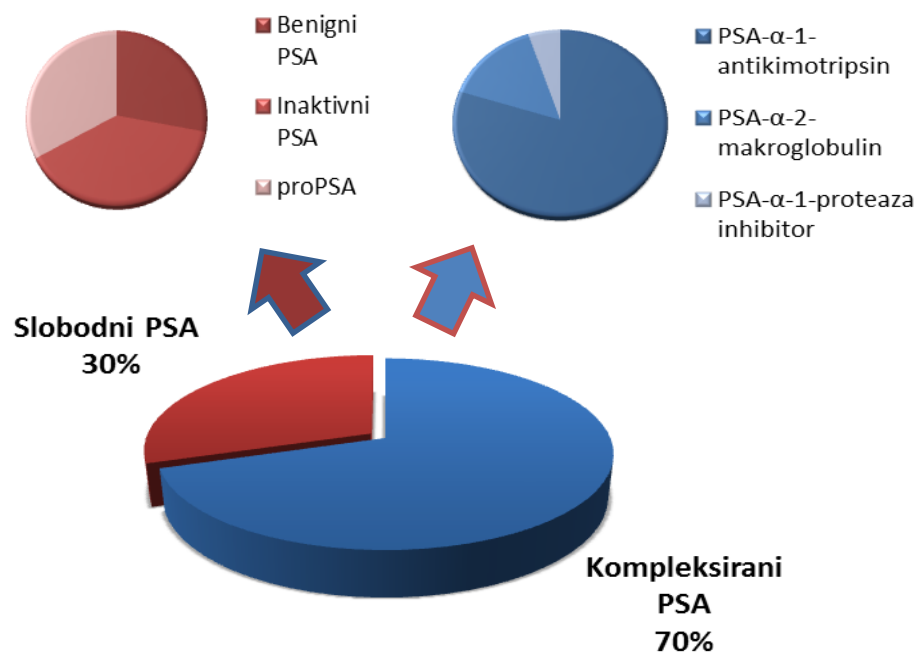
Najraniji serumski marker za karcinom prostate bila je PAP. Još 30-ih godina prošlog stoljeća uočeno je da bolesnici s karcinomom prostate s koštanim metastazama imaju povišenu aktivnost PAP-a kao i povišene serumske vrijednosti samog proteina. Uvođenjem PSA koji se pokazao boljim u probiru, stupnjevanju i prognozi karcinoma, PAP gubi na značaju u dijagnostici karcinoma prostate (45).

Prostata-specifični antigen (PSA)

PSA je glikoprotein molekularne mase 28,5 kDa, a nastaje iz 261 aminokiselina (AK) dugog preproenzima odcjepljivanjem 17 AK dugog signalnog peptida pri čemu nastaje proPSA (244 AK) (29). Daljnjim odcjepljivanjem 7 AK nastaje PSA (237 AK). Prvotno je identificiran u sjemenoj tekućini kao γ -seminoprotein. Prema funkciji je enzim koji se ubraja u skupinu serinskih proteaza i pripada velikoj porodici kalikreina pa se klasificira i kao humani kalikrein 3 (hK3, KLK3) (1). Ekspresija PSA regulirana je androgenima. Poluvrijeme raspada iznosi mu 2 - 3 dana (46). Fiziološki supstrat mu je semenogelin I kojim obiluje sjemena tekućina. U sjemenoj tekućini se nalazi u visokoj koncentraciji kamo dopijeva iz epitelnih stanica acinusa i prostatičnih kanalića. Glavna uloga mu je u likvefakciji sjemena. Iako je specifičan za epitelne stanice prostate, u malim količinama se može naći i u stanicama karcinoma dojke, žlijezdama slinovnicama, crijevima, stanicama renalnog karcinoma te drugim urološkim tkivima (40, 43, 46).

Iako je organ specifičan, nije specifičan za karcinom prostate jer povišene vrijednosti u serumu nalazimo i kod drugih uroloških stanja kao što su BHP, prostatitis ili mehaničke ozljede prostate. Mijenja se i ovisno o dobi, rasi i volumenu prostate (47). Danas se zna da stanice karcinoma ne produciraju veću količinu PSA u odnosu na normalni epitel, već je porast serumskih koncentracija posljedica narušene mikroarhitekture tkiva prostate, što dovodi do prelaska PSA u okolni, ekstracelularni prostor, limfu i zatim u sistemnu cirkulaciju (43).

PSA u serumu cirkulira u nekoliko različitih molekularnih oblika (43) (Slika 1.3.). Od 70 do 90 % kovalentnim je vezama vezano za inhibitore proteinaza α 1-antikimotripsin (PSA-ACT), α 2-makroglobulin (PSA-A2M) i α 1-proteaza inhibitor (PSA-API) u veliki makromolekularni kompleks (engl. *complexed*, cPSA). Vezivanjem za inhibitore proteinaza mijenjaju se antigene determinante PSA što predstavlja osnovu na kojoj se temelje imunokemijske metode za njegovo određivanje. Pri tome sve metode koje mjere cPSA mjere isključivo PSA-ACT (48). Manji dio (10 – 30 %) je slobodan (engl. *free*, fPSA) i predstavlja inaktivni oblik enzima. I fPSA se sastoji od nekoliko različitih molekularnih oblika: benigni ili bPSA (28 %), inaktivni ili iPSA (39 %) i proPSA (33 %) koji potječu iz različitih regija prostate. Izvorno proPSA sadržava 7 AK ostataka na početku peptidnog lanca, ali postoje i „osakaćeni“ (engl. *truncated*) oblici proPSA s 5, 4 i 2 aminokiselinska ostatka na početku peptidnog lanca (1, 43, 46, 49).



Slika 1.3. Molekularni oblici PSA (43)

Istraživanja su pokazala da 97 % svih muškaraca starijih od 40 godina imaju vrijednosti PSA u serumu manje od 4,0 ng/ml pa je ta vrijednost uzeta kao prag kod dijagnoze raka prostate (46). Navedenu vrijednost je odobrila i američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) za probir na karcinom prostate. Međutim, pri toj vrijednosti uz veliku osjetljivost (70 %) PSA ima malu specifičnost (75 %) pa je pozitivna prediktivna vrijednost ograničena na 25 % (Tablica 1.3.) (33). Uz primjenu više granične vrijednosti smanjuje se udio lažno pozitivnih rezultata, na štetu osjetljivosti. Tako pri graničnoj vrijednosti od 10,0 ng/ml, specifičnost raste i do 96 %, a osjetljivost pada na 40 - 50 %. Uz to 15 % muškaraca s niskim vrijednostima PSA imaju rak prostate (46).

Tablica 1.3. Porast vjerojatnosti za prisutnost karcinoma prostate s izborom viših graničnih PSA koncentracija

PSA (ng/ml)	Vjerojatnost za karcinom prostate (uz negativan palpatorni nalaz)
0,0 - 2,0	1 %
2,0 - 4,0	15 %
4,0 - 10,0	25 %
> 10,0	> 50 %

Klinička primjena PSA u početku se svodila na terapijsko praćenje, a zatim kao markera ostatne bolesti nakon radikalne prostatektomije (25). S obzirom na to da serumske koncentracije rastu sa stadijem, volumenom i raširenošću tumora, ima i prognostičku vrijednost (42). U dijagnostičke svrhe rabi se i dobno specifična vrijednost PSA, budući da razina PSA raste s dobi (Tablica 1.4.) (50).

Tablica 1.4. PSA vrijednosti prema dobi

Dob (godine)	Raspon referentnih intervala (ng/ml)
40 - 49	0,0 - 2,5
50 - 59	0,0 - 3,5
60 - 69	0,0 - 4,5
70 - 79	0,0 - 6,5

Kako bi se poboljšala identifikacija raka prostate i povećala specifičnost i drugi PSA oblici uvode se u kliničku praksu.

fPSA

U BHP-u u kojem dolazi do hiperplazije stanica prijelazne zone prostate, nalazimo apsolutni porast koncentracije iPSA i bPSA u serumu odnosno njihovog povećanog udjela u fPSA. Riječ je o porastu broja stanica prostate uz očuvane funkcionalne i strukturne značajke žlijezde i intaktnu mikroarhitekturu i bazalnu membranu. Povećana je sinteza PSA, ali je očuvana proteolitička pregradnja proPSA u PSA, kao i inaktivacija PSA u iPSA. To je u potpunosti u skladu s nalazom povišene vrijednosti fPSA kod bolesnika s BHP-om. Drugim riječima, omjer fPSA/tPSA (%fPSA) niži je u bolesnika s karcinomom prostate u usporedbi s bolesnicima s BHP-om i zdravim muškarcima (34).

Velika meta-analiza koja je obuhvatila 66 studija pokazala je da postotak fPSA i cPSA ima bolji dijagnostički potencijal u odnosu na ukupni PSA (tPSA) u rasponu koncentracija 2 - 10 ng/ml. Kao prognostički marker visok %fPSA korelira s manjim karcinomima nižeg stadija, dok niže vrijednosti %fPSA koreliraju s agresivnijim oblikom karcinoma, čak i 10 godina prije postavljanja dijagnoze (47). Brojne studije su pokazale da granične vrijednosti %fPSA između 14 i 28 % mogu smanjiti broj nepotrebnih biopsija između 19 i 64 %, a zadržati osjetljivost između 71 i 100 % (45).

proPSA

U tkivu prostate zahvaćenim karcinomom nalazimo izrazito bujanje sekrecijskih aktivnih stanica, destrukciju bazalne membrane i normalne mikroarhitekture prostatične žlijezde. Posljedica je stvaranje većih količina proPSA koji zbog promjena mikroarhitekture ne dolazi u susret s proteolitičkim enzimima te u pro-peptidnom obliku dopijeva u cirkulaciju. Također, udio PSA koji bi se u zdravoj prostati inaktivirao izbjegava tu proteolitičku inaktivaciju i dopijeva u cirkulaciju u enzimski aktivnom obliku koji trenutačno biva kompleksiran s inhibitorima proteaza (cPSA) (34, 51, 52). Pojedine studije su pokazale da bi mjerenje proPSA moglo smanjiti broj nepotrebnih biopsija kod muškaraca s ukupnim PSA 2,5 - 4,0 ng/ml (51). Više predoperativne vrijednosti proPSA bile su u nekim studijama povezane s tumorima visokog stadija odnosno lošijim patološkim značajkama (45).

PSA gustoća

S obzirom na predominaciju BHP-a starenjem, računanje gustoće PSA (engl. *PSA Density*, PSAD) može se koristiti za razlikovanje serumskih PSA vrijednosti među prostatama različitih veličina. PSAD se dobiva dijeljenjem vrijednost PSA s ultrazvučno dobivenim volumenom prostate (45). Povišen PSAD povezan je s većim rizikom za karcinom u odnosu na BHP i s agresivnijim oblikom karcinoma, ali mu specifičnost u otkrivanju raka prostate kao zasebnog biljega nije dovoljna (47).

Brzina stvaranja PSA

Kako je brzina porasta koncentracije PSA u cirkulaciji najveća u osoba s metastatskim karcinomom prostate, nešto manja u onih s lokaliziranim karcinomom, još manja u osoba s BHP-om te najmanja u zdravih muškaraca, moguće je pratiti brzinu stvaranja PSA (engl. *PSA Velocity*, PSAV) i na temelju tog podatka pokušati procijeniti rizik od prisutnosti karcinoma u pojedine osobe. Istraživanjem je utvrđeno da PSAV veći od 0,75/mg/ml/godišnje značajno korelira s karcinomom prostate (45). PSAV je i dobar pokazatelj agresivnosti karcinoma, a značajno je povezan i sa smrtnošću (45, 53).

Vrijeme udvostručenja PSA

Vrijeme udvostručenja koncentracije PSA (engl. *PSA doubling time*, PSDT) daljnji je pokušaj povećanja dijagnostičke točnosti PSA kao tumorskog markera. U osoba s agresivnim karcinomom prostate dolazi do udvostručenja koncentracije PSA u dvije godine (43). Najčešće se koristi za terapijsko praćenje, smatra se i dobrim prognostičkim biljekom jer može godinama prethoditi nastanku karcinoma, a postoperativni PSDT <10 mjeseci povezuje se s metastatskom bolesti (45, 53).

Humani kalikrein 2 (hK2 ili KLK2)

hK2 također pripada porodici kalikreina i dijeli 80 % homologije s PSA-om. Djeluje kao peptidaza cijepajući proPSA u aktivni PSA. Kao i PSA, primarno se eksprimira u prostati i reguliran je androgenima. Pokazuje bolju točnost u razlikovanju karcinoma od BHP-a od %fPSA kod muškaraca s vrijednosti PSA između 4 i 10 ng/ml, a kao prognostički marker dobar je u predviđanju stadija i mogućnosti širenja karcinoma i prije radikalne prostaktetomije (54, 55).

1.5.3. Transrektalni ultrazvuk (TRUZ)

TRUZ je primijenjena ultrazvučna metoda kod koje se sonda postavlja u završni dio debelog crijeva radi bolje vizualizacije prostate i okolnih struktura. Klasičan TRUZ-prikaz opisuje karcinom prostate kao hipoehogenu leziju okrugla ili ovalna oblika, katkad iregularnog ruba i različite veličine s mogućom asimetrijom. 70 % palpabilnih i 50 % nepalpabilnih karcinoma prostate je hipoehogeno. Međutim, hipoehogenost nije karakteristična za rak, a mogućnost da je hipoehogena lezija karcinom varira od 17 do 57 %. Kao i kod DRP-a stopa pozitivnih biopsija raste ako je uz patološki nalaz TRUZ-a, pozitivan nalaz DRP-a i povišen serumski PSA. TRUZ se koristi i kod biopsije prostate (43, 56).

1.5.4. Biopsija prostate

Standardni način uzimanja tkiva prostate za patohistološku analizu i postavljanje dijagnoze karcinoma prostate je biopsija prostate pod kontrolom TRUZ-a. Bioptički materijal uzima se uporabom biopsijske igle i automatskog „pištolja“ za tkivne biopsije iz lijevog i desnog režnja prostate prema odabranom protokolu. Prvi predloženi protokol uključivao je uzimanje 6 uzoraka tkiva, ali je danas poznato da sekstant biopsija može imati i do 30 % lažno negativnih nalaza. Predloženi su brojni protokoli koji povećavaju broj uzoraka tkiva po biopsiji i lokalizaciji biopata, a novija shema koristi protokol s 10 - 12 uzoraka lateraliziranih prema perifernoj zoni prostate. Apsolutne indikacije za biopsiju prostate su vrijednost PSA > 10,0 ng/ml te pozitivni nalaz DRP-a bez obzira na vrijednost PSA (43, 57).

1.6. Angiogeneza

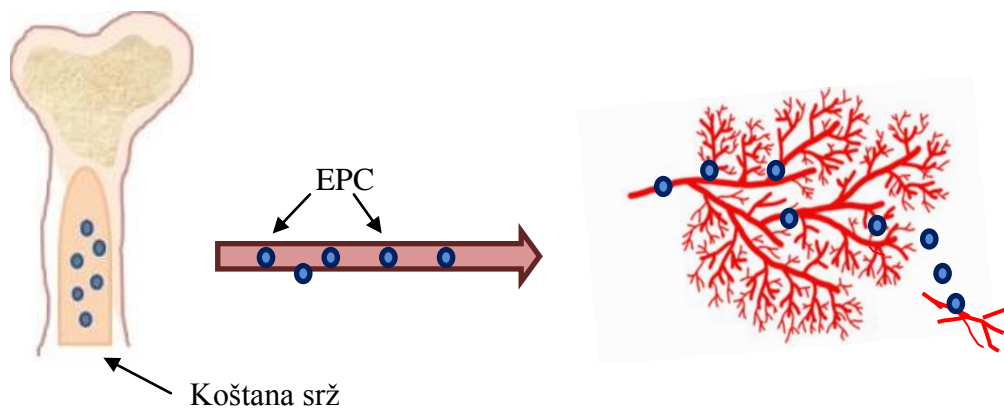
Krvožilni sustav, površine 900 m² jedan je od najvažnijih organa u organizmu, iako se dugo smatralo da služi samo kao transportni odjeljak za krv (58). Krvne žile opskrbljuju tkiva kisikom i hranjivim tvarima potrebnim za normalan rast i razvoj, uklanjaju otpadne tvari, a sudjeluju i u imunološkom odgovoru (58, 59).

Krvne žile su građene od jednog sloja endotelnih stanica koje su u direktnom kontaktu s krvlju, subendotelnog pericitnog sloja, stanica mišića glatke muskulature, fibroblasta, bazalnih membrana i izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM). Ovisno o lokalizaciji u organizmu, stanični sastav, bazalna membrana i ECM krvožilja razlikuju se prema fenotipu, funkciji i sastavu (58, 60).

Endotelne stanice krvnih žila osim što su metabolički aktivne, selektivno propusne za male molekule, peptide i proteine, aktivno sudjeluju u reguliranju procesa koagulacije krvi, usmjeravaju stanice imunološkog sustava na mjesto oštećenja i sudjeluju u remodeliranju krvožilja tijekom npr. ovulacije, zarastanja rana, tumorskog rasta (58).

Fiziološki proces stvaranja krvnih žila u odraslih naziva se angiogeneza ili neovaskularizacija. Donedavno se smatralo da je angiogeneza rezultat grananja i širenja već postojećih krvnih žila. Eksperimenti međutim upućuju na dva puta stvaranja:

1. *Angiogeneza pomoću endotelnih prekursorskih stanica* (engl. *endothelial progenitor cells, EPC*) *iz koštane srži*: EPC ulaze u krvožilni sustav, migriraju do oštećenog ili tumorski promijenjenog tkiva gdje potiču stvaranje kapilarne mreže (Slika 1.4.) (61).



Slika 1.4. Angiogeneza pomoću endotelnih prekursorskih stanica (EPC) (61)

2. *Angiogeneza iz već postojećih krvnih žila*: nove kapilare izrastaju iz malih venula bez mišićnog sloja nakon angiogenetskog poticaja, razgradnje bazalne membrane i širenja endotelnih stanica venula kroz njihovu stijenku (Slika 1.5.) (61).



Slika 1.5. Angiogeneza iz već postojećih krvnih žila (61)

Dok se aktivacija endotelnih stanica zbiva pod utjecajem citokina u sam proces angiogeneze, uključeni su brojni čimbenici od kojih neki stimuliraju, a neki inhibiraju angiogenezu (61).

Fiziološki se angiogeneza nalazi tijekom embrionalnog razvoja, cijeljenja rana, za vrijeme formiranja žutog tijela i folikula jajnika te u rastu endometrija (58).

Patološka angiogeneza je posljedica gubitka ravnoteže među čimbenicima koji stimuliraju i čimbenika koji inhibiraju angiogenezu. Zbog toga dolazi do prekomjernog rasta krvnih žila tijekom patoloških procesa kao što su kardiovaskularna oboljenja (ateroskleroza), kronične upalne bolesti (reumatoidni artritis, Chronova bolest), dijabetes (dijabetička retinopatija), psorijaza, endometrioza, pretilost, rast, razvoj te metastaziranje tumora (61). Upala i angiogeneza su usko povezane i često se preklapaju, a kronična upala oštećivanjem DNA putem kisikovih radikala i dušikovih spojeva, pojačanom proliferacijom stanica i stimuliranjem angiogeneze može dovesti do tumorigeneze (62, 63). Nedostatan rast krvnih žila javlja se kod ishemijske bolesti srca, sklerodermije i infertiliteta (64).

Proces stvaranja potpuno novih krvnih žila u embriju iz endotelnih staničnih prekursora angioblasta nazivamo vaskulogeneza. Vaskulogeneza nema toliko važnu ulogu u razvitku tumora kao angiogeneza (65).

1.6.1. Tumorska angiogeneza

J. Folkman je prije 40-ak godina postavio tezu o važnosti angiogeneze za tumorski rast i metastaziranje (66). Bez ugradnje novih krvnih žila, tumorski rast je ograničen u veličini. Kod malih, neovaskularnih tumora, stanični unos kisika i hranjivih sastojaka odvija se difuzijom. Tumorske stanice, međutim, imaju sposobnost lučenja topivih faktora koji mogu inducirati neovaskularizaciju i omogućiti im rast veći od 2 - 3 mm. Proces se naziva „angiogenim okidačem“ i ukazuje na dobivanje angiogenog fenotipa. To je fiziološki mehanizam koji se događa kada tumor ili stroma produciraju suvišak proangiogenih čimbenika (npr. čimbenik rasta krvožilnog endotela, bazični čimbenik rasta fibroblasta, interleukin 8, dušikov oksid, tumor nekroza faktor) u odnosu na antiangiogene čimbenike (npr. tkivni inhibitor metaloproteinaza 1, angiostatin, endostatin, interferon, trombospondin) (65, 67-69).

Angiogeneza je ključni korak za rast, razvoj i metastaziranje tumora (Slika 1.6.). Novostvorene krvne žile, osim što tumor opskrbljuju kisikom i hranjivim tvarima te uklanjaju otpadne metabolite čine izvor čimbenika rasta, citokina i hormona koje tumor koristi, imaju proteolitičku aktivnost koja potiče invazivni fenotip, izvor su cirkulirajućih endotelnih i EPC stanica koje se mogu ugraditi u nove krvne žile i omogućuju stanicama tumora širenje u organizam odnosno metastaziranje (67). Novostvorene krvne žile se fenotipski mogu bitno razlikovati od krvnih žila normalnog tkiva (68).



Slika 1.6. Angiogeneza tumora (67)

Karcinom prostate je, kao i svi solidni tumori (npr. dojke, pluća, rektuma, mjehura) ovisan o sposobnosti formiranja novih krvnih žila, koje mu podupiru rast i omogućavaju invaziju u okolno tkivo i udaljene metastaze (7, 70).

Tablica 1.5. pokazuje proangiogenske i antiangiogenske čimbenike specifične za karcinom prostate. Osim navedenih čimbenika na angiogenezu, u prostati utječe i hipoksija (nastaje kad tumor preraste svoj krvožilni sustav) koja putem hipoksijom induciranog faktora I (engl. *hypoxia-inducible factor-1*, HIF-1) inducira ekspresiju proangiogenog faktora rasta krvožilnog sustava (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). Čini se da na ekspresiju VEGF-a u stanicama karcinoma prostate i fibroblastima prostate utječu i androgeni (71, 72). Dušikov oksid kojeg produciraju stanice tumora prostate, ali i normalne prostate također djeluje proangiogeni (71).

Istraživanja su pokazala da PSA ovisno o serumskim razinama ima antiangiogenu aktivnost i inhibira odgovor endotelnih stanica i na VEGF i na bazični faktor rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF). Ta antiangiogena aktivnost PSA možda može objasniti sporu progresiju nekih tumora prostate (71).

Za kliničku primjenu, angiogeneza se danas istražuje u dijagnostičke svrhe (potencijalni prediktori razvoja i progresije karcinoma te preživljavanja pacijenata), za ubrzavanje cijeljenja rana te uporabu inhibitora angiogeneze u terapijske svrhe.

Tablica 1.5. Angiogeni faktori u karcinomu prostate

Proangiogeni	Antiangiogeni
Matriks metaloproteinaze (MMP)	Tkivni inhibitor metaloproteinaza 1 (TIMP-1)
Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)	Interleukin 10 (IL-10)
Bazični faktor rasta fibroblasta 2 (bFGF-2)	Angiostatin
Faktor rasta fibroblasta 4 (FGF-4)	Endostatin
Transformirajući faktor rasta β 1 (TGF- β 1)	Prostata specifični antigen (PSA)
Interleukin 8 (IL-8)	Interferon (IFN)
Interleukin 6 (IL-6)	
Interleukin 1 β (IL-1 β)	
Ciklooksigenaza 2 (COX-2)	
Dušikov oksid (NO)	
Tumor nekroza faktor (TNF)	
Inzulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1)	

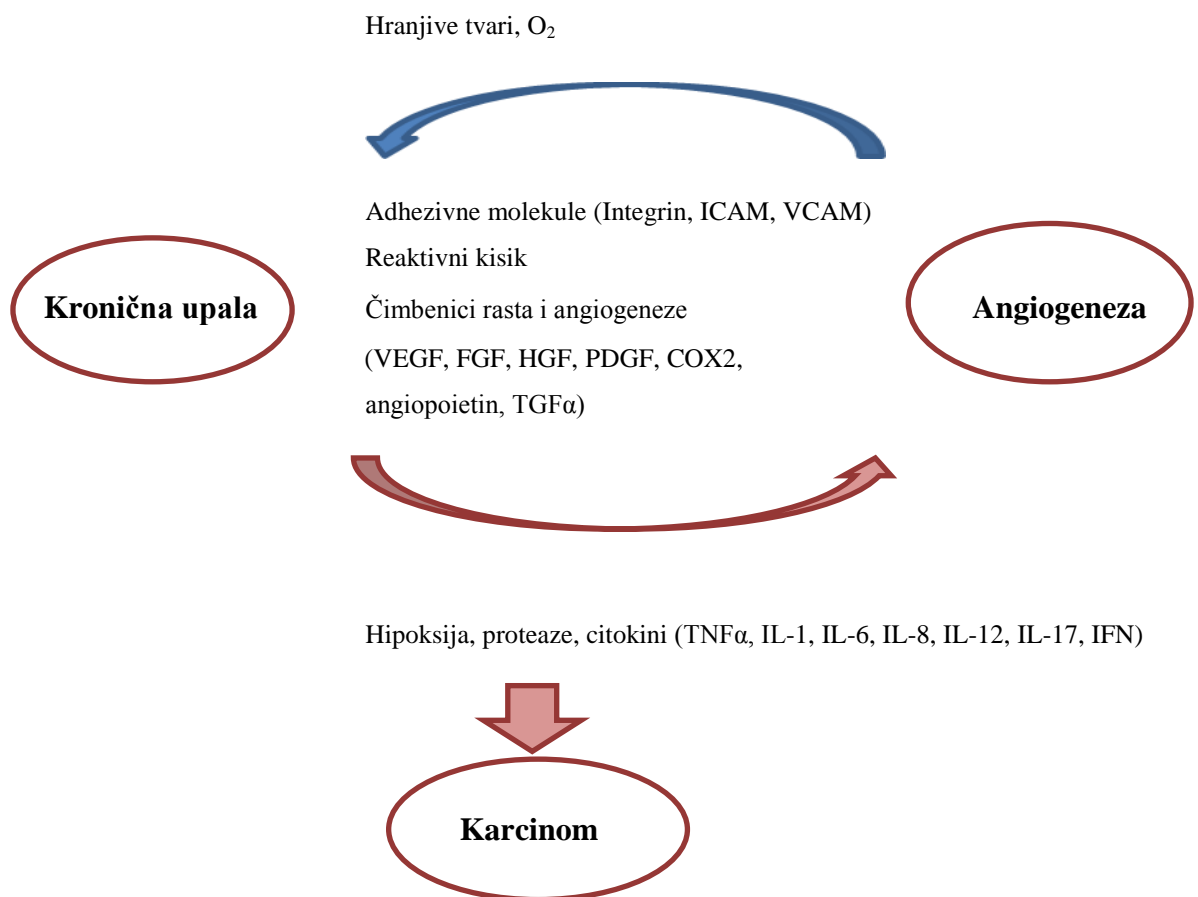
1.7. Citokini

Citokini su mali niskomolekularni peptidi (10 - 40 kD) (73) koje izlučuju stanice kao odgovor na specifični podražaj, a koji potom mijenjaju ponašanje iste ili druge stanice. Djeluju na ciljne stanice uglavnom u hematopoetskom sustavu vezanjem na specifične receptore, pokretanjem prijenosa signala i putovima sekundarnog glasnika u ciljnoj stanici. Djeluju u vrlo složenoj i koordiniranoj mreži u kojoj mogu modulirati vlastitu sintezu, kao i sintezu drugih citokina i receptora za citokine. Proizvodnja brojnih citokina, kao odgovor i na antigen specifične i na antigen nespecifične podražaje presudna je za ishod upalnih imunoloških odgovora (74).

Citokini, koji imaju ključnu ulogu u reguliranju i humoralnog i celularnog imunog odgovora dobili su na značaju u biologiji karcinoma još od 1893. godine kada je William Coley pokazao da različiti maligni tumori uđu u regresiju nakon infekcije određenim bakterijama (75). Citokinska revolucija 70-ih godina prošlog stoljeća potakla je razmišljanje da je razlog tomu oslobađanje tumor inhibitorskih citokina, kao što su IFN i tumor nekroza

faktor (TNF), kao posljedica djelovanja bakterijskih endotoksina (76). Danas je poznato da 15 - 20 % svih tumora u podlozi ima kroničnu upalu (77).

Upala i angiogeneza su usko povezane jer često dijele iste putove, a povezane su i s karcinomom (Slika 1.7.). Od različitih tipova upalnih stanica koje infiltriraju tumore kao odgovor na upalne podražaje, makrofagi koji podržavaju tumore (engl. *tumor-supporting macrophages*, TAM) imaju ključnu ulogu u lučenju raznih čimbenika rasta, proteinaza, kemokina pa tako i čimbenika angiogeneze i citokina u međusobnom djelovanju sa stanicama tumora. Ti čimbenici povratno stimuliraju staničnu pokretljivost, migriranje, proliferaciju, preživljavanje, angiogenezu i metastaziranje i tako potiču progresiju karcinoma (77).



Slika 1.7. Povezanost procesa angiogeneze, upale i karcinoma (77)

Citokini su svojim i autokrinim i parakrinim djelovanjem na mnoge različite načine uključeni i u maligni proces: djeluju direktno na inhibiciju rasta tumorskih stanica, dovode do tumorske regresije ili pojačavaju antitumorske imune učinke, ali mogu djelovati i kao faktori

rasta za maligne stanice, a mogu posredovati i paraneoplastičnim učincima na razini DNA i na razini tumorskog mikrokoliša (5, 6, 69).

Tumor je kao i njegov odgovor na terapiju nepredvidljiva bolest pa bi se takvo ponašanje djelomično moglo objasniti genetičkom heterogenosti i nestabilnosti stanica raka. Međutim, moguće je da na odnos između domaćina i stanice raka mogu utjecati individualne varijacije u genskom kodu ljudi. Polimorfizam humanog gena ima ulogu u imunim odgovorima, a među genima povezanim s imunim sustavom, geni citokina su često polimorfni. Neki polimorfizmi citokina i receptora citokina mogu imati izravan utjecaj na njihovu funkciju izravnim i neizravnim utjecajem na razinu ekspresije gena i/ili njegove funkcije. Većina polimorfizama gena citokina ili njihovih receptora nalaze se u promotorskoj, intronskoj i 3'-netranslatirajućim regijama (78).

Posebna pozornost se posvećuje polimorfizmima u jednoj bazi (engl. *single-nucleotide polymorphisms*, SNP) smještenim najčešće u promotorskim regijama gena koji mijenjaju razinu transkripcije, odnosno utječu na konačnu količinu proteinskog produkta u serumu i/ili tumorskom tkivu oboljelih, a nositelji navedenih polimorfizama mogu imati veću sklonost obolijevanju od pojedinih vrsta tumora (74).

1.7.1. Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β je proinflammatorni citokin kojeg primarno luče monociti. Ima središnju i primarnu ulogu u upalnom odgovoru i popravljaju tkivnog oštećenja (79). Može modulirati angiogenezu direktnom interakcijom s vaskularnim endotelnim stanicama ili pojačavanjem produkcije proangiogenih faktora putem parakrine kontrole. Stimulira migraciju i proliferaciju endotelnih stanica, ekspresiju adhezijskih molekula, produkciju medijatora upale i povlačenje leukocita. U različitim animalnim modelima je potreban za rast tumora, metastaziranje i angiogenezu (80, 81). Dovodi do snažne indukcije IL-8 u različitim stanicama, a djeluje i kao pozitivni ili negativni medijator stanične smrti (6, 82). Zajedno s IL-6 stimulira angiogenezu i produkciju VEGF-a u stanicama karcinoma želuca, kao i u glioma stanicama (83). Eksperimentalne studije pokazuju povezanost IL-1 β i s karcinomom prostate. Antagonist IL-1 β receptora inhibira angiogenezu i razvoj tumora, ukazujući da je signaliziranje putem IL-1 β receptora uključeno u upalu i rast tumora. Istraživanjem je utvrđeno da IL-1 β promovira invazivnost, angiogenezu tumora i supresiju imunog sustava domaćina (80).

Gen koji kodira humani *IL-1* kompleks (obuhvaća *IL-1 α* , *IL-1 β* i antagonist receptora za *IL-1*, *IL-1Ra*) smješten je na dugom kraku kromosoma 2 (2q13-q21). *IL-1 β* gen dužine je 1498 pb i kodira protein od 269 AK (84, 85) koji nastaje iz 31 kD prekursora cijepanjem pomoću kaspaze 1 (85). *IL-1 α* i *IL-1 β* su homologni u samo 22 % genske sekvence, ali djeluju s visokim afinitetom preko istog *IL-1* receptora (*IL-1Ra*) s kojim *IL-1 β* dijeli 26 % genske sekvence (86).

Opisano je nekoliko različitih polimorfizama *IL-1 β* gena uključujući dva u promotorskoj regiji (511C>T, rs1143627 i 31T>C, rs16944) i jedan na eksonu 5 (3954C>T, rs1143634). T alel na eksonu 5 povezuje se s povećanom sintezom proteina (85), iako su podaci vezani uz funkcionalne učinke navedenih polimorfizama na produkciju *IL-1 β* proturječni (87). Povećana ekspresija *IL-1 β* povezuje se s povećanim rizikom za karcinom dojke, želuca, pankreasa, cerviksa i ovarija (88).

1.7.2. Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 (*IL-8*) je proinflamatorni kemokin koji aktivira i kemotaktično djeluje na neutrofile, inducira angiogenezu i inhibira proliferaciju mijeloidnih progenitornih stanica, a neophodan je i za infiltraciju neutrofila u većini upalnih reakcija. Danas se zna da je i autokrini faktor rasta za maligni melanom i keratinocite (89, 90). *IL-8* pokazuje mitogenu i morfogenu aktivnost za endotelne stanice i regulira angiogenezu u karcinomu pluća i melanomu. *IL-8* eksprimira karcinom prostate i ta ekspresija korelira s metastatskim potencijalom (91-93). Osim toga, neutralizirajuća antitijela na *IL-8* inhibiraju angiogenetsku aktivnost PC-3 homogenata karcinoma prostate i reduciraju tumorigeničnost *in vivo*, ukazujući da je *IL-8* važan modulator rasta karcinoma prostate (94). *IL-8* djeluje putem dva receptora *IL-8RA* i *IL-8RB* koji također imaju značajnu ulogu u angiogenezi i progresiji tumora (93).

Gen za *IL-8* nalazi se na kromosomu 4q13-q21, dužine 5,2 kb. Postoje četiri različite varijante *IL-8* proteina građene od 69, 72, 77 i 79 AK. Predominantni je *IL-8* sa 72 AK (90).

U promotorskoj regiji *IL-8* gena otkriven je A > T SNP polimorfizam na položaju -251pb (rs4073) koji utječe na transkripciju. Međutim, povezanost između -251A alela i transkripcijske aktivnosti je proturječna. Većina studija je pokazala direktnu povezanost alela A s pojačanom transkripcijom, pojačanom sintezom *IL-8* proteina te povećanim rizikom od nekih karcinoma (89, 95), međutim Lee i sur. su pokazali 2 - 5 puta veću transkripcijsku aktivnost T alela u staničnim linijama raka želuca (89).

1.7.3. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)

VEGF je heparin-vezujući glikoprotein (96, 97), ključan za normalnu funkciju endotelnih stanica (migriranje, dijeljenje, mijenjanje genske ekspresije, zaštitu od starenja i apoptozu), poticanje angiogeneze i vaskularne permeabilnosti (98). Neophodan je za razvoj angiogeneze i gubitak samo jednog alela rezultira ranim embrionalnim letalitetom (99).

VEGF je obitelj strukturno povezanih dimernih glikoproteina koji su članovi superobitelji faktora rasta podrijetlom iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF). U VEGF obitelji osim prototipa VEGF-A nalaze se i VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E te placentarni faktor rasta (engl. *placenta growth factor*, PIGF). Aktivni VEGF-A oblik sintetizira se kao homodimer (40-45 kD) ili heterodimer s ostalim članovima VEGF obitelji (99, 100). VEGF-A, -B, -C, -D i PIGF različitim se afinitetom vežu na tri tirozin kinazna receptora VEGF receptor-1 (VEGFR-1), VEGFR-2 i VEGFR-3 eksprimirana na svim endotelnim stanicama krvožilja odraslih osoba izuzev endotela krvožilja mozga (99).

VEGF-A gen nalazi se na kromosomu 6p21.3, dužine je 14kb, a kodira ga 8 eksona i 7 introna. Alternativnim cijepanjem proteinske strukture nastaju četiri glavne izoforme VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ (predominantni oblik), VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆ koje se međusobno razlikuju po svojoj bioraspodijeljenosti ovisnoj o heparin i heparin sulfat vezujućim domenama (99, 101).

Ključni regulator VEGF ekspresije je hipoksija putem HIF-1 i von Hippel-Lindau tumor supresor gena (VHL) pa je VEGF najbolje eksprimiran u nekrotičnim područjima. Osim hipoksije na lučenje utječu i čimbenici rasta i citokini (PDGF, epidermalni faktor rasta, faktor rasta fibroblasta, TNF α , TGF α i β , IGF-1, IL-1 β , IL-6), ultravioletno zračenje, vodikov peroksid, Ras i p53 onkogeni te proangiogeni onkogeni Src, c-Myc, Fos i Bcl-2 (99).

Povećana razina VEGF-a nalazi se u nekoliko humanih neoplazija uključujući tumor dojke, pluća, mozga, gušterače, ovarija, bubrega i mjehura (99). Brojne studije ukazuju i na pozitivnu korelaciju između serumskih VEGF koncentracija i tumorske progresije (102). VEGF ekspresija, i u tumoru i u cirkulaciji, korelira sa slabom prognozom pacijenata s neoplazijama kao što su karcinom dojke, „non small cell“ karcinom pluća, kao i karcinomi općenito (83).

VEGF se visokim afinitetom veže na specifični receptor Flt-1 i receptor s kinaza umetnutom domenom koji su eksprimirani i na vaskularnim endotelnim stanicama i na stanicama tumora prostate. To ukazuje da VEGF iskazuje svoje angiogenske funkcije i funkcije rasta tumorskih stanica preko autokrinih i/ili parakrinih mehanizama u karcinomu prostate (103, 104).

Mnogi jednostruki nukleotidni polimorfizmi su identificirani u promotorskoj (npr. -2578C>A, rs699947, -2489C>T, rs1005230), kodirajućoj (npr. -7C>T, rs25648), 3'-nekodirajućoj (npr. +813C>T, rs3025039, 1612G>A, rs10434) i 5'-nekodirajućoj (npr. 405G>C, rs2010963) regiji *VEGF* gena (103). 5'- i 3'-nekodirajuće regije sadržavaju regulatorne komponente osjetljive na hipoksiju i doprinose velikoj raznolikosti u produkciji VEGF-a među tkivima. Tako 405G>C SNP utječe na učinkovitost translacije proteina, a +813C>T SNP utječe na cirkulirajuće vrijednosti u plazmi i tkivnu ekspresiju tumora. Vjerojatno samo mali broj polimorfizama i haplotipova ima stvarni funkcionalni učinak na translaciju VEGF-a, dok ostali samo potpomažu proces (105). Neki od njih povezani su s različitom ekspresijom. Pokazano je da je ekspresija VEGF-a neovisan prognostički faktor u mnogim tipovima malignih tumora, npr. prostate, kolona, mjehura, a čini se da značajno korelira i s preživljavanjem bez relapsa kod karcinoma dojke (96, 106).

2. HIPOTEZA

Učestalost alela/genotipova povezanih s promijenjenom ekspresijom IL-1 β , IL-8 i VEGF citokina uslijed polimorfizama gena koji ih kodiraju veća je u oboljelih od karcinoma prostate u odnosu na zdravu populaciju.

Učestalost alela/genotipova povezanih s promijenjenom ekspresijom IL-1 β , IL-8 i VEGF citokina veća je kod agresivnijeg oblika karcinoma prostate.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove disertacije jest utvrditi postoji li povećana sklonost obolijevanju od karcinoma prostate vezana uz polimorfizme gena za citokine uključene u proces angiogeneze u našoj populaciji. Kako bi se utvrdio utjecaj odabranih gena citokina na nastanak karcinoma i stupanj agresivnosti postavljeni su sljedeći ciljevi:

- Ispitati postoje li razlike uslijed polimorfizama gena za *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* kod bolesnika s karcinomom prostate u odnosu na kontrolnu skupinu,
- Ispitati postoje li razlike uslijed polimorfizama gena za *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* kod bolesnika s različitim stadijima karcinoma prostate,
- Ispitati ukupni rizik ispitivanih polimorfizama gena za *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* na nastanak i stupanj agresivnosti karcinoma prostate.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Prospektivna studija istraživanja parova provedena je na Klinici za urologiju, Kliničkom odjelu za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja, Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu i Odjelu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek.

4.2. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 275 ispitanika liječenih na Klinici za urologiju: 120 oboljelih od karcinoma prostate, 120 oboljelih od BHP-a koji su činili kontrolnu skupinu te 35 ispitanika bez simptoma i znakova bilo kakvog procesa u prostati (liječeni zbog litijaze ili dragovoljni davatelji krvi) koji su činili dodatnu kontrolnu skupinu.

Prema G-power izračunu za određivanje razlike između dvaju nezavisnih uzoraka u kategoriji varijabli, odnosno za određivanje razlika u omjerima, uz $\alpha = 0,05$, snagu 80 % i srednji učinak (0,3) potrebno je ukupno 143 ispitanika, odnosno najmanje 72 ispitanika po glavnim skupinama.

Kriteriji za uključivanje ispitanika u istraživanje:

- Muškarci primljeni i obrađeni na Klinici za urologiju sa sumnjom na BHP ili karcinom prostate,
- Muškarci iznad 50 godina bez simptoma i znakova bilo kakvog procesa u prostati.

Kriteriji za isključivanje ispitanika iz istraživanja:

- Nepristanak na ispitivanje,
- Dokazan drugi primarni karcinom,
- Muškarci mlađi od 50 godina bez simptoma i znakova bilo kakvog procesa u prostati.

4.3. Metode

4.3.1. Klinički pregled

Ispitanici s karcinomom prostate i BHP-om su ambulantno pregledani i dijagnostički obrađeni na Klinici za urologiju. Tijekom ambulantne obrade:

- Uz pregled uzeta je obiteljska anamneza,
- Obavljen je intervju u kojem je ispitanik upoznat s načinom provođenja i svrhom ispitivanja,
- Svaki ispitanik dao je pismeni pristanak za sudjelovanje u ispitivanju,
- Svaki ispitanik popunio je upitnik s bitnim podacima:
 - Dob
 - Tjelesna težina i visina
 - Komorbiditeti
 - Status pušenja
 - Konzumiranje alkohola
- Izuzeta su dva uzorka krvi: jedan bez dodatka antikoagulansa za PSA analizu i drugi na K₂EDTA antikoagulans za analizu ispitivanih polimorfizama gena,
- Učinjen je DRP i TRUZ uz biopsiju prostate,
- Uzorak bioptata poslan je na PHD analizu.

Ispitanici iz dodatne kontrolne skupine za razliku od ispitanika s BHP-om i karcinomom prostate nisu podvrgnuti TRUZ i biopsiji prostate.

4.3.2. Laboratorijski testovi

4.3.2.1. Određivanje koncentracije PSA-a

Koncentracija PSA-a određena je iz uzorka krvi bez dodanog antikoagulansa elektrokemiluminiscentnim imunotestom (ECLIA) na COBAS_e 6000 analizatoru (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka).

Postupak:

- U prvoj inkubaciji 20 µl uzorka seruma, biotinizirano monoklonalno PSA-specifično antitijelo i monoklonalno PSA-specifično antitijelo označeno rutenijum kompleksom reagiraju i stvaraju „sendvič“ kompleks.
- U drugoj inkubaciji nakon dodavanja streptavidinom obloženih mikročestica, kompleks se veže na čvrstu fazu interakcijom biotina i streptavidina.
- Reakcijska smjesa se prenosi u mjernu kivetu gdje se mikročestice magnetski zadržavaju na površini elektrode, a nevezana supstanca se ispere. Promjenom voltaže na elektrodi inducira se kemiluminiscentna emisija koju mjeri fotomultiplikator.

4.3.2.2. Analiza polimorfizama gena *IL-1β*, *IL-8* i *VEGF*

Analizirana su tri SNP polimorfizma: rs1143634 u genu *IL-1β*, rs4073 u genu *IL-8* te rs2010963 u genu *VEGF*.

Genomska DNA izolirana je iz 200 µl K₂EDTA krvi primjenom izolacijskog kita „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Genotipizacija je rađena metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR) tehnologijom LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka).

Izolacija DNA

Postupak izolacije genomske DNA iz pune krvi prema uputama proizvođača:

- 200 μL uzorka krvi, 200 μL vezujućeg pufera (6 M gvanidin-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20 % triton X-100 (v/v), pH 4,4 (25°C)) i 40 μL rekonstituirane otopine proteinaze K promiješa se uz inkubaciju tijekom 10 min na 72°C,
- Doda se 100 μL izopropanola, dobro se promiješa i smjesa prebaci u Filter tubicu smještenu u Kolektor tubici,
- Centrifugira se 1 min na 8000 x g,
- Nakon prebacivanja Filter tubice u novu Kolektor tubicu doda se 500 μL rekonstituiranog pufera za uklanjanje inhibitora (5M gvanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25°C)),
- Centrifugira se 1 min na 8000 x g,
- Kolektor tubica se zamijeni novom, doda se 500 μL rekonstituiranog pufera za ispiranje (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)),
- Centrifugira se 1 min na 8000 x g,
- Postupak ispiranja ponovi se još jednom,
- Nakon potpunog uklanjanja pufera za ispiranje DNA se eluira dodatkom 200 μL prethodno zagrijanog (70°C) eluacijskog pufera (10 mM Tris-HCl, pH 8,5 (25°C)) u Filter tubicu,
- Centrifugira se 1 min na 8000 x g,
- Alikvoti eluirane DNA su do analize uskladišteni na -20°C.

Genotipizacija

Materijal: uzorci genomske DNA, oligonuleotidne početnice, hibridizacijske probe, „LightCycler-DNA Master Hybridization Probes Kit“.

Postupak: Polimorfizmi gena *IL-1 β* (rs1143634), *IL-8* (rs4073) i *VEGF* (rs2010963) analizirani su RT-PCR metodom i analizom krivulje temperature taljenja (T_m). Polimorfizmi rs4073 i rs2010963 određivani su pomoću LightSNiP Kit-ova (Tib Molbiol, Berlin, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Specifični odsječci gena *IL-1 β* umnažani su u konačnom volumenu od 10 μ L uz specifične početnice i hibridizacijske probe u kombinaciji s LightCycler-DNA Master Hybridization Probes Kit-om (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka). Konačna koncentracija svake od početnica bila je 0,5 μ M, svake od hibridizacijskih proba 0,15 μ M dok je konačna koncentracija MgCl₂ u reakcijskoj smjesi bila 3 mM (107). Nukleotidni slijedovi početnica (Tib Molbiol, Berlin, Njemačka ili Invitrogen Life Technologies, Paisley, Velika Britanija) i hibridizacijskih proba (Tib Molbiol, Berlin, Njemačka) prikazani su u tablici 4.1.. PCR reakcijske smjese prikazane su u tablici 4.2., a uvjeti PCR reakcija u Tablici 4.3.

Tablica 4.1. Nukleotidni slijed početnica i hibridizacijskih proba

Gen	SNP	Početnica 1	Početnica 2	Hibridizacijska proba 1	Hibridizacijska proba 2
<i>IL-1β</i>	rs1143634	5'- GTTGTC	5'- TTCAGTTC	5'- CCTATCTTCTTCG	5'-LCRed640- ACGAGGCTTA
<i>IL-8</i>	rs4073	LightSNIP Kit (Tib Molbiol, Berlin, Njemačka)			
<i>VEGF</i>	rs2010963	LightSNIP Kit (Tib Molbiol, Berlin, Njemačka)			

Tablica 4.2. Sastav reakcijskih smjesa

Gen	<i>IL-1β</i>	<i>IL-8</i>	<i>VEGF</i>
SNP	rs1143634	rs4073	rs2010963
Konačna koncentracija	MgCl ₂ (mM)	3,00	LightSNIP Kit (Tib Molbiol, Berlin, Njemačka) prema uputama proizvođača
	Početnica 1 (μ M)	0,50	
	Početnica 2 (μ M)	0,50	
	Hibridizacijska proba 1 (μ M)	0,15	
	Hibridizacijska proba 2 (μ M)	0,15	
Volumen (μ l)	LC DNA master Hyb	1,00	LightSNIP Kit (Tib Molbiol, Berlin, Njemačka) prema uputama proizvođača
	H ₂ O	3,20	
Uzorak DNA (μ l)	1,50	2,25	2,25
Ukupni volumen (μ l) reakcijske smjese	10	15	15

Tablica 4.3. Uvjeti PCR reakcija

Gen	SNP	Denaturacija	Amplifikacija	Analiza krivulje taljenja	PCR produkt (pb)	
<i>IL-1β</i>	rs1143634	95°C / 10min / 20°C/s	30 ciklusa 97°C / 10s / 20°C/s 63°C / 10s / 20°C/s 72°C / 10s / 20°C/s 35 ciklusa 95°C / 10s / 20°C/s 58°C / 10s / 20°C/s 72°C / 10s / 20°C/s	95°C / 3s / 20°C/s 40°C / 1,5min / 20°C/s 80°C / 0s / 0,1°C/s	249	Tm1=55°C (alel T) Tm2=63°C (alel C)
<i>IL-8</i>	rs4073	95°C / 10min / 20°C/s	45 ciklusa 95°C / 10s / 20°C/s 60°C / 10s / 20°C/s 72°C / 15s / 20°C/s	95°C / 20s / 20°C/s 40°C / 20s / 20°C/s 85°C / 0s / 0,2°C/s	LightSNIP Kit (Tib Molbiol, Berlin, Njemačka)	Tm1=52,4° C (alel A) Tm2=58,3° C (alel T)
<i>VEGF</i>	rs2010963	95°C / 10min / 20°C/s	45 ciklusa 95°C / 10s / 20°C/s 60°C / 10s / 20°C/s 72°C / 15s / 20°C/s	95°C / 20s / 20°C/s 40°C / 20s / 20°C/s 85°C / 0s / 0,2°C/s	LightSNIP Kit (Tib Molbiol, Berlin, Njemačka)	Tm1=52,9° C (alel G) Tm2=65,6° C (alel C)

4.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka učinjena je programom MedCalc, verzija 12.4.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) uz $P < 0,05$ kao prag statističke značajnosti.

Deskriptivna statistika za kategoričke varijable iskazana je udjelima i postotcima, a za numeričke varijable ovisno o normalnosti raspodjele (medijan i raspon u slučaju raspodjela koje nisu normalne, a aritmetička sredina i standardna devijacija u slučaju normalnih raspodjela).

Normalnost raspodjele određena je Kolmogorov-Smirnovljevom testom. Ovisno o distribuciji podataka, analiza je provedena odgovarajućim parametrijskim i neparametrijskim testovima. Za testiranje razlike kvantitativnih varijabli među skupinama upotrijebljen je Studentov t-test (ANOVA), a za raspodjele koje nisu normalne korišten je neparametrijski Mann-Whitney test (Kruskall-Wallis).

Za analizu usporedbe frekvencije genotipova i alela korišteni su χ^2 i Fisher-exact test. Za analizu frekvencije genotipova učinjena je analiza Hardy-Weinberg ravnoteže. Za svaki genotip određen je omjer izgleda (engl. *odds-ratio*, OR) za razvoj karcinoma prostate i pojavnost agresivnijeg oblika karcinoma uz 95 % područje pouzdanosti.

Gdje nije bilo moguće provesti univarijatnu analizu, učinjena je multivarijatna analiza programom SPSS, verzija 15.0 (SPSS inc., USA) uz $P < 0,05$ kao prag statističke značajnosti.

5. REZULTATI

5.1. Demografski i klinički parametri ispitivanih skupina

5.1.1. Dob ispitanika

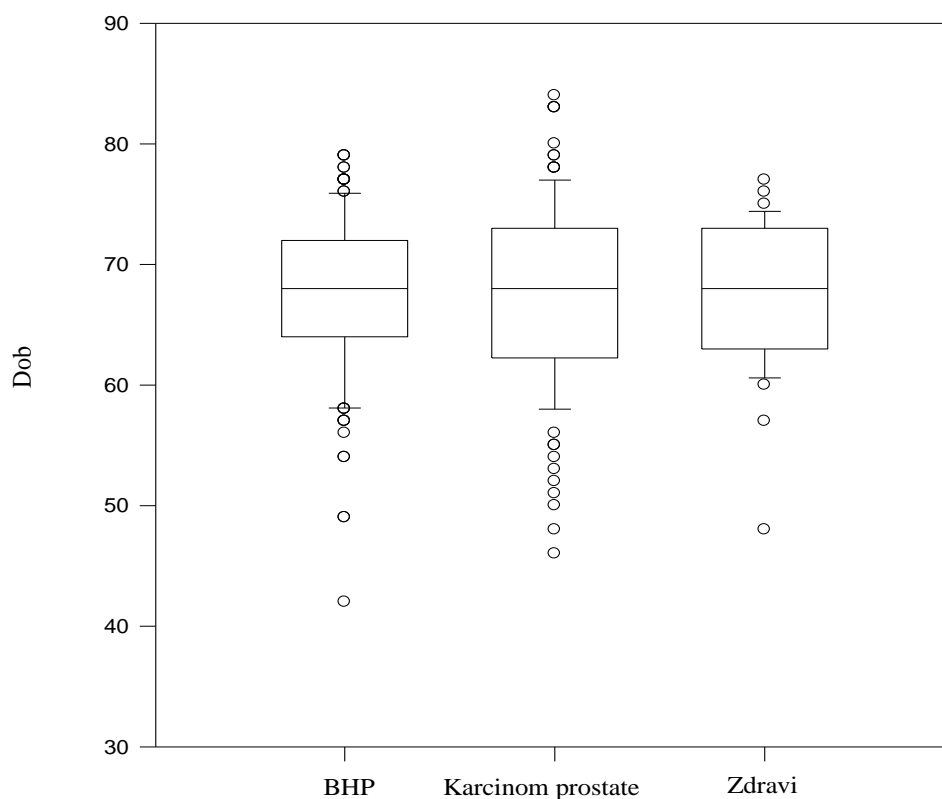
Ispitanici su u sve tri skupine bili dobno usklađeni (Tablica 5.1.; Slika 5.1.).

Tablica 5.1. Deskriptivna statistika za dob ispitanika

Skupina	Medijan	Minimum	Maksimum	25 %	75 %	SD*
BHP	68	42	79	64	72	6,65
Karcinomi	68	46	84	62,5	73	7,76
Zdravi	68	48	77	63,25	72,75	6,05

Stupnjevi slobode=2; P=0,983 (Kruskal-Wallis test)

SD*-Standardna devijacija



Slika 5.1. Raspodjela ispitanika prema dobi

5.1.2. Indeks tjelesne težine ispitanika

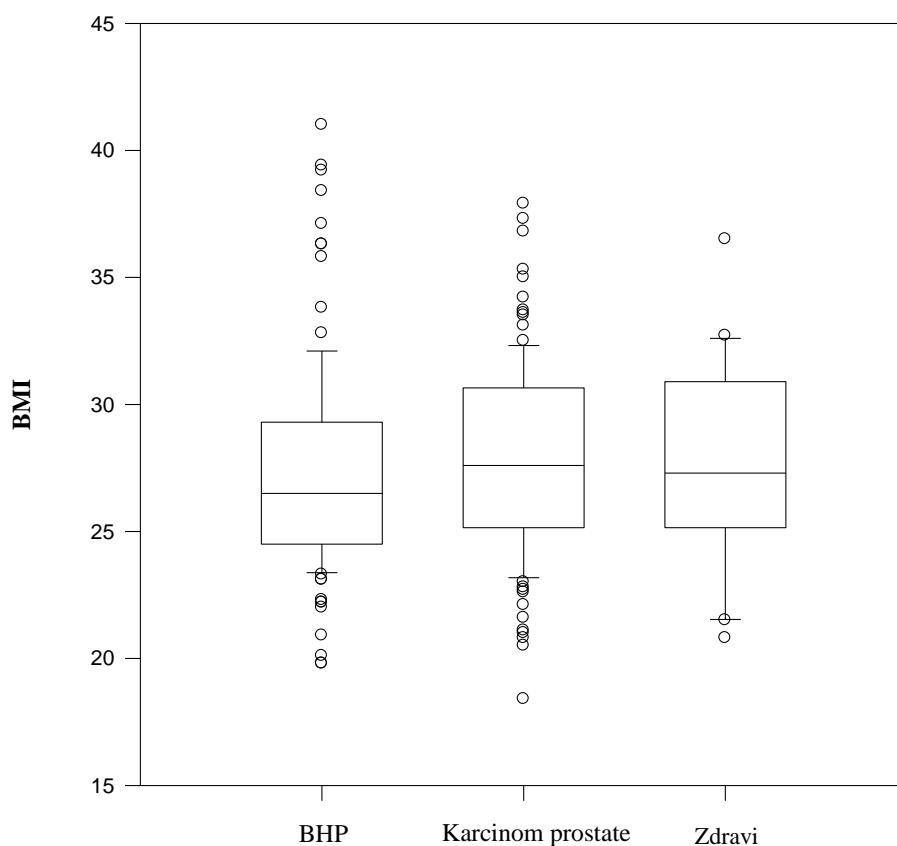
Prema indeksu tjelesne težine (BMI) većina ispitanika bila je pretila (Tablica 5.2.; Slika 5.2), a najviše pretilih bilo je u skupini pacijenata s karcinomom prostate (77,5%) u odnosu na ispitanike s BHP (69,2%) odnosno zdrave ispitanike (45,7%).

Tablica 5.2. Deskriptivna statistika za indeks tjelesne težine

Skupina	Medijan	Minimum	Maksimum	25 %	75 %	SD*
BHP	26,5	19,8	41	24,5	29,3	4,01
Karcinomi	27,6	18,4	37,9	25,2	30,6	3,79
Zdravi	27,3	20,8	36,5	25,43	30,9	4,05

Stupnjevi slobode=2 ; P=0,150 (Kruskal-Wallis test)

SD*-Standardna devijacija



Slika 5.2. Raspodjela ispitanika prema indeksu tjelesne težine

5.1.3. Serumske PSA vrijednosti ispitanika

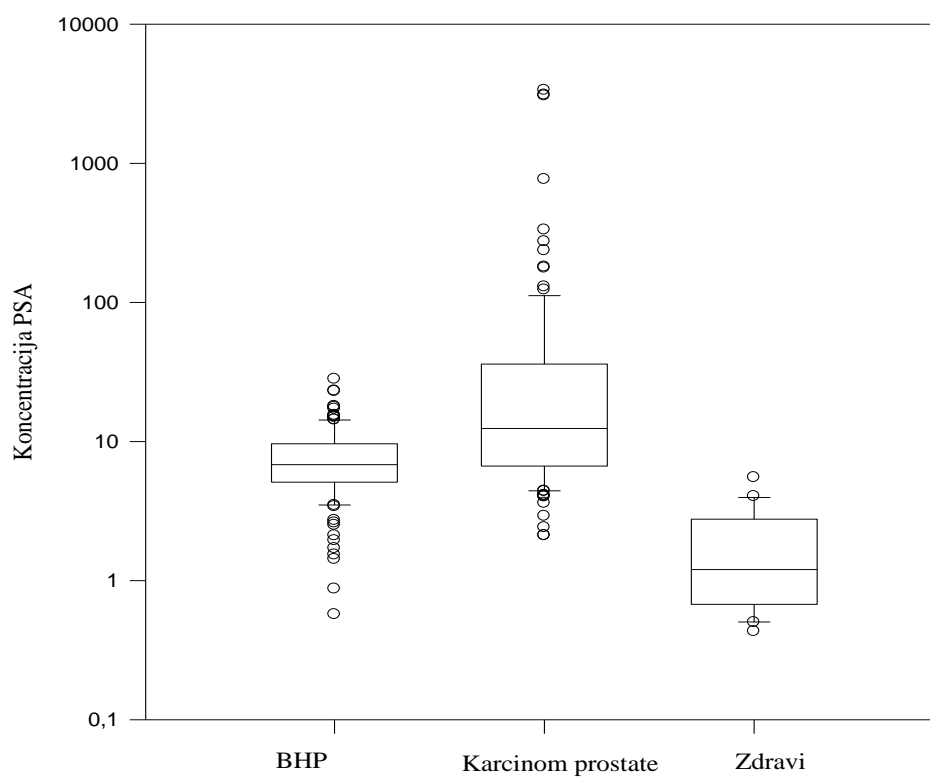
Serumske vrijednosti PSA statistički su se značajno razlikovale među ispitivanim skupinama (Tablica 5.3.; Slika 5.3.). Očekivano su najviše vrijednosti bile u skupini s karcinomom prostate, a najniže među zdravim ispitanicima.

Tablica 5.3. Deskriptivna statistika za PSA

Skupina	Medijan	Minimum	Maksimum	25 %	75 %	SD*
BHP	6,81	0,57	28	5,1	9,53	4,55
Karcinomi	12,4	2,1	3346	6,67	35,1	499,96
Zdravi	1,2	0,43	5,5	0,75	2,53	1,38

Stupnjevi slobode=2; $P < 0,001$ (Kruskal-Wallis test)

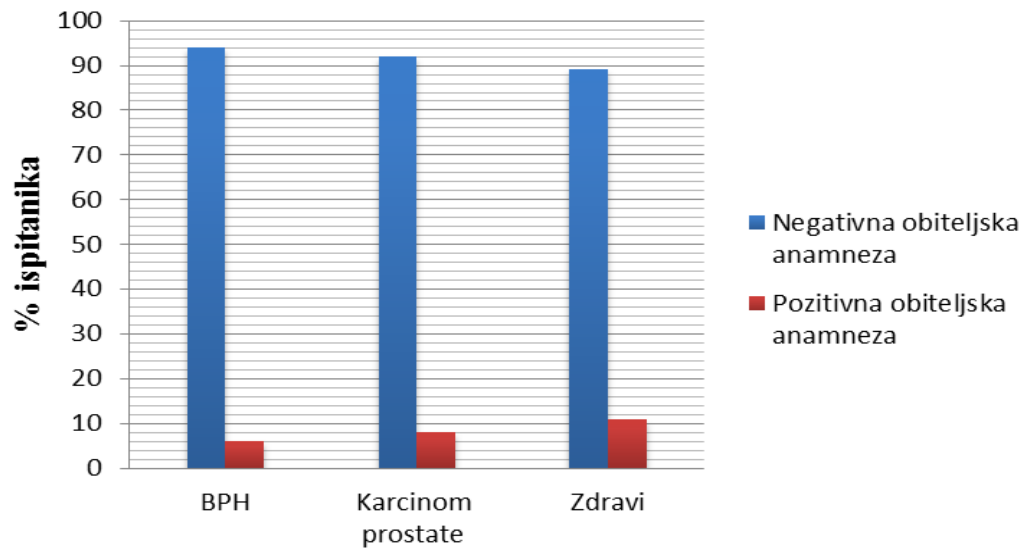
SD*-standardna devijacija



Slika 5.3. Logaritamski transformirane vrijednosti PSA u ispitivanim skupinama

5.1.4. Obiteljska anamneza karcinoma prostate ispitanika

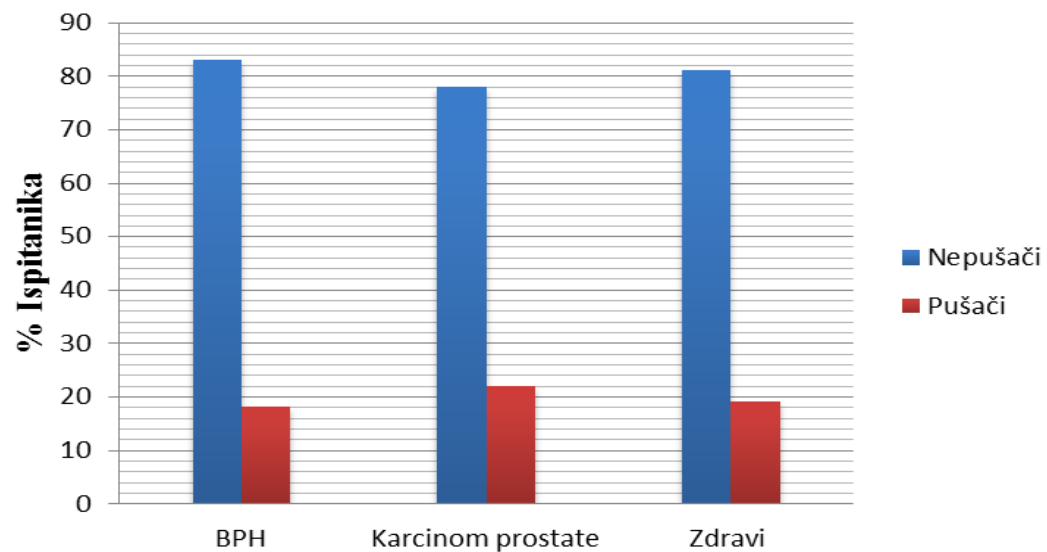
Pozitivna obiteljska anamneza karcinoma prostate bila je nisko zastupljena u sve tri skupine ispitanika ($P = 0,546$; χ^2 test) (Slika 5.4.).



Slika 5.4. Raspodjela ispitanika s obzirom na obiteljsku anamnezu karcinoma prostate

5.1.5. Status pušenja u ispitivanim skupinama

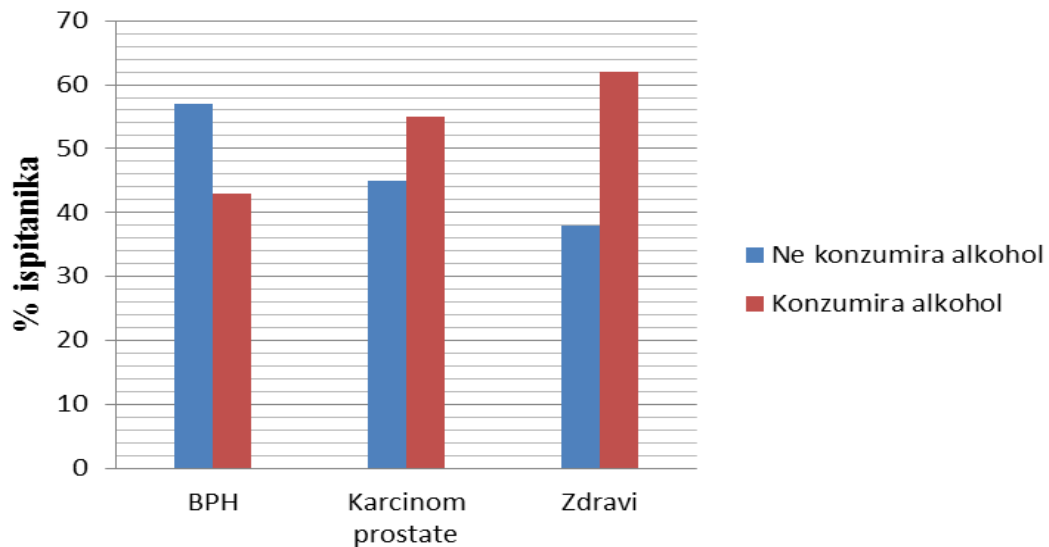
Nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu nepušača i pušača u ispitivanim skupinama ($P = 0,698$; χ^2 test) (Slika 5.5.).



Slika 5.5. Raspodjela ispitanika prema statusu pušenja

5.1.6. Konzumiranje alkohola u ispitivanim skupinama

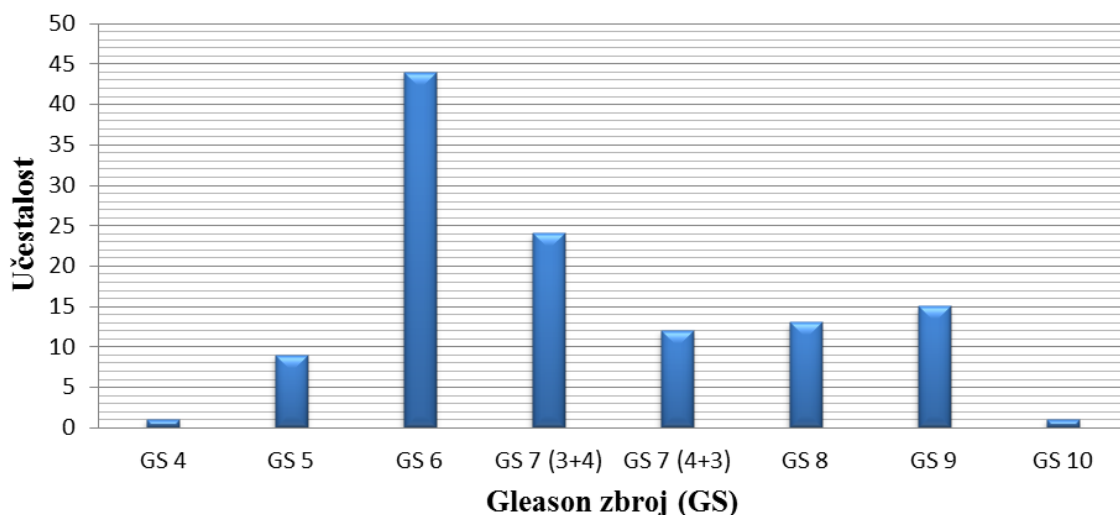
Nije bilo statistički značajne razlike među ispitivanim skupinama s obzirom na status konzumiranja alkohola ($P = 0,104$; χ^2 test) (Slika 5.6.).



Slika 5.6. Raspodjela ispitanika prema statusu konzumiranja alkohola

5.1.7. Vrijednosti Gleason zbroja kod bolesnika s karcinomom prostate

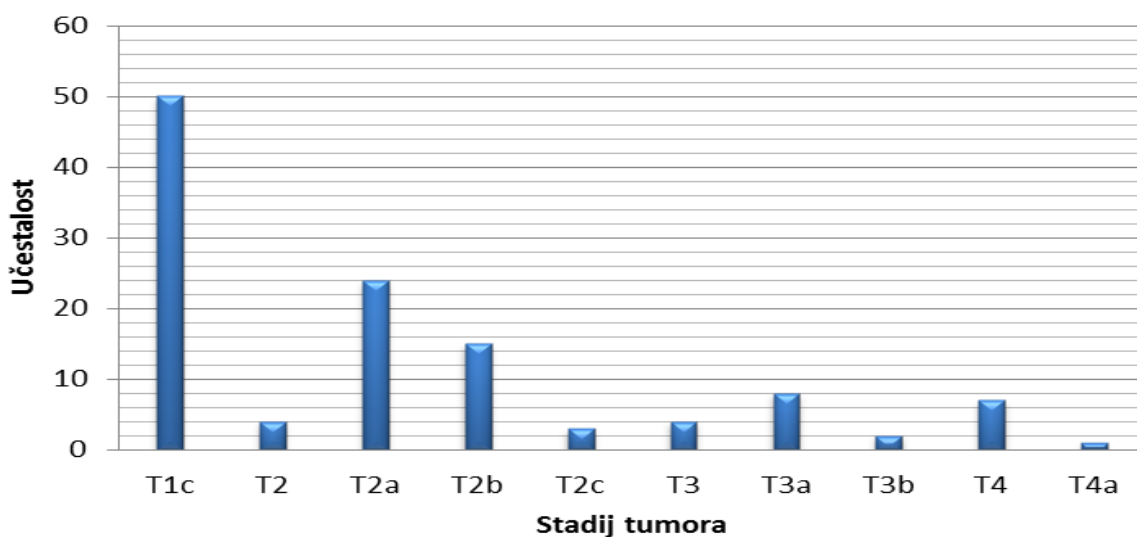
Slika 5.7. prikazuje vrijednosti GS-a kod bolesnika s karcinomom prostate. Dobro diferencirani karcinomi (GS 4 i 5) bili su prisutni samo u 9 % bolesnika, a loše diferencirani (GS 8-10) u čak 24 % bolesnika. Većina bolesnika (67,0 %) imala je srednje diferenciran karcinom s GS 6 ili 7.



Slika 5.7. Raspodjela bolesnika s karcinomom prostate prema Gleason zbroju

5.1.8. Stadiji tumora kod bolesnika s karcinomom prostate

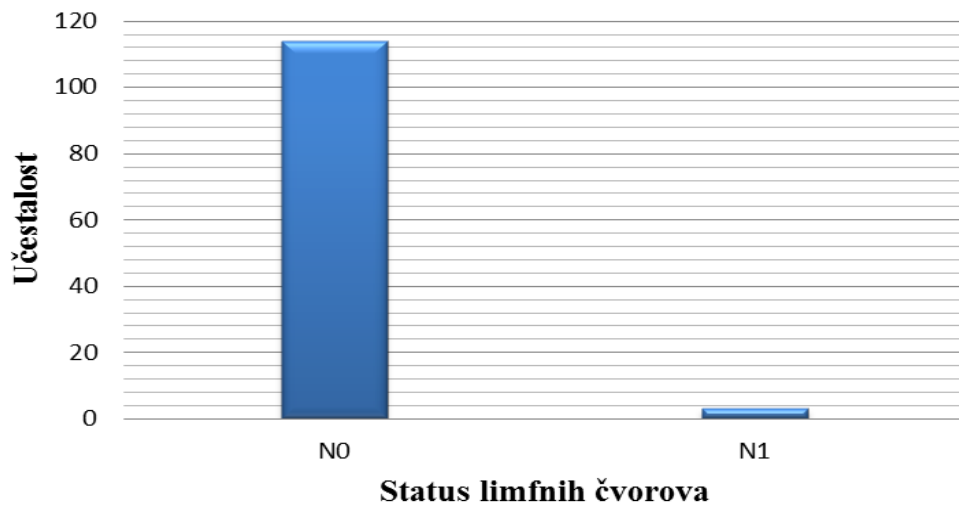
Raspodjela učestalosti bolesnika s karcinomom prostate prema stadiju tumora (T) prikazana je na Slici 5.8. Većina bolesnika imala je karcinom ograničen na prostatu (81 %) dok je kod 19 % bolesnika došlo do ekstrakapsularnog širenja karcinoma.



Slika 5.8. Raspodjela bolesnika s karcinomom prostate prema stadiju tumora

5.1.9. Status limfnih čvorova kod bolesnika s karcinomom prostate

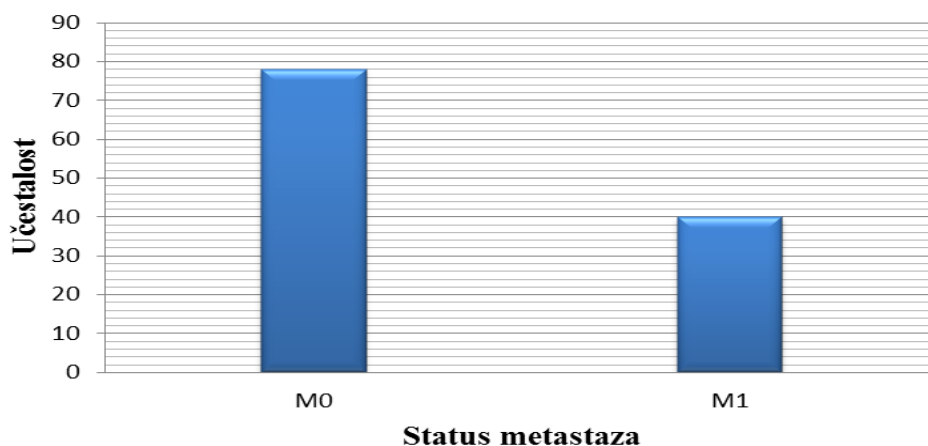
Metastaze u regionalnim čvorovima (N1) imalo je samo 3 % bolesnika s karcinomom prostate.



Slika 5.9. Raspodjela bolesnika s karcinomom prostate prema prisutnosti metastaza u regionalnim limfnim čvorovima

5.1.10. Status metastaza kod bolesnika s karcinomom prostate

Udaljene metastaze (M1) nađene su kod 34 % bolesnika s karcinomom prostate (slika 5.10.)



Slika 5.10. Raspodjela bolesnika s karcinomom prostate prema statusu udaljenih metastaza

5.2. Analiza polimorfizama u *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* genima

5.2.1 Polimorfizam *IL-1 β* gena

Za analizu frekvencije genotipova učinjena je analiza Hardy-Weinberg ravnoteže. Za razliku od skupina s karcinomom prostate - $\chi^2 = 0,29$ ($P = 0,589$) i BHP - $\chi^2 = 1,54$ ($P = 0,215$) skupina zdravih kontrola - $\chi^2 = 9,35$ ($P = 0,002$) nije bila u ravnoteži.

Tablica 5.4. Učestalost alela/genotipova *IL-1 β* + 3954 polimorfizma

Polimorfizam	Karcinom prostate N (%)	BHP N (%)	Zdravi N (%)	P*
C/C	43 (35,8)	51 (42,5)	25 (73,5)	
C/T	60 (50)	59 (49,2)	5 (14,7)	0,001 [†]
T/T	17 (14,2)	10 (8,3)	4 (11,8)	
C/T + T/T	77 (64,2)	69 (57,5)	9 (26,5)	< 0,001 [‡]
C alel	146 (60,8)	161 (67,1)	55 (80,9)	
T alel	94 (39,2)	79 (32,9)	13 (19,1)	0,008 [‡]

* χ^2 test; [†]-stupnjevi slobode=4; [‡] stupnjevi slobode=2

Utvrđena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova među kontrolnom skupinom, skupinom oboljelih od BHP-a i karcinoma prostate ($P = 0,001$). Bolesnici s karcinomom prostate i BHP-om imali su značajno veću učestalost alela T (39,2 % i 32,9 % vs. 19,1 %) uz statistički značajnu razliku ($P = 0,008$) (Tablica 5.4.).

Tablica 5.5. Omjer izgleda nastanka karcinoma prostate i BHP-a uslijed *IL-1 β* + 3954 polimorfizma

Polimorfizam	Karcinomi N (%)	BHP N (%)	OR (95%CI)	P
CC	43 (35,8)	51 (42,5)	1	
CT	60 (50)	59 (49,2)	1,206 (0,702-2,074)	0,498
TT	17 (14,2)	10 (8,3)	2,016 (0,836-4,862)	0,118
CT+TT	77 (64,2)	69 (57,5)	1,324 (0,787-2,226)	0,290
C alel	146 (60,8)	161 (67,1)	1	
T alel	94 (39,2)	79 (32,9)	1,312 (0,903-1,907)	0,154
	Karcinomi N (%)	Zdravi N (%)	OR (95%CI)	P
CC	43 (35,8)	25 (73,5)	1	
CT	60 (50,0)	5 (14,7)	6,977 (2,473-19,679)	< 0,001
TT	17 (14,2)	4 (11,8)	2,471 (0,747-8,167)	0,138
CT+TT	77 (64,2)	9 (26,5)	4,974 (2,129-11,619)	< 0,001
C alel	146 (60,8)	55 (80,9)	1	
T alel	94 (39,2)	13 (19,1)	2,724 (1,411-5,258)	0,003
	BHP N (%)	Zdravi N (%)	OR (95%CI)	P
CC	51 (42,5)	25 (73,5)	1	
CT	59 (49,2)	5 (14,7)	5,784 (2,063-16,214)	0,001
TT	10 (8,3)	4 (11,8)	1,225 (0,350-4,296)	0,751
CT+TT	69 (57,5)	9 (26,5)	3,758 (1,617-8,736)	0,002
C alel	161 (67,1)	55 (80,9)	1	
T alel	79 (32,9)	13 (19,1)	2,076 (1,071-4,023)	0,031

OR-omjer izgleda

Tablica 5.6. Raspodjela alela/genotipova u *IL-1 β* genu ovisno o Gleason zbroju, stadiju tumora i postojanju udaljenih metastaza

Polimorfizam	GS \leq7 N (%)	GS >7 N (%)	OR (95%CI)	P
CC	33 (36,7)	9 (32,1)	1	
CT	44 (48,9)	16 (57,1)	1,333 (0,524-3,39)	0,546
TT	13 (14,4)	3 (10,7)	0,846 (0,197-3,628)	0,822
CT+TT	57 (63,33)	19 (67,9)	1,222 (0,496-3,011)	0,663
C alel	110 (61,1)	34 (60,7)	1	
T alel	70 (38,9)	22 (39,3)	1,017 (0,55-1,879)	0,958
	T <3 N (%)	T \geq3 N (%)	OR (95%CI)	P
CC	34 (35,4)	8 (36,4)	1	
CT	48 (50)	11 (50)	0,974 (0,354-2,677)	0,959
TT	14 (14,6)	3 (13,6)	0,91 (0,210-3,944)	0,901
CT+TT	62 (64,6)	14 (63,6)	0,96 (0,365-2,517)	0,933
C alel	116 (60,4)	27 (61,4)	1	
T alel	76 (39,6)	17 (38,6)	0,961 (0,491-1,882)	0,908
	M0 N (%)	M1 N (%)	OR (95%CI)	P
CC	26 (33,3)	16 (40)	1	
CT	40 (51,3)	19 (47,5)	0,772 (0,337-1,767)	0,54
TT	12 (15,4)	5 (12,5)	0,677 (0,201-2,282)	0,529
CT+TT	52 (66,7)	24 (60)	0,75 (0,341-1,65)	0,475
C alel	92 (59)	51 (63,8)	1	
T alel	64 (41)	29 (36,2)	0,817 (0,469-1,426)	0,477

GS-Gleason zbroj; T-stadij tumora; M0-nema udaljenih metastaza; M1-udaljene metastaze; OR-omjer izgleda

Utvrđena je statistički značajna razlika s obzirom na rizik od nastanka karcinoma prostate uslijed *IL-1β* polimorfizma među zdravim ispitanicima u odnosu na skupinu s karcinomom prostate (raspodjela genotipova: $\chi^2 = 16,457$; $P < 0,001$; raspodjela alela: $\chi^2 = 8,531$; $P = 0,003$) te zdravih ispitanika u odnosu na BHP skupinu (raspodjela genotipova: $\chi^2 = 13,083$; $P = 0,001$; raspodjela alela: $\chi^2 = 4,18$, $P = 0,041$). Omjer izgleda nastanka karcinoma prostate i BHP uslijed *IL-1β* + 3954 polimorfizma prikazan je u Tablici 5.5. Učestalosti CT i TT genotipova u odnosu na CC genotip te T alela u odnosu na C alel je veća kod bolesnika s BHP i karcinomom prostate. Te dvije skupine imaju statistički veći omjer izgleda za nastanak karcinoma odnosno BHP-a u odnosu na kontrolnu, zdravu skupinu.

Nije nađena povezanost s nastankom karcinoma prostate usporedbom bolesnika s karcinomom prostate i bolesnika s BHP-om (raspodjela genotipova: $\chi^2 = 2,504$; $P = 0,286$), iako bolesnici s karcinomom prostate imaju veći udio TT genotipa (14,2 % vs 8,3 %) i T alela (39,2 % vs 32,9 %) u odnosu na BHP skupinu uz graničnu statističku značajnost ($\chi^2 = 1,771$; $P = 0,061$).

Povezanost *IL-1β* polimorfizma s kliničko-patološkim obilježjima bolesnika s karcinomom prostate prikazana je u Tablici 5.6. Bolesnici s karcinomom prostate podijeljeni su u dvije skupine ovisno o stupnju agresivnosti tumora. Stupanj agresivnosti tumora procjenjuje se prema GS, stadiju tumora (T) i postojanju udaljenih metastaza (M). Bolesnici s $GS > 7$, $T \geq 3$ i M1 svrstani su u skupinu s agresivnim oblikom karcinoma.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli alela/genotipova u *IL-1β* genu obzirom na GS, T stadij i status udaljenih metastaza.

5.2.2. Polimorfizam *IL-8* gena

Za analizu frekvencije genotipova učinjena je analiza Hardy-Weinberg ravnoteže. Sve tri skupine bile su u ravnoteži: karcinomi prostate - $\chi^2 = 0,57$ ($P = 0,452$), BHP - $\chi^2 = 0,66$ ($P = 0,416$), zdrave kontrole - $\chi^2 = 0,35$ ($P = 0,554$).

Tablica 5.7. Učestalost alela/genotipova *IL-8* -251 polimorfizma

Polimorfizam	Karcinom prostate N (%)	BHP N (%)	Zdravi N (%)	P*
TT	44 (36,7)	43 (35,8)	10 (28,6)	
TA	54 (45)	54 (45)	19 (54,3)	0,885 [†]
AA	22 (18,3)	23 (19,2)	6 (17,1)	
TA+AA	76 (63,3)	77 (64,2)	25 (71,4)	0,668 [‡]
T alel	142 (59,2)	140 (58,3)	39 (55,7)	
A alel	98 (40,8)	100 (41,7)	31 (44,3)	0,876 [‡]

* χ^2 test; [†]-stupnjevi slobode = 4; [‡]stupnjevi slobode = 2

Ispitivane skupine imale su sličnu raspodjelu alela/genotipova u *IL-8* genu (Tablica 5.7.).

Tablica 5.8. Omjer izgleda nastanka karcinoma prostate i BHP-a uslijed *IL-8* -251 polimorfizma

Polimorfizam	Karcinomi N (%)	BHP N (%)	OR (95%CI)	P
TT	44 (36,7)	43 (35,8)	1	
TA	54 (45)	54 (45)	0,977 (0,555-1,719)	0,936
AA	22 (18,3)	23 (19,2)	0,935 (0,455-1,92)	0,854
TA+AA	76 (63,3)	77 (64,2)	0,965 (0,570-1,633)	0,893
T alel	142 (59,2)	140 (58,3)	1	
A alel	98 (40,8)	100 (41,7)	0,966 (0,672-1,39)	0,853
	Karcinomi N (%)	Zdravi N (%)	OR (95%CI)	P
TT	44 (36,7)	10 (28,6)	1	
TA	54 (45)	19 (54,3)	0,646 (0,27-1,531)	0,321
AA	22 (18,3)	6 (17,1)	0,833 (0,268-2,591)	0,753
TA+AA	76 (63,3)	25 (71,4)	0,691 (0,304-1,572)	0,378
T alel	142 (59,2)	39 (55,7)	1	
A alel	98 (40,8)	31 (44,3)	0,868 (0,507-1,486)	0,606
	BHP N (%)	Zdravi N (%)	OR (95%CI)	P
TT	43 (35,8)	10 (28,6)	1	
TA	54 (45)	19 (54,3)	0,661 (0,278-1,568)	0,345
AA	23 (19,2)	6 (17,1)	0,891 (0,287-2,764)	0,842
TA+AA	77 (64,2)	25 (71,4)	0,716 (0,315-1,631)	0,427
T alel	140 (58,3)	39 (55,7)	1	
A alel	100 (41,7)	31 (44,3)	0,899 (0,525-1,537)	0,696

OR-omjer izgleda

Nije utvrđen povećan omjer izgleda nastanka karcinoma prostate ili BHP-a uslijed *IL-8* polimorfizma (Tablica 5.8.).

Tablica 5.9. Raspodjela alela/genotipova u *IL-8* genu ovisno o Gleason zbroju, stadiju tumora i postojanju udaljenih metastaza

Polimorfizam	GS ≤7 N (%)	GS >7 N (%)	OR (95%CI)	P
TT	32 (35,5)	11 (39,3)	1	
TA	43 (47,8)	10 (35,7)	0,676 (0,256-1,786)	0,43
AA	15 (16,7)	7 (25)	1,358 (0,439-4,198)	0,596
TA+AA	58 (64,4)	17 (60,7)	0,853 (0,356-2,041)	0,72
T alel	107 (59,4)	32 (57,1)	1	
A alel	73 (40,6)	24 (42,9)	1,099 (0,599-2,017)	0,76
	T <3 N (%)	T ≥3 N (%)	OR (95%CI)	P
TT	32 (33,3)	11 (50)	1	
TA	46 (47,9)	8 (36,4)	0,506 (0,183-1,398)	0,189
AA	18 (18,8)	3 (13,6)	0,484 (0,119-1,968)	0,311
TA+AA	64 (66,7)	11 (50)	0,5 (0,196-1,277)	0,147
T alel	110 (57,3)	30 (68,2)	1	
A alel	82 (42,7)	14 (31,8)	0,626 (0,312-1,255)	0,187
	M0 N (%)	M1 N (%)	OR (95%CI)	P
TT	28 (35,9)	15 (37,5)	1	
TA	36 (46,2)	18 (45)	0,933 (0,401-2,172)	0,873
AA	14 (17,9)	7 (17,5)	0,933 (0,31-2,812)	0,902
TA+AA	50 (64,1)	25 (62,5)	0,933 (0,424-2,056)	0,864
T alel	92 (60)	48 (60)	1	
A alel	64 (41)	32 (40)	0,958 (0,553-1,66)	0,879

GS-Gleason zbroj; T-stadij tumora; M0-nema udaljenih metastaza; M1-udaljene metastaze; OR-omjer izgleda

Nije utvrđen povećan omjer izgleda za nastanak agresivnijeg oblika karcinoma prostate uslijed *IL-8* -251 polimorfizma. Utvrđena je veća učestalost AA genotipa kod bolesnika s GS > 7 (25 % vs 16,7 %) (Tablica 5.9.), no navedena zastupljenost nema statističku značajnost ($\chi^2 = 1,569$; P = 0,456).

5.2.3 Polimorfizam *VEGF* gena

Za analizu frekvencije genotipova učinjena je analiza Hardy-Weinberg ravnoteže. Za razliku od skupina s karcinomom prostate - $\chi^2 = 1,64$ ($P = 0,201$) i zdravih kontrola - $\chi^2 = 1,16$ ($P = 0,281$) BHP skupina - $\chi^2 = 4,61$ ($P = 0,032$) nije bila u ravnoteži.

Tablica 5.10. Učestalost alela/genotipova *VEGF* +405 polimorfizma

Polimorfizam	Karcinom prostate N (%)	BHP N (%)	Zdravi N (%)	P*
GG	53 (44,2)	44 (36,7)	13 (37,1)	
GC	58 (48,3)	66 (55)	19 (54,3)	0,818 [†]
CC	9 (7,5)	10 (8,3)	3 (8,6)	
GC+CC	67 (55,8)	76 (63,3)	22 (62,9)	0,462 [‡]
G alel	164 (68,3)	154 (64,2)	45 (64,3)	
C alel	76 (31,7)	86 (35,8)	25 (35,7)	0,597 [‡]

* χ^2 test; [†]-stupnjevi slobode = 4; [‡]stupnjevi slobode = 2

Ispitivane skupine imale su sličnu raspodjelu alela/genotipova u *VEGF* genu (Tablica 5.10.).

Tablica 5.11. Omjer izgleda nastanka karcinoma prostate i BHP-a uslijed *VEGF* +405 polimorfizma

Polimorfizam	Karcinomi N (%)	BHP N (%)	OR (95%CI)	P
GG	53 (44,2)	44 (36,7)	1	
GC	58 (48,3)	66 (55)	0,730 (0,428-1,243)	0,246
CC	9 (7,5)	10 (8,3)	0,747 (0,279-2,001)	0,562
GC+CC	67 (55,8)	76 (63,3)	0,732 (0,436-1,228)	0,237
G alel	164 (68,3)	154 (64,2)	1	
C alel	76 (31,7)	86 (35,8)	0,83 (0,568-1,212)	0,335
	Karcinomi N (%)	Zdravi N (%)	OR (95%CI)	P
GG	53 (44,2)	13 (37,1)	1	
GC	58 (48,3)	19 (54,3)	0,749 (0,337-1,663)	0,477
CC	9 (7,5)	3 (8,6)	0,736 (0,174-3,108)	0,676
GC+CC	67 (55,8)	22 (62,9)	0,747 (0,344-1,621)	0,46
G alel	164 (68,3)	45 (64,3)	1	
C alel	76 (31,7)	25 (35,7)	0,834 (0,477-1,46)	0,525
	BHP N (%)	Zdravi N (%)	OR (95%CI)	P
GG	44 (36,7)	13 (37,1)	1	
GC	66 (55)	19 (54,3)	1,026 (0,46-2,289)	0,949
CC	10 (8,3)	3 (8,6)	0,985 (0,235-4,119)	0,983
GC+CC	76 (63,3)	22 (62,9)	1,021 (0,468-2,226)	0,959
G alel	154 (64,2)	45 (64,3)	1	
C alel	86 (35,8)	25 (35,7)	1,005 (0,577-1,752)	0,985

OR-omjer izgleda

Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli alela/genotipova među skupinama, niti povećan omjer izgleda za nastanak karcinoma prostate ili BHP-a uslijed *VEGF* polimorfizma (Tablica 5.11.).

Tablica 5.12. Raspodjela alela/genotipova u *VEGF* genu ovisno o Gleason zbroju, stadiju tumora i postojanju udaljenih metastaza

Polimorfizam	GS ≤ 7 N (%)	GS > 7 N (%)	OR (95 %CI)	P
GG	41 (45,6)	12 (42,8)	1	
GC	42 (46,7)	15 (53,6)	0,488 (0,054-4,369)	0,521
CC	7 (7,8)	1 (3,6)	1,22 (0,510-2,92)	0,655
GC+CC	49 (54,4)	16 (57,2)	0,965 (0,503-1,851)	0,915
G alel	124 (68,9)	39 (69,6)	1	
C alel	56 (31,1)	17 (30,4)	1,116 (0,474-2,625)	0,802
	T<3 N (%)	T≥3 N (%)	OR (95%CI)	P
GG	43 (44,7)	9 (40,9)	1	
GC	46 (47,9)	12 (54,5)	1,246 (0,478-3,252)	0,653
CC	7 (7)	1 (4,5)	0,682 (0,075-6,253)	0,735
GC+CC	53 (54,9)	13 (59)	1,172 (0,458-3,001)	0,741
G alel	132 (68,7)	30 (68,1)	1	
C alel	60 (31,3)	14 (31,8)	1,027 (0,508-2,076)	0,942
	M0 N (%)	M1 N (%)	OR (95%CI)	P
GG	34 (43,6)	18 (45)	1	
GC	40 (51,3)	18 (45)	0,85 (0,383-1,887)	0,69
CC	4 (5,1)	4 (10)	1,889 (0,422-8,458)	0,406
GC+CC	44 (56,4)	22 (55)	0,944 (0,439-2,034)	0,884
G alel	108 (69,2)	54 (67,5)	1	
C alel	48 (30,7)	26 (32,5)	1,083 (0,607-1,932)	0,786

GS-Gleason zbroj; T-stadij tumora; M0-nema udaljenih metastaza; M1-udaljene metastaze; OR-omjer izgleda

Nije utvrđen povećan omjer izgleda za nastanak agresivnijeg oblika karcinoma prostate uslijed *VEGF* +405 polimorfizma (tablica 5.12.).

5.3. Analiza međudjelovanja polimorfizama *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* gena s etiološkim i kliničko-patološkim odlikama skupine

Analiza međudjelovanja polimorfizama *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* gena s etiološkim i kliničko-patološkim odlikama skupine na nastanak karcinoma prostate kao i na nastanak agresivnijeg oblika karcinoma, učinjena je usporedbom bolesnika s karcinomom prostate i bolesnika s BHP-om. S obzirom na mali broj, analizom nisu obuhvaćeni zdravi ispitanici.

5.3.1. Međudjelovanje polimorfizama *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* gena s obiteljskom anamnezom

Analiza međudjelovanja polimorfizama s obiteljskom anamnezom učinjena je usporedbom mutiranih genotipova među skupinama s BHP-om i karcinomom prostate s genotipom divljeg tipa ispitanika s negativnom obiteljskom anamnezom.

Tablica 5.13. Raspodjela genotipova u *IL-1 β* genu ovisno o obiteljskoj anamnezi karcinoma prostate

	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95%CI)	P
IL-1β				
Negativna obiteljska anamneza				
CC	45 (39,8)	40 (36,4)	1	
CT	58 (51,3)	54 (49,1)	1,047 (0,596-1,842)	0,872
TT	10 (8,8)	16 (14,5)	1,8 (0,734-4,417)	0,199
 Pozitivna obiteljska anamneza				
CC	6 (85,7)	3 (30)	0,563 (0,132-2,398)	0,437
CT	1 (14,3)	6 (60)	6,75 (0,779-58,499)	0,083
TT	0	1 (10)	3,37 (0,133-85,079)	0,461

OR-omjer izgleda

Nije nađena statistički značajna povezanost pozitivne obiteljske anamneze s nastankom karcinoma prostate. Zapaža se povećana učestalost CT genotipa u odnosu na CC genotip kod bolesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom i karcinomom prostate (P=0,083), iako nije dostignuta statistička značajnost (tablica 5.13.). Analizom omjera izgleda

prema raspodjeli alela dobiven je skoro 9 puta veći omjer izgleda nastanka karcinoma prostate za bolesnike koji nose T alel i imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu ($P = 0,041$) (Tablica 5.14).

Tablica 5.14. Raspodjela alela *IL-1 β* gena ovisno o obiteljskoj anamnezi karcinoma prostate

	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95%CI)	P
IL-1β				
Negativna obiteljska anamneza				
C alel	148 (65,5)	134 (60,9)	1	
T alel	78 (34,5)	86 (39,1)	1,218 (0,828-1,79)	0,316
Pozitivna obiteljska anamneza				
C alel	13 (92,9)	12 (60)	1,019 (0,450-2,312)	0,963
T alel	1 (7,1)	8 (40)	8,836 (1,091-71,579)	0,041

OR-omjer izgleda

Tablica 5.15. Raspodjela genotipova u *IL-8* genu ovisno o obiteljskoj anamnezi karcinoma prostate

	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95%CI)	P
IL-8				
Negativna obiteljska anamneza				
TT	41 (36,3)	43 (39,1)	1	
TA	52 (46)	49 (44,5)	0,899 (0,504-1,603)	0,717
AA	20 (17,7)	18 (16,4)	0,858 (0,399-1,848)	0,696
Pozitivna obiteljska anamneza				
TT	2 (28,6)	1 (10)	0,477 (0,042-5,461)	0,552
TA	2 (28,6)	5 (50)	2,384 (0,438-12,98)	0,315
AA	3 (42,8)	4 (40)	1,271 (0,268-6,031)	0,762

OR-omjer izgleda

Nije nađena statistički značajna povezanost pozitivne obiteljske anamneze s nastankom karcinoma prostate, iako je TA genotip zastupljeniji u bolesnika s karcinomom

prostate i pozitivnom obiteljskom anamnezom u odnosu na bolesnike s BHP-om i pozitivnom obiteljskom anamnezom (Tablica 5.15.).

Tablica 5.16. Raspodjela genotipova u *VEGF* genu ovisno obiteljskoj anamnezi bolesnika s karcinomom prostate

	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95%CI)	P
VEGF				
Negativna obiteljska anamneza				
GG	43 (38,1)	49 (44,5)	1	
GC	60 (53,1)	52 (47,3)	0,761 (0,437-1,322)	0,332
CC	10 (8,8)	9 (8,2)	0,79 (0,294-2,124)	0,64
Pozitivna obiteljska anamneza				
GG	1 (14,3)	4 (40)	3,51 (0,378-32,621)	0,27
GC	6 (85,7)	6 (60)	0,878 (0,263-2,924)	0,832
CC	0	0	-	-

OR-omjer izgleda

Nije nađena statistički značajna povezanost pozitivne obiteljske anamneze s nastankom karcinoma prostate. Niti jedan ispitanik nije imao polimorfni CC genotip, dok je učestalost GC genotipa bila veća kod bolesnika s BHP-om s pozitivnom obiteljskom anamnezom (Tablica 5.16.).

5.3.2. Međudjelovanje polimorfizama *IL-1β*, *IL-8* i *VEGF* gena s indeksom tjelesne težine

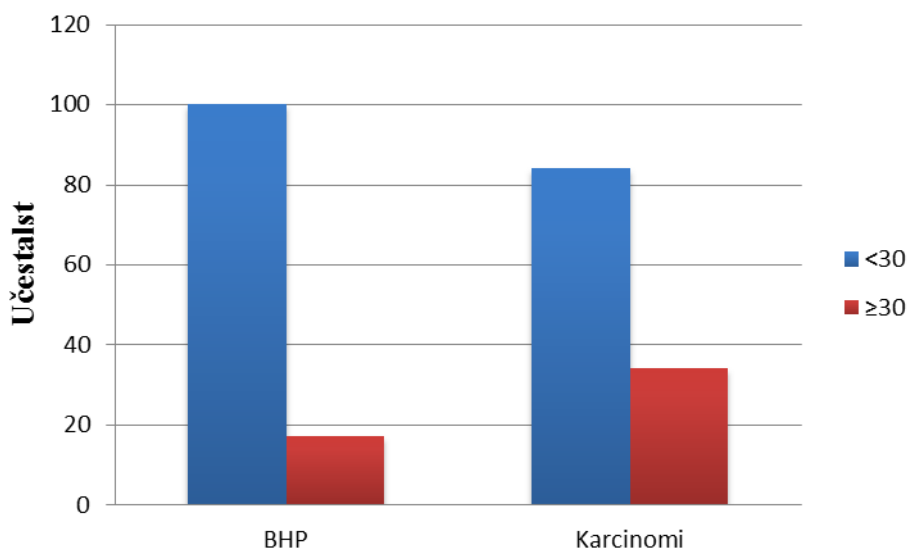
Prema indeksu tjelesne težine (BMI), ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: pretili s $BMI \geq 30$ i ostale s $BMI < 30$.

Tablica 5.17. Raspodjela ispitanika prema BMI

BMI	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95 %CI)	P
<30	100 (85,5)	84 (71,2)	1	
≥30	17 (14,5)	34 (28,8)	2,381 (1,242-4,563)	0,009

OR-omjer izgleda

Udio ispitanika s BMI ≥ 30 bio je statistički značajno veći u skupini s karcinomom prostate (Tablica 5.17., Slika 5.14.).



Slika 5.14. Raspodjela ispitanika prema indeksu tjelesne težine

Tablica 5.18. Raspodjela genotipova u *IL-1 β* genu ovisno o indeksu tjelesne težine

	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95%CI)	P
IL-1β				
BMI < 30				
CC	39 (39)	30 (35,7)	1	
CT	52 (52)	43 (51,2)	1,075 (0,576-2,007)	0,82
TT	9 (9)	11 (13,1)	1,589 (0,584-4,325)	0,365
BMI ≥ 30				
CC	10 (58,8)	13 (38,2)	1,69 (0,652-4,378)	0,28
CT	6 (35,3)	17 (50)	3,683 (1,295-10,477)	0,014
TT	1 (5,9)	4 (11,8)	5,2 (0,552-48,965)	0,15

OR-omjer izgleda

Analizom međudjelovanja polimorfizma *IL-1 β* gena i pretilosti na rizik nastanka karcinoma prostate vidljiva je statistički značajno veća učestalost CT genotipa kod pretilih bolesnika s karcinomom prostate (Tablica 5.18.). U multivarijantnoj analizi (Tablica 5.19.) pretilost uz *IL-1 β* raspodjelu genotipa ostaje značajan nezavisni čimbenik rizika za karcinom

prostate u odnosu na BHP (OR 2,447; 95 % CI 1,271 - 4,711), a rizik je veći nego u univarijantnoj analizi (OR 2,38; 95 % CI (1,24 -4 ,56) (Tablica 5.17.).

Tablica 5.19. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodness of fit test) za karcinom prostate kao zavisne varijable i BHP kao kontrolne skupine, s BMI \geq 30 i *IL-1 β* polimorfizmom kao kovarijatama

Kovarijate	P	Exp (B)	95 % CI
BMI \geq 30	0,007	2,447	1,27-4,711
IL-1 β CC			
IL-1 β CT	0,2	0,55	0,22-1,372
IL-1 β TT	0,405	0,685	0,282-1,669

Tablica 5.20. Raspodjela genotipova u *IL-8* genu ovisno o indeksu tjelesne težine

	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95 %CI)	P
IL-8				
BMI < 30				
TT	34 (34)	29 (34,5)	1	
TA	45 (45)	40 (47,6)	1,042 (0,542-2,003)	0,901
AA	21 (21)	15 (17,9)	0,837 (0,366-1,915)	0,674
BMI \geq 30				
TT	8 (47)	13 (38,2)	1,905 (0,693-5,234)	0,211
TA	7 (41,2)	14 (41,2)	2,345 (0,834-6,593)	0,106
AA	2 (11,8)	7 (20,6)	4,103 (0,79-21,318)	0,093

OR-omjer izgleda

Nije nađen povećan omjer izgleda za nastanak karcinoma prostate uslijed međudjelovanja polimorfizma *IL-8* gena i pretilosti. Iako nije dostignuta statistička značajnost, zapaža se povećana učestalost AA genotipa kod bolesnika s karcinom prostate i BMI \geq 30 (P = 0,093) (Tablica 5.20.). U multivarijantnoj analizi (Tablica 5.21.) pretilost uz *IL-8* raspodjelu genotipa ostaje značajan nezavisni čimbenik rizika za karcinom prostate u

odnosu na BHP (OR 2,392; 95 % CI 1,271 - 4,711), no taj je rizik ipak nešto veći nego u univarijantnoj analizi (OR 2,38; 95 % CI (1,24 - 4,56) (Tablica 5.17.).

Tablica 5.21. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodness of fit test) za karcinom prostate kao zavisne varijable i BHP kao kontrolne skupine, s BMI \geq 30 i IL-8 polimorfizmom kao kovarijatama

Kovarijate	P	Exp (B)	95%CI
BMI\geq30	0,009	2,392	1,246-4,59
IL-8 TT			
IL-8 TA	0,996	1,002	0,480-2,092
IL-8 AA	0,811	1,09	0,537-2,212

Tablica 5.22. Raspodjela genotipova u *VEGF* genu ovisno o indeksu tjelesne težine

	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95 % CI)	P
VEGF				
BMI < 30				
GG	39 (39)	39 (46,4)	1	
GC	53 (53)	40 (47,6)	0,755 (0,412-1,381)	0,362
CC	8 (8)	5 (6)	0,625 (0,188-2,08)	0,445
BMI \geq 30				
GG	4 (23,5)	13 (38,2)	3,250 (0,974-10,848)	0,055
GC	11 (64,7)	18 (52,9)	1,636 (0,684-3,912)	0,268
CC	2 (11,8)	3 (8,8)	1,5 (0,237-9,477)	0,666

OR-omjer izgleda

Nije utvrđen povećan omjer izgleda za nastanak karcinoma prostate kod pretilih pacijenata nositelja polimorfnog *VEGF* genotipa (Tablica 5.22.). Iako nije dostignuta statistička značajnost, zapaža se povećana učestalost GG genotipa kod bolesnika s karcinomom prostate i BMI \geq 30 (P = 0,055) (Tablica 5.22.).

5.3.3. Međudjelovanje polimorfizama *IL-1β*, *IL-8* i *VEGF* gena sa statusom pušenja

S obzirom na status pušenja, ispitanici s BHP-om i karcinomom prostate podijeljeni su u dvije skupine: nepušače i pušače. Analiza međudjelovanja polimorfizama i statusa pušenja učinjena je usporedbom divljeg genotipa ispitanika nepušača (CC za *IL-1β*, TT za *IL-8* i GG za *VEGF*) s mutiranim genotipovima ispitanika pušača.

Tablica 5.23. Raspodjela genotipova u *IL-1β* genu s obzirom na status pušenja

	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95 % CI)	P
IL-1β				
Nepušači				
CC	35 (39,8)	33 (35,5)	1	
CT	46 (52,3)	48 (51,6)	1,107 (0,593-2,066)	0,75
TT	7 (7,9)	12 (12,9)	1,818 (0,640-5,177)	0,263
Pušači				
CC	16 (50)	10 (38,5)	0,663 (0,264-1,667)	0,382
CT	13 (40,6)	12 (46,2)	0,979 (0,391-2,45)	0,964
TT	3 (9,4)	4 (15,4)	1,414 (0,294-6,802)	0,665

OR-omjer izgleda

Raspodjela genotipova *IL-1β* gena s obzirom na status pušenja bila je podjednaka među skupinama te nije nađena povezanost s nastankom karcinoma (Tablica 5.23.).

Analizom udruženog učinka polimorfizma *IL-8* gena s pušenjem pokazalo se da su pušači nositelji AA genotipa i A alela zastupljeniji u ispitanika s BHP-om, premda uz graničnu statističku značajnost (P = 0,057 za AA genotip; P = 0,057 za alel) (Tablice 5.24. i 5.25.).

Analiza međudjelovanja polimorfizma *VEGF* gena i navike pušenja s izgledom nastanka karcinoma prostate nije pokazala razliku u raspodjeli genotipova među skupinama (Tablica 5.26.)

Tablica 5.24. Raspodjela genotipova u *IL-8* genu s obzirom na status pušenja

	BHP N (%)	Karcinom N (%)	OR (95 % CI)	P
IL-8				
Nepušači				
TT	34 (38,6)	32 (34,4)	1	
TA	41 (46,6)	41 (44,1)	1,062 (0,556-2,032)	0,855
AA	13 (14,8)	20 (21,5)	1,635 (0,699-3,82)	0,257
Pušači				
TT	9 (28,1)	11 (42,3)	1,299 (0,476-3,546)	0,61
TA	13 (40,6)	13 (50)	1,062 (0,429-2,634)	0,896
AA	10 (31,3)	2 (7,7)	0,212 (0,043-1,045)	0,057

OR-omjer izgleda

Tablica 5.25. Raspodjela alela u *IL-8* genu s obzirom na status pušenja

	BHP N (%)	Karcinom N (%)	OR (95 % CI)	P
IL-8				
Nepušači				
T alel	109 (61,9)	105 (56,4)	1	
A alel	67 (38,1)	81 (43,6)	1,255 (0,824-1,91)	0,289
Pušači				
T alel	31 (48,4)	35 (67,3)	1,172 (0,674-2,037)	0,573
A alel	33 (51,6)	17 (32,7)	0,535 (0,281-1,018)	0,057

OR-omjer izgleda

Tablica 5.26. Raspodjela genotipova u *VEGF* genu s obzirom na status pušenja

	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95 % CI)	P
VEGF				
Nepušači				
GG	30 (34,1)	42 (45,2)	1	
GC	50 (56,8)	44 (47,3)	0,629 (0,338-1,168)	0,142
CC	8 (9,1)	7 (7,5)	0,625 (0,204-1,910)	0,410
Pušači				
GG	14 (43,8)	10 (38,5)	0,510 (0,200-1,302)	0,159
GC	16 (50,0)	14 (53,8)	0,625 (0,265-1,472)	0,282
CC	2 (6,2)	2 (7,7)	0,714 (0,095-5,359)	0,743

OR-omjer izgleda

5.3.4. Međudjelovanje polimorfizama *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* gena s konzumiranjem alkohola

Iako nije dostignuta statistička značajnost usporedbom zastupljenosti ispitanika s BHP-om i bolesnika s karcinomom prostate i statusa konzumiranja alkohola, ispitanici koji konzumiraju alkohol bili su zastupljeniji u skupini s karcinomom prostate u odnosu na skupinu s BHP-om (55,0 % vs 43,3 %) i imali su skoro 1,6 puta veći rizik za nastanak karcinoma prostate ($P = 0,071$) (Tablica 5.27.).

U multivarijatnoj analizi konzumiranje alkohola uz *IL-1 β* raspodjelu genotipa ostaje čimbenik rizika za karcinom prostate u odnosu na BHP (OR 1,60; 95 % CI 0,96 - 2,66) s graničnom značajnošću, međutim taj je rizik manji nego u univarijatnoj analizi (OR 1,577; 95 % CI 0,945 - 2,633) (Tablica 5.28.).

Tablica 5.27. Raspodjela ispitanika s obzirom na konzumiranje alkohola

Alkohol	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95%CI)	P
Ne konzumira	68 (56,7)	54 (45,0)	1	
Konzumira	52 (43,3)	66 (55,0)	1,598 (0,96-2,661)	0,071

OR-omjer izgleda

Tablica 5.28. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodness of fit test) za karcinom prostate kao zavisne varijable i BHP kao kontrolne skupine s konzumiranjem alkohola i *IL-1 β* polimorfizmom kao kovarijatama (N = 239)

Kovarijate	P	Exp (B)	95 % CI
Konzumira alkohol	0,081	1,577	0,945-2,633
IL-1 β CC			
IL-1 β CT	0,135	0,509	0,21-1,235
IL-1 β TT	0,268	0,613	0,258-1,457

Tablica 5.29. Raspodjela genotipova u *IL-8* genu s obzirom na konzumiranje alkohola

	BHP N (%)	Karcinomi N (%)	OR (95 % CI)	P
IL-8				
Ne konzumira alkohol				
TT	23 (33,8)	16 (29,6)	1	
TA	31 (45,6)	28 (51,9)	1,298 (0,573-2,94)	0,531
AA	14 (20,6)	10 (18,5)	1,027 (0,366-2,883)	0,96
Konzumira alkohol				
TT	20 (38,5)	27 (41,5)	1,941 (0,82-4,591)	0,131
TA	23 (44,2)	26 (40)	1,625 (0,695-3,801)	0,263
AA	9 (17,3)	12 (18,5)	1,917 (0,655-5,612)	0,235

OR-omjer izgleda

Tablica 5.30. Raspodjela genotipova u *VEGF* genu s obzirom na konzumiranje alkohola

	BHP N (%)	Karcinom N (%)	OR (95 % CI)	P
VEGF				
Ne konzumira alkohol				
GG	28 (41,2)	25 (46,3)	1	
GC	34 (50)	25 (46,3)	0,823 (0,39-1,738)	0,61
CC	6 (8,8)	4 (7,4)	0,747 (0,189-2,954)	0,677
Konzumira alkohol				
GG	16 (30,8)	27 (41,5)	1,89 (0,832-4,293)	0,128
GC	32 (61,5)	33 (50,8)	1,155 (0,559-2,388)	0,697
CC	4 (7,7)	5 (7,7)	1,400 (0,338-5,799)	0,643

OR-omjer izgleda

Analiza međudjelovanja polimorfizama *IL-8* i *VEGF* gena i konzumiranja alkohola s izgledom nastanka karcinoma prostate među bolesnicima s BHP-om i bolesnicima s karcinomom prostate nije pokazala razliku u raspodjeli genotipova među skupinama (Tablice 5.29. - 5.30.).

5.3.5. Međudjelovanje polimorfizama *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* gena sa serumskim koncentracijama PSA

S obzirom na to da je PSA antiangiogeni čimbenik, učinjena je analiza međudjelovanja polimorfizama *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* gena sa serumskim koncentracijama PSA.

Razlike u PSA vrijednostima među ispitanicima s karcinomom prostate s obzirom na $GS > 7$, $T \geq 3$ i M1 prikazane su u Tablici 5.31..

Postoji statistički značajna razlika u PSA vrijednostima kod ispitanika s karcinomom prostate s obzirom na $GS > 7$ ($P < 0,001$), zatim s obzirom na $T \geq 3$ ($P = 0,050$) i s obzirom na prisutnost udaljenih metastaza ($P < 0,001$).

Tablica 5.31. Razlike u PSA vrijednostima među ispitanicima s karcinomom prostate s obzirom na GS > 7, T ≥ 3 i M1 (Mann-Whitney test)

	PSA	z	P
GS>7	36 (2,1-3346)	-4,469	<0,001
GS≤7	10,4 (2,4-331,5)		
T≥3	29,2 (2,1-3097)	-1,959	0,05
T<3	12,18 (2,4-3346)		
M1	41 (4,1-3346)	-6,006	<0,001
M0	8,28 (2,1-236)		

GS-Gleason zbroj; T-stadij tumora; M0-nema udaljenih metastaza; M1-udaljene metastaze;

Tablica 5.32. Multivarijatna statistika za PSA kao zavisnu varijablu i polimorfizme za *IL-1β*, *IL-8* i *VEGF* kao kovarijate u bolesnika s karcinomom prostate (N = 120)

Kovarijate	B	Beta	t	95 % CI za B	P
IL-1β	-27,38	-0,05	-0,773	-97,119-42,359	0,44
VEGF	-39,544	-0,068	-1,05	-113,731-34,644	0,295
IL-8	-3,417	-0,007	-0,106	-66,680-59,847	0,915

Tablica 5.32. prikazuje multivarijatnu statistiku za PSA kao zavisnu varijablu i polimorfizme za *IL-1β*, *IL-8* i *VEGF* kao kovarijate u bolesnika s karcinomom prostate. Nije nađen utjecaj polimorfnih genotipova *IL-1β*, *IL-8* i *VEGF* gena na visoke koncentracije PSA (mjerenje prije bilo kakvog terapijskog postupka).

Tablica 5.33. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodness of fit test) za $GS > 7$ kao zavisnu varijablu s vrijednostima PSA i *IL-1 β* polimorfizmima kao kovarijatama (N = 120)

Kovarijate	<i>P</i>	Exp (B)	95 % CI
PSA*	0,004	1,015	1,005-1,025
IL-1 β CC			
IL-1 β CT	0,985	1,01	0,353-2,891
IL-1 β TT	0,986	1,013	0,226-4,538

**P* = 0,003; Exp (B) = 1,015; 95 % CI = 1,005 - 1,025 - univarijatna analiza

Veće koncentracije PSA ostaju nezavisan čimbenik rizika za ispitanike s karcinomom prostate s $GS > 7$ uz *IL-1 β* polimorfizme kao dodane kovarijate (OR 1,015; 95 % CI 1,005 - 1,025) (Tablica 5.33.).

Tablica 5.34. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodness of fit test) za $GS > 7$ kao zavisnu varijablu s vrijednostima PSA i *IL-8* polimorfizmima kao kovarijatama (N = 120)

Kovarijate	<i>P</i>	Exp (B)	95 % CI
PSA*	0,002	1,015	1,006-1,025
IL-8 TT			
IL-8 TA	0,2	0,472	0,150-1,487
IL-8 AA	0,414	1,653	0,495-5,516

**P* = 0,003; Exp (B) = 1,015; 95 % CI = 1,005 - 1,025 - univarijatna analiza

Veće koncentracije PSA ostaju nezavisan čimbenik rizika za ispitanike s karcinomom prostate s $GS > 7$ uz *IL-8* polimorfizme kao dodane kovarijate (OR 1,015; 95 % CI 1,006 - 1,025) (Tablica 5.34.).

Tablica 5.35. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodness of fit test) za $GS > 7$ kao zavisnu varijablu s vrijednostima PSA i *VEGF* polimorfizmima kao kovarijatama (N = 120)

Kovarijate	<i>P</i>	Exp (B)	95%CI
PSA*	0,003	1,015	1,005-1,025
VEGF GG			
VEGF GC	0,218	1,905	0,683-5,313
VEGF CC	0,897	0,862	0,09-8,206

**P* = 0,003; Exp (B) = 1,015; 95 % CI = 1,005 - 1,025 - univarijatna analiza

Veće koncentracije PSA ostaju nezavisan čimbenik rizika za ispitanike s karcinomom prostate s $GS > 7$ uz *VEGF* polimorfizme kao dodane kovarijate (OR 1,015; 95 % CI 1,005 - 1,025) (Tablica 5.35.).

Tablica 5.36. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodness of fit test) za $T \geq 3$ kao zavisnu varijablu s vrijednostima PSA i *IL-1 β* polimorfizmima kao kovarijatama (N = 120)

Kovarijate	<i>P</i>	Exp (B)	95%CI
PSA*	0,049	1,001	1,000-1,002
IL-1 β CC			
IL-1 β CT	0,896	1,072	0,374-3,074
IL-1 β TT	0,904	1,097	0,245-4,9

**P* = 0,001; Exp (B) = 1,001; 95 % CI = 1,001 - 1,002 - univarijatna analiza

Veće koncentracije PSA ostaju nezavisan čimbenik rizika za ispitanike s karcinomom prostate s $T \geq 3$ uz *IL-1 β* polimorfizme kao dodane kovarijate (OR 1,001; 95 % CI 1,001 - 1,002) (Tablica 5.36.).

Tablica 5.37. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodnes of fit test) za $T \geq 3$ kao zavisnu varijablu s vrijednostima PSA i *IL-8* polimorfizmima kao kovarijatama (N = 120)

Kovarijate	<i>P</i>	Exp (B)	95 % CI
PSA*	0,042	1,001	1,000-1,002
IL-8			
IL-8 TA	0,142	0,451	0,156-1,306
IL-8 AA	0,338	0,502	0,123-2,055

*P = 0,001; Exp (B) = 1,001; 95 % CI = 1,001 - 1,002 - univarijatna analiza

Veće koncentracije PSA ostaju nezavisan čimbenik rizika za ispitanike s karcinomom prostate s $T \geq 3$ uz *IL-8* polimorfizme kao dodane kovarijate (OR 1,001;95 % CI 1,001 - 1,002) (Tablica 5.37.).

Tablica 5.38. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodnes of fit test) za $T \geq 3$ kao zavisnu varijablu s vrijednostima PSA i *VEGF* polimorfizmima kao kovarijatama (N = 120)

Kovarijate	<i>P</i>	Exp (B)	95%CI
PSA*	0,046	1,001	1,000-1,002
VEGF GG			
VEGF GC	0,529	1,377	0,509-3,729
VEGF CC	0,858	0,815	0,087-7,6

*P = 0,001; Exp (B) = 1,001; 95 % CI = 1,001 - 1,002 - univarijatna analiza

Veće koncentracije PSA ostaju nezavisan čimbenik rizika za ispitanike s karcinomom prostate s $T \geq 3$ uz *VEGF* polimorfizme kao dodane kovarijate (OR 1,001;95 % CI 1,001 - 1,002) (Tablica 5.38.).

Tablica 5.39. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodness of fit test) za M1 kao zavisnu varijablu s vrijednostima PSA i *IL-1 β* polimorfizmima kao kovarijatama (N = 120)

Kovarijate	<i>P</i>	Exp (B)	95 % CI
PSA*	0,001	1,027	1,012-1,043
IL-1β CC			
IL-1β CT	0,201	0,524	0,195-1,41
IL-1β TT	0,562	0,677	0,182-2,524

*P = 0,001; Exp (B) = 1,026; 95 % CI = 1,011 - 1,041 - univarijatna analiza

Veće koncentracije PSA ostaju nezavisan čimbenik rizika za ispitanike s karcinomom prostate s prisutnim udaljenim metastazama uz *IL-1 β* polimorfizme kao dodane kovarijate (OR 1,027; 95 % CI 1,012 - 1,043), a taj je rizik i nešto veći nego u univarijantnoj analizi (OR 1,026; 95 % CI = 1,011 - 1,041) (Tablica 5.39.).

Tablica 5.40. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodness of fit test) za M1 kao zavisnu varijablu s vrijednostima PSA i *IL-8* polimorfizmima kao kovarijatama (N = 120)

Kovarijate	<i>P</i>	Exp (B)	95 % CI
PSA	0,001	1,026	1,011-1,041
IL-8 TT			
IL-8 TA	0,706	0,83	0,314-2,189
IL-8 AA	0,718	0,79	0,219-2,841

*P = 0,001; Exp (B) = 1,026; 95 % CI = 1,011 - 1,041 - univarijatna analiza

Veće koncentracije PSA ostaju nezavisan čimbenik rizika za ispitanike s karcinomom prostate s prisutnim udaljenim metastazama uz *IL-8* polimorfizme kao dodane kovarijate (OR 1,026; 95 % CI 1,011 - 1,041) (Tablica 5.40.).

Tablica 5.41. Binarna logistička regresija (Hosmer-Lemeshow goodness of fit test) za M1 kao zavisnu varijablu s vrijednostima PSA i *VEGF* polimorfizmima kao kovarijatama (N = 120)

Kovarijate	<i>P</i>	Exp (B)	95 % CI
PSA*	0,001	1,026	1,011-1,041
VEGF GG			
VEGF GC	0,906	1,059	0,412-2,722
VEGF CC	0,156	3,129	0,648-15,115

*P = 0,001; Exp (B) = 1,026; 95 % CI = 1,011 - 1,041 - univarijatna analiza

Veće koncentracije PSA ostaju nezavisan čimbenik rizika za ispitanike s karcinomom prostate s prisutnim udaljenim metastazama uz *VEGF* polimorfizme kao dodane kovarijate (OR 1,026; 95 % CI 1,011 - 1,041) (Tablica 5.41.).

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju, kao dijelu znanstvenog projekta „Imunološki čimbenici razvoja i progresije karcinoma prostate“, voditelja prof. prim. dr. sc. Josipa Galića, ispitivani su utjecaji polimorfizama jedne baze u genima *IL-1 β* (+3945), *IL-8* (-251) i *VEGF* (+405) citokina na nastanak karcinoma prostate i stupanj agresivnosti.

Istraživanje je obuhvatilo 275 ispitanika s područja istočne Hrvatske liječenih na Klinici za urologiju, KBC Osijek. 120 ispitanika imalo je dijagnosticiran karcinom prostate, 120 BHP i 35 ispitanika bilo je bez simptoma i znakova bilo kakvog procesa u prostati (zdravi).

Cilj istraživanja bio je utvrditi postoji li povećana sklonost obolijevanju od karcinoma prostate vezana uslijed polimorfizama gena *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* citokina uključenih u proces angiogeneze u populaciji stanovnika područja istočne Hrvatske. Navedeni citokini su odabrani jer djeluju proangiogeni, a odabrani polimorfizmi prema *in vitro* studijama utječu na ekspresiju citokina pa tako utječu i na proces angiogeneze (108).

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju na povezanost *IL-1 β* polimorfizma s većim rizikom za nastanak BHP i karcinoma prostate. Rezultati pokazuju i povezanost *IL-1 β* polimorfizma s pozitivnom obiteljskom anamnezom karcinoma prostate te povezanost *IL-1 β* i *IL-8* polimorfizma s pretilosti što ukazuje na važnost naslijeđa, ali i životnih navika u nastanku karcinoma prostate.

IL-1 β inducira sintezu *IL-8*, a zajedno s *IL-6* produkciju *VEGF*-a i tako stimulira angiogenezu. *IL-8* i *VEGF* su međusobno neovisni čimbenici angiogeneze (109). Svaka promjena u ekspresiji proteina i/ili receptora uključenih u angiogenezu može imati važnu ulogu u angiogenezi i progresiji tumora. Prema tome, polimorfizmi angiogenih gena bi mogli doprinijeti razvoju i širenju različitih karcinoma pa tako i karcinoma prostate i objasniti međusobne fenotipske varijacije karcinoma među pojedincima. Ovim istraživanjem nije nađena povezanost *VEGF* polimorfizma s karcinomom prostate. Osim što su polimorfizmi tog gena različito zastupljeni među rasama, *VEGF* je veoma polimorfan pa pojedinačni polimorfizam, iako dokazano funkcionalan, vjerojatno značajno ne utječe na njegovu produkciju i/ili ulogu u nastanku karcinoma (105). Moguće da specifične kombinacije

nekoliko polimorfizama u *VEGF* genu bolje doprinose krajnjem fenotipu od pojedinačnog polimorfizma.

Iako se nekolicina istraživanja bavila ispitivanjem povezanosti polimorfizama navedenih gena s nastankom karcinoma prostate (82, 90, 93, 110, 111) rezultati su kontradiktorni te ukazuju na važnost etničke pripadnosti. Ovo istraživanje prvo je takvo istraživanje na karcinomu prostate u hrvatskoj populaciji.

Od kada je otkriveno da stanice karcinoma prostate imaju sposobnost lučenja različitih angiogenih čimbenika uključujući i citokine (112), važnost angiogeneze u razvoju, progresiji i prognozi karcinoma prostate podupiru brojne studije (3). Epidemiološke studije ukazuju i na mogućnost predviđanja nastanka, razvoja i prognoze karcinoma prostate analizom genskih polimorfizama angiogenih čimbenika (110). Međutim, značenje angiogeneze kod karcinoma prostate još je uvijek sporno (113) i trenutno nema biljega koji bi pomogao u razvoju specifične antiangiogene terapije za karcinom prostate (114).

Interleukin-1 β potiče tumorski rast te kroz poticanje stvaranja i sekrecije VEGF-a sudjeluje u angiogenezi važnoj za napredovanje tumora. Uključen je i u sintezu i sekreciju IL2, IL-6 i TNF- α . IL-1 β inducira sintezu IL-8 u različitim vrstama stanica koji dalje potiče proliferaciju endotelnih stanica, kemotaksiju i neovaskularizaciju, a prema novijim istraživanjima sudjeluje u rastu i metastaziranju karcinoma prostate (94, 115). Genske varijacije u ekspresiji IL-1 β utječu na njegovu biološku aktivnost, a odgovorne su i za izmijenjeni metabolizam različitih kancerogenih čimbenika, što dodatno pogoduje tumorigenezi (116).

IL-1 β + 3954 SNP polimorfizam nalazi se na eksonu 5 gena. Zamjena citozina timinom ne mijenja aminokiselinski kod, ali može dovesti do promjena u mjestu cijepanja pri nastajanju proteina. Posljedica je sinteza kraćeg proteina koji je ili funkcionalno neaktivan ili se ubrzano razgrađuje (117). Navedeni polimorfizam povezuje se s povišenim serumskim vrijednostima IL-1 β citokina (118).

Povećana ekspresija IL-1 β povezuje se s povećanim rizikom od karcinoma želuca, pankreasa, cerviksa i ovarija (88). Nekoliko studija je ispitivalo povezanost povećane ekspresije IL-1 β s karcinomom želuca s obzirom na to da visoke vrijednosti IL-1 β inhibiraju lučenje želučane kiseline, a hipokloridija zajedno s želučanom atrofijom predstavlja prekursore u nastanku karcinoma želuca. Dvije studije na Amerikancima pokazale su

povezanost nastanka multifokalnog atrofičnog gastritisa, ali ne i karcinoma želuca s *IL-1β* +3945 T alelom kod bolesnika s premalignim želučanim lezijama (87, 88). Budući da samo mali broj bolesnika s multifokalnim atrofičnim gastritisom razvije displaziju ili karcinom želuca, pretpostavili su da prisutnost *IL-1β* +3945 T alela djeluje kao zaštitni čimbenik. Međutim, jedna studija na populaciji Kineza pokazala je da bolesnici s karcinomom želuca imaju sedam puta učestaliji CT genotip u odnosu na zdrave kontrole. CT genotip se povezuje i s rizikom od karcinoma pluća (119), a T alel s agresivnijim fenotipom karcinoma dojke (120), ali ne i s rizikom nastanka karcinoma dojke (121).

Nakon što su utvrdili da nositelji T alela imaju manji rizik za nastanak karcinoma želuca, Zabaleta i sur. su odlučili ispitati njegovu zaštitnu ulogu i na nastanak i stupanj agresivnosti karcinoma prostate. Međutim, potpuno suprotno, otkrili su da bijelci koji su nositelji *IL-1β* +3945 TT genotipa imaju tri puta veći rizik za agresivniji oblik karcinoma prostate od Afroamerikanaca (62), ali nisu našli povezanost s rizikom za njegov nastanak (122). Treći suplement on-line baze podataka o pozitivnoj povezanosti polimorfizama gena citokina u humanim oboljenjima također navodi utjecaj T alela na karcinom prostate (108). Suprotno tomu, Michaud i sur. u PLCO studiji probira (engl. *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Screening trial*) koja je uključivala 1320 karcinoma prostate i 1842 kontrole nisu našli povezanost s rizikom za nastanak i stupnjem agresivnosti i *IL-1β* +3945 TT genotipom (82).

U našem istraživanju, oboljeli od BHP-a i karcinoma prostate imali su veću zastupljenost T alela i veću učestalost genotipova povezanih s izmijenjenom ekspresijom (CT i TT) u odnosu na zdrave ispitanike. Usporedbom ispitanika s BHP-om i karcinomom prostate nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli alela/genotipova, iako su bolesnici s polimorfnim TT genotipom i T alelom bili zastupljeniji u skupini s karcinomom prostate (14,2 % vs 8,3 % za TT genotip i 39,2 % vs 32,9 % za T alel) uz graničnu statističku značajnost ($\chi^2=1,77$; $P=0,061$). Nadalje, nositelji CT genotipa imali su gotovo sedam puta veći omjer ($P < 0,001$) izgleda za nastanak karcinoma prostate i gotovo šest puta veći omjer ($P = 0,001$) izgleda za nastanak BHP-a u odnosu na zdrave kontrole.

Ispitivanjem utjecaja polimorfnog T alela na razvoj agresivnijeg oblika karcinoma nije nađena povezanost s karcinomom prostate $GS > 7$, $T \geq 3$ i prisutnim udaljenim metastazama. Zanimljivo, bolesnici s manje agresivnim tipom karcinoma imali su nešto učestaliji TT genotip.

Dobiveni rezultati govore u prilog povezanosti T alela i TT genotipa s rizikom nastanka karcinoma prostate, ali ne i s nastankom agresivnijeg oblika karcinoma. Razlike u rezultatima među studijama, uključujući i naše istraživanje, mogu se djelomično pripisati broju sudionika uključenih u studije, tipu studije (bolnička, populacijska), odnosno uključenosti samo muškog ili oba spola u studiju (populacijska istraživanja). Svakako, zbog različite zastupljenosti genotipova i alela među rasama, treba uzeti u obzir i utjecaj etničke pripadnosti među ispitanicima. Tako učestalost T alela kod bijelaca iznosi oko 20 %, kod Afroamerikanaca oko 13 %, a kod Azijata do 6 % (88, 118). Učestalost T alela u naših zdravih ispitanika iznosila je 19 % i podudarala se s prosječnom učestalošću u populaciji bijelaca. Zabaleta i sur. (122) su u svom istraživanju utvrdili da bijelci u Americi koji nose TT genotip imaju veći rizik za nastanak karcinoma prostate od Afroamerikanaca, dok Michaud sa sur. (82) nije razdvajao ispitanike u Engleskoj na osnovi rasne pripadnosti, što je vjerojatno utjecalo na razlike u rezultatima navedenih istraživanja.

IL-8 osim monocita i fibroblasta, luče i različiti tipovi tumorskih stanica, uključujući stanice tumora jajnika, pluća, mjehura, prostate, pankreasa, pločastih stanica glave i vrata te melanoma. Djeluje mitogeno i angiogeno, a prekomjerna ekspresija IL-8 povezana je s malignijim oblicima tumora i progresijom tumora kod karcinoma dojke, želuca, jajnika, prostate i melanoma. Svoju angiogenu aktivnost izražava stimuliranjem sinteze metaloproteinaza 2 i 9 koje su neophodne za razgradnju ekstracelularnog matriksa. Tim procesom pojačava se invazija strome domaćina tumorskim stanicama, angiogeneza, kao i metastaziranje tumora (91, 123).

IL-8 -251 SNP polimorfizam nalazi se u promotorskoj regiji gena i jedini je funkcionalan. Utječe na transkripciju gena i produkciju IL-8. Međutim, povezanost polimorfizma s transkripcijskom aktivnosti je nedosljedna. Većina istraživanja povezuje A alel s pojačanom transkripcijom (89), iako je Lee sa sur. otkrio da je kod staničnih linija karcinoma želuca T alel povezan s pojačanom transkripcijom (124). Polimorfizam je povezan s brojnim malignostima, uključujući karcinom želuca, debelog crijeva i prostate (123).

IL-8 luči i normalni epitel prostate, kao i stanice karcinoma prostate. Lučenje IL-8 i drugih angiogenih čimbenika staničnih linija karcinoma prostate, korelira s metastatskim potencijalom tih stanica. Nadalje, prekomjerna ekspresija IL-8 primarnih tumorskih stanica povezana je s progresijom karcinoma. IL-8 djeluje kao angiogeni čimbenik na mišjem modelu karcinoma prostate (91).

Nedavno objavljeni radovi meta-analize Wang-a i sur. (89), temeljeni na 42 studije istraživanja parova pokazuju 12 - 21 % veći rizik za karcinome dojke, debelog crijeva, želuca pluća, nazofarinksa, ali smanjeni rizik za nastanak karcinoma prostate kod nositelja A alela. Nakon stratificiranja prema rasnoj pripadnosti i dizajnu studije (bolnička ili populacijska), utvrđeno je da je povećan rizik bio kod afričke i azijske populacije u odnosu na bijelce u Europi, kao i kod studija baziranih na bolničkim ispitanicima u odnosu na istraživanja u općoj populaciji. Međutim, velika studija na finskoj populaciji Yanga i sur. (93) pokazala je da nositelji AA genotipa imaju 20 % veću vjerojatnost za nastanak karcinoma prostate. Studija je uključivala 29 133 ispitanika čiji je dobni prosjek bio 68 godina, 31 % ispitanika imao je stadij tumora veći od 3, a 23 % ispitanika imalo je GS veći od 7 (93). Naše istraživanje imalo je vrlo sličnu strukturu ispitanika. Prosječna dob bila je 68 godina, stadij tumora veći od 3 imalo je 19 % ispitanika, a GS > 7, 24 % ispitanika.

Meta-analiza Gao i sur. (90), bazirana na 45 studija istraživanja parova pokazala je jaču povezanost AA genotipa s rizikom od karcinoma prostate samo kod afričke populacije u odnosu na azijsku i europsku. I u ovoj meta-analizi autori ukazuju da je razlika u riziku vjerojatno posljedica genske razlike zbog različite rasne pripadnosti, ali i pristranosti istraživanja. Meta-analizom su bile obuhvaćene dvije studije o riziku za nastanak karcinoma prostate kod afričke populacije, a obje su bile pozitivno povezane s pojačanim rizikom za karcinom prostate. Za razliku od meta-analize Wang-a i sur. nisu našli povezanost AA genotipa s pojačanim rizikom od karcinome dojke, debelog crijeva, želuca, pluća, nazofarinksa, već s ostalim karcinomima tipa melanoma, karcinoma skvamoznih stanica jednjaka i karcinoma jezika (90).

U našem istraživanju nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli alela/genotipova među skupinama ispitanika s BHP-om i s karcinomom prostate i kontrolne zdrave skupine. Prosječna zastupljenost polimorfnog AA genotipa bila je jednaka u sve tri skupine.

Za razliku od studije Yanga i sur. (93) koja je imala sličnu strukturu ispitanika, našim istraživanjem nije utvrđena statistički značajna razlika usporedbom svih triju skupina s obzirom na rizik nastanka karcinoma prostate uslijed *IL-8* 251 polimorfizma. Ipak, ispitanici s BHP-om i karcinomom prostate imali su nešto učestaliji AA genotip.

Nekoliko studija povezuje pojačanu ekspresiju *IL-8* s agresivnijim oblikom karcinoma prostate (GS > 7, T > 3 i prisutnost udaljenih metastaza) (94, 125, 126). Iako nismo našli statistički značajnu razliku u raspodjeli alela/genotipova među ispitanicima s obzirom na

stupanj agresivnosti, ispitanici s $GS > 7$ imali su nešto učestaliji AA genotip (25,0 % vs 16,7; OR 1,36; CI 95 % 0,44 - 4,20, $P = 0,596$).

Ograničavajući čimbenik ove studije je relativno mali broj ispitanika. Veći broj ispitanika bi možda ipak pokazao povezanost AA genotipa s rizikom nastanka agresivnijeg oblika karcinoma prostate u populaciji istočne Hrvatske.

VEGF je angiogeni citokin koji ima značajnu ulogu i u fiziološkoj i u tumorskoj angiogenezi s posebnim mitogenim učinkom na endotelne stanice krvožilja. Potiče invaziju i migraciju endotelnih stanica, a povećanjem vaskularne propustljivosti olakšava prodor tumorskih stanica u cirkulaciju i omogućava im širenje u udaljena područja. Tumorske stanice također potiču lučenje VEGF-a u okolnim stromalnim stanicama domaćina koji zatim u visokoj koncentraciji inhibira imuni odgovor stanica domaćina djelujući i na efektorsku funkciju, ali i na rane stupnjeve hematopoeze (96). Prekomjerna ekspresija VEGF mRNA i proteina povezuje se s progresijom tumora i lošom prognozom te brojnim malignitetima uključujući melanom, karcinom ovarija, prostate, debelog crijeva, dojke, pluća, mozga, gušterače, bubrega i mjehura (99, 109). Razina ekspresije u tumorskim stanicama direktno korelira s veličinom tumora, metastaziranjem i lošijom prognozom u mnogim solidnim i hematološkim tumorima (109).

VEGF +405 SNP polimorfizam utječe na učinkovitost translacije proteina. Međutim, još uvijek se vodi rasprava o točnoj funkciji navedenog polimorfizma, jer po jednim autorima pojedinci koje nose CC ili CG genotip imaju pojačanu VEGF ekspresiju, dok je po drugima C alel povezan sa smanjenom sintezom VEGF-a i smanjenom promotorskom aktivnošću (105).

Normalno tkivo prostate ili ne luči ili luči vrlo male količine VEGF-a. Imunohistokemijska studija na biopsatima karcinoma prostate našla je značajan porast ekspresije VEGF-a kod bolesnika s progredirajućim karcinomom. Ekspresija je androgen i estrogen ovisna kod hormon ovisnih tumora (dojka, prostata). Tako bolesnici s karcinomom prostate imaju povišene VEGF vrijednosti u serumu i mokraći (127).

Brojne studije su se bavile utjecajem različitih *VEGF* polimorfizama na rizik nastanka i razvoj agresivnijeg karcinoma prostate. Studije su uključivale pojedinačne SNP npr. -1498C>T, -1154G>A, +405G>C, +936C>T, -2578C>A, ali i njihove haplotipove. Tako se u tajvanskoj populaciji (128) povećani rizik povezuje s -1498 T alelom, a kod Tunizana s +405 GC+CC genotipom (96) koji je u toj populaciji povezan i s agresivnijim oblikom karcinoma

prostate (69). Austrijanci (103) nisu otkrili utjecaj +405 GC i CC genotipa s rizikom nastanka karcinoma prostate. Najčešće ispitivani +1154G>A polimorfizam povezuje se sa smanjenim rizikom od karcinoma prostate bez obzira na etničku pripadnost (96, 103, 129).

U našem istraživanju nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli alela/genotipova *VEGF* +405 polimorfizma među ispitivanim skupinama. Također nije nađena značajna povezanost polimorfnih *VEGF* +405 alela/genotipova s agresivnijim oblikom karcinoma. Zastupljenost polimorfnog CC genotipa u skladu je sa zastupljenošću u populaciji bijelaca (8,6 % vs 9,4 %) i niža je u odnosu na azijsku i afričku populaciju (15 - 20 %) (129).

Pozitivna obiteljska anamneza, pretilost, pušenje i konzumiranje alkohola čimbenici su rizika koji se povezuju s nastankom karcinoma prostate. U ovom istraživanju, ispitali smo doprinose li navedeni čimbenici rizika udruženi s polimorfizmima *IL-1β*, *IL-8* i *VEGF* gena pojačanom riziku za nastanak karcinoma prostate i agresivnijeg fenotipa karcinoma prostate.

Većina studija ne prikazuje učinak međudjelovanja analiziranih polimorfizama s poznatim rizičnim čimbenicima na nastanak karcinoma prostate. Nekoliko studija ipak navodi moguće međudjelovanje *IL-8* -251A polimorfizma i pozitivne obiteljske anamneze s jače izraženim učinkom pri analizi haplotipova (89).

U našem istraživanju, iako nije dostignuta statistička značajnost, vidljiva je povećana učestalost CT i TT genotipova *IL-1β* +3594 polimorfizma kod bolesnika s karcinomom prostate i pozitivnom obiteljskom anamnezom ($\chi^2 = 5,20$; $P = 0,074$). Dodatnom analizom omjera izgleda prema raspodjeli alela dobiven je skoro 9 puta veći omjer izgleda nastanka karcinoma prostate kod nositelja T alela s pozitivnom obiteljskom anamnezom (OR 8,83; CI 95 % 1,09 - 71,58; $P = 0,041$).

Ispitivanjem raspodjele alela/genotipova za *IL-8* -251 polimorfizam nije nađena razlika među ispitanicima s BHP-om i s karcinomom prostate. Uočava se, međutim, da bolesnici s karcinomom prostate i pozitivnom obiteljskom anamnezom imaju učestaliji TA genotip u odnosu na ispitanike s BHP-om (50,0 % vs 28,6 %). Taj se rezultat djelomično podudara s istraživanjima u studijama koje povezuju povećanu učestalost A alela kod osoba s obiteljskom predispozicijom za nastanak karcinoma prostate (89). Analiza većeg broja ispitanika ili analiza haplotipova *IL-8* gena možda bi ipak ukazala na moguće povećan rizik od nastanka karcinoma prostate kod nositelja heterozigotnog TA genotipa ili A alela, a koji imaju obiteljsku predispoziciju za nastanak karcinoma prostate.

Nije pronađena statistički značajna povezanost nosioca *VEGF* +405 polimorfizma gena ispitanika s pozitivnom obiteljskom anamnezom i rizikom nastanka karcinoma prostate. Zanimljivo je da niti jedan ispitanik nije imao polimorfni CC genotip, a učestalost GC genotipa bila je veća kod ispitanika s BHP-om i pozitivnom obiteljskom anamnezom, što bi upućivalo na moguću zaštitnu ulogu navedenog genotipa za razvoj karcinoma prostate u našoj populaciji. U daljnjem istraživanju trebalo bi pratiti takve bolesnike i vidjeti hoće li s vremenom razviti karcinom prostate.

Od egzogenih čimbenika rizika s rizikom od nastanka karcinoma prostate povezuje se i pretilost i to zbog utjecaja debljine na metabolizam spolnih hormona, posebno kod tumora ovisnih o hormonima kakav je karcinom prostate (35). Međutim, treba uzeti u obzir da pretili muškarci zbog pojačane pretvorbe testosterona u estrogene u masnim stanicama imaju više vrijednosti estrogena koje djeluju zaštitno i smanjuju rizik od nastanka karcinoma prostate (29).

Novija istraživanja su pokazala da porastom BMI ≥ 30 raste rizik od nastanka karcinoma i to za 9 % s BMI između 30 - 35, a čak 52 % s BMI ≥ 40 , dok smrtnost od karcinoma raste za 10 % na svakih 5 kg/m² BMI (35).

U našem istraživanju je udio ispitanika s BMI ≥ 30 bio statistički značajno veći u skupini s karcinomom prostate (P = 0,009) u odnosu na BHP s 2,381 puta većim omjerom rizika za nastanak karcinoma prostate (CI 95 % 1,242 - 4,563) i u skladu je s istraživanjem provedenim od Sua i sur. na američkoj populaciji (34).

Analizom međudjelovanja polimorfizama i pretilosti na rizik nastanka karcinoma prostate dobili smo skoro četiri puta veći omjer izgleda nastanka karcinoma prostate za bolesnike koji su pretili i nositelji su *IL-1 β* +3594 CT genotipa (OR 3,683; CI 95 % 1,295 - 10,477; P = 0,014). Zapaža se i veća učestalost *IL-8* -251 AA genotipa kod bolesnika s karcinomom prostate i BMI ≥ 30 (P = 0,093), iako nije dostignuta statistička značajnost. Uz statistički graničnu značajnost bila je veća učestalost divljeg *VEGF* genotipa kod bolesnika s karcinomom prostate i BMI ≥ 30 (P = 0,055). Iako je pretilost sama po sebi značajan nezavisni čimbenik rizika za karcinom prostate, multivariatna analiza je pokazala da taj rizik dodatno raste uz *IL-1 β* i *IL-8* raspodjelu genotipova u odnosu na univariatnu analizu (OR 2,477 vs. OR 2,381 za *IL-1 β* ; OR 2,392 vs. R 2,381 za *IL-8*). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da polimorfizmi genotipova *IL-1 β* i *IL-8* gena citokina kod pretelih ispitanika povećavaju rizik od nastanka karcinoma

prostate, dok bi polimorfni *VEGF* genotip mogao imati zaštitnu ulogu u razvoju karcinoma prostate u našoj populaciji.

Pušenje je štetno i za pušače i za nepušače. Danas je poznato da se u duhanskom dimu nalazi više od 7000 kemikalija od kojih je bar 250 štetno. Od 250 poznatih štetnih sastojaka za 69 se zna da uzrokuju različite vrste karcinoma (130).

Osim izloženosti kemijskim kancerogenima iz duhanskog dima, pušenje može utjecati i na cirkulirajuće vrijednosti steroidnih hormona. Pušenje se povezuje s višim vrijednostima slobodnog testosterona odnosno nižim vrijednostima slobodnog estradiola kod muškaraca. Postoji značajna korelacija serumskih vrijednosti ukupnog testosterona i slobodnog testosterona kod muškaraca s brojem popušanih cigareta. To je značajno jer testosteron odnosno njegov značajniji metabolit DHT ne djeluje samo na normalni razvoj i funkciju prostate, već potencira i staničnu proliferaciju u prostati koja može biti povezana s malignom transformacijom. Osim toga, pušenje može stvoriti sredinu pogodnu za razvoj ili progresiju karcinoma prostate, a sadrži i značajne količine kadmija koji se povezuje s karcinogenezom u prostati (31).

Nije bilo razlike u statusu pušenja među ispitivanim skupinama. Većina ispitanika je izjavila da su nepušači. Analiza međudjelovanja ispitivanih polimorfizama sa statusom pušenja pokazala je da ispitanici s BHP-om koji su k tome i pušači imaju učestaliji *IL-8* -251 AA genotip i A alel u odnosu na bolesnike s karcinomom prostate, pušače uz graničnu statističku značajnost ($P = 0,057$ za AA genotip; $P = 0,057$ za A alel).

Konsumiranje alkohola se općenito mjeri brojem pića koje sadrže oko 15 g etanola po danu (npr. jedno pivo, čaša vina, čašica likera). Konsumiranje alkohola, posebno u količinama većim od 8 čaša dnevno može pridonijeti nastanku karcinoma jetara, jednjaka, grkljana, ždrijela i usne šupljine. Neke studije povezuju i povećani rizik nastanka karcinoma dojke, pankreasa i debelog crijeva s prekomjernim konzumiranjem alkoholnih pića (29, 36).

Alkohol kao i pušenje i prekomjerna težina djeluje na metabolizam i djelovanje androgena i estrogena mehanizmom koji još nije u potpunosti razjašnjen. Osim toga, može povećati propusnost membrana za kancerogene spojeve, utjecati na aktivnost enzima uključenih u metabolizam karcinogena, inhibirati procese popravka oštećene DNA, utjecati na metilaciju DNA te tako utjecati na regulaciju gena, kao i djelovati na energetske ravnoteže i tjelesnu težinu koje su bitne za nastanak karcinoma dojke i prostate. Dokazano je da učinak

alkohola može modulirati polimorfizme u genima za enzime uključene u metabolizam etanola, metabolizam folne kiseline i popravak DNA (36) .

Usporedbom zastupljenosti ispitanika s BHP-om i bolesnika s karcinomom prostate i konzumiranja alkohola nije pronađeno da uživatelji alkohola češće obolijevaju od karcinoma prostate. Također nije pronađen povećan rizik za nastanak karcinoma prostate udruživanjem analiziranih polimorfizama *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* gena s učinkom alkohola.

PSA je prema funkciji enzim iz skupine serinskih proteaza kojeg luče epitelne stanice acinusa prostate i prostatičnih kanalića. U visokoj koncentraciji nalazi se u sjemenoj tekućini gdje sudjeluje u likvefakciji sjemena. Nije specifičan za karcinom prostate jer povišene vrijednosti nalazimo i kod prostatitisa, BHP-a i mehaničkih ozljeda prostate, a mijenja se i ovisno o dobi, rasi i volumenu prostate. Stanice karcinoma prostate ne proizvode veću količinu PSA u odnosu na normalni epitel. Porast serumskih koncentracija posljedica je narušene mikroarhitekture tkiva prostate što omogućava prijelaz PSA u okolni ekstarcelularni prostor, limfu i zatim u cirkulaciju.

Istraživanja su pokazala da PSA ovisno o serumskim koncentracijama ima antiangiogenu aktivnost tako što inhibira odgovor endotelnih stanica i na VEGF i na bFGF (71). Antiangiogeni učinak PSA je posljedica njegove proteolitičke aktivnosti kao serinske proteaze na plazminogen. Cijepanjem plazminogena nastaju angiostatini slični fragmenti koji djeluju antiangiogeno. Ta antiangiogena aktivnost PSA možda može objasniti sporu progresiju nekih tumora prostate (102).

Kohli sa sur. je u prospektivnoj studiji koja je uspoređivala dvije skupine ispitanika s uznapredovanim karcinomom prostate ispitivao povezanost plazmatske koncentracije VEGF s progresijom tumora. Prvu skupinu činili su ispitanici sa stabilnom PSA koncentracijom tijekom hormonalnog liječenja, a drugu ispitanici kod kojih je došlo do PSA progresije tijekom liječenja. Nije bilo razlike u koncentraciji VEGF-a među skupinama. Nastajanje metastaza kod progresije karcinoma ovisi o angiogenezi pa bi tako trebalo biti popraćeno i visokim koncentracijama VEGF-a, ali s druge strane porast serumskih koncentracija PSA kod ispitanika s progresijom karcinoma može djelovati antiangiogeno i snižavati cirkulirajuće vrijednosti VEGF-a (131).

Onen i sur. nisu našli povezanost *VEGF* -460 polimorfizma s PSA koncentracijama mjenjenim prije bilo kakvog dijagnostičkog postupka i klasificiranim u tri skupine (PSA < 10 ng/ml, 10 - 20 ng/ml i >20 ng/ml) (104).

McCarron i sur. našli su povezanost visokih vrijednosti PSA mjenjenih kod postavljanja dijagnoze s *IL-8* -251 AA genotipom (110).

U našem istraživanju nije pronađena povezanost između polimorfnih alela/genotipova ispitivanih gena citokina i serumskih PSA koncentracija. Serumske koncentracije PSA ostale su nezavisane čimbenik rizika za ispitanike s karcinomom prostate koji su imali $GS \geq 7$, $T > 3$ i prisutne udaljene metastaze. Treba, međutim, uzeti u obzir da je u našem istraživanju samo 5 % ispitanika imalo agresivniji oblik karcinoma prostate s $GS \geq 7$, $T > 3$, $PSA > 10$ ng/ml i prisutnost udaljenih metastaza što umanjuje snagu ispitivanja.

Karcinom prostate je poligenetska bolest pa je moguće da bi kod ispitanika nositelja dvaju polimorfni genotipova bio vidljiv učinak na rizik nastanka karcinoma prostate ili agresivnijeg oblika karcinoma prostate. S obzirom na to da *IL-1 β* ima komplementarni učinak s *IL-8* i *VEGF*-om, moglo bi se očekivati da nositelji dvaju polimorfni genotipova za te kombinacije genotipova mogu imati povećani rizik za karcinom prostate ili agresivniji oblik karcinoma prostate. Kako je u ovom istraživanju mali broj ispitanika nositelja istovremeno dvaju homozigotni mutiranih genotipova statistička analiza, nema dovoljnu snagu testa. Ovakvo istraživanje bi bilo dobro napraviti na većem broju ispitanika.

Populacija ispitivana u ovom istraživanju samo je djelomično slučajna. Ispitanici su slučajno odabrani među osobama koje su potražile pomoć zbog uroloških tegoba na Klinici za urologiju pa analizirana populacija, iako slučajno odabrana, nije ujedno i slučajni uzorak hrvatske populacije. Prema tome, nije neočekivano što dvije skupine ispitanika (zdrava kontrolna skupina kod *IL-1 β* gena i skupina s BHP-om kod *VEGF* gena) nisu bile u Hardy-Weinberg ravnoteži. Iako je prema G-power izračunu veličina uzorka bila dostatna, ne može se isključiti rizik od lažno pozitivnih rezultata. Ograničavajući čimbenik ove studije je i relativno mali broj ispitanika s agresivnijim oblikom karcinoma prostate i prisutnim udaljenim metastazama što umanjuje snagu ispitivanja.

Dobiveni rezultati ove studije daju vrijedne informacije o mogućoj ulozi *IL-1 β* polimorfizma u etiopatogenezi karcinoma prostate te učinku međudjelovanja *IL-1 β* i *IL-8* polimorfizama sa životnim navikama na nastanak karcinoma te tako potiču na daljnje

istraživanje utjecaja ispitivanih čimbenika uključenih u angiogenezu, na etiologiju karcinoma prostate proširivanjem broja ispitanika, ispitivanjem drugih polimorfizama i haplotiva navedenih gena ali i istraživanjem na proteinskoj razini.

Izoliranjem SNP angiogenih gena kao osjetljivih čimbenika omogućilo bi probir posebno ugroženih bolesnika, koji zahtijevaju agresivnije liječenje i pomnije praćenje i tako utjecalo na ishod bolesti, odgovor na liječenje i imunoterapiju te bi mogli biti temelj istraživanjima koja se bave uporabom inhibitora angiogeneze u terapijske svrhe što bi možda omogućilo individualizirani pristup u liječenju karcinoma prostate.

7. ZAKLJUČCI

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li povećana sklonost obolijevanju od karcinoma prostate vezana uz polimorfizme gena citokina uključenih u proces angiogeneze u populaciji stanovnika na području istočne Hrvatske.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- *IL-1 β* polimorfizam povezan je s većim rizikom za nastanak benigne hiperplazije prostate i karcinoma prostate, ali nije povezan i s agresivnijim fenotipom karcinoma
- *IL-8* polimorfizam nije povezan s većim rizikom za nastanak karcinoma, niti s agresivnijim fenotipom karcinoma prostate
- *VEGF* polimorfizam nije povezan s većim rizikom za nastanak karcinoma niti s agresivnijim fenotipom karcinoma prostate
- Rizične varijante *IL-1 β* polimorfizma zastupljenije su kod bolesnika s karcinomom prostate koji imaju nasljedni oblik karcinoma i pretile su
- Pretile osobe s karcinomom prostate imaju i učestaliju polimorfnu varijantu *IL-8* gena
- BHP ispitanici, pušači imaju učestaliji polimorfni *IL-8* alel/genotip
- Nije nađena povezanost polimorfni alela/genotipova i serumskih koncentracija PSA

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja

Angiogeneza ima važnu ulogu u razvoju, rastu i širenju solidnih tumora pa tako i karcinoma prostate. Brojna istraživanja povezuju potencijalno funkcionalne polimorfizme jedne baze u genima važnim za angiogenezu u prostati s povećanim rizikom i agresivnijim oblikom karcinoma prostate. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj polimorfizama *IL-1 β* , *IL-8* i *VEGF* gena proangiogenih citokina na nastanak i razvoj agresivnijeg oblika karcinoma prostate.

Ispitanici i metode

Prospektivno istraživanje parova obuhvatilo je 275 ispitanika s područja istočne Hrvatske: 120 s karcinomom prostate, 120 s benignom hiperplazijom prostate i 35 zdravih kontrola. Svakom ispitaniku je nakon uzimanja anamneze učinjen digitorektalni pregled (DRP) i izuzeta krv za analizu prostata specifičnog antigena (PSA) i analizu polimorfizama gena. Ispitanici s pozitivnim DRP-om i/ili povišenim PSA-om podvrgnuti su biopsiji. Svaki ispitanik dao je pismeni pristanak za sudjelovanje u ispitivanju nakon upoznavanja s načinom provođenja i svrhom ispitivanja. Koncentracija PSA određena je elektrokemiluminiscentnim testom, a genotipizacija je rađena metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

Rezultati

Polimorfizam *IL-1 β* gena bio je značajno učestaliji kod bolesnika s BHP-om i karcinomom prostate u odnosu na zdravu populaciju ($P = 0,001$). Bolesnici s karcinomom prostate imali su učestaliji polimorfni TT genotip i T alel od BHP skupine uz graničnu statističku značajnost ($\chi^2 = 1,77$; $p = 0,061$) s većim rizikom za nastanak karcinoma (OR 2,02; CI 95 % 0,84 - 4,86) uz TT genotip. Analizom međudjelovanja polimorfizama s etiološkim čimbenicima nađena je povezanost nasljednog oblika karcinoma (OR 8,83; CI 95 % 1,09 - 71,58 za T alel) i pretilosti (OR 3,68; CI 95 % 1,29 - 10,5 za CT genotip) s rizikom za nastanak karcinoma prostate uslijed polimorfizma *IL-1 β* gena. Zapaža se povećana učestalost *IL-8* -251 AA genotipa kod bolesnika s karcinomom prostate i BMI ≥ 30 , iako nije dostignuta statistička značajnost ($P = 0,093$). Ispitanici s BHP-om, pušači imaju učestaliji polimorfni *IL-8* alel/genotip ($P = 0,057$ za AA genotip; $P = 0,057$ za A alel). Nije nađena povezanost

polimorfnih alela/genotipova ispitivanih gena citokina s agresivnijim oblikom karcinoma prostate niti sa serumskim vrijednostima PSA.

Zaključak

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da specifični polimorfizmi IL-1 β i *IL-8* gena potencijalno mijenjaju sklonost obolijevanju od karcinoma prostate u našoj populaciji, odnosno potvrđuju značaj angiogeneze u etiopatogenezi karcinoma prostate.

Ključne riječi: IL-1 β ; IL-8; karcinom prostate; polimorfizam; VEGF.

9. SUMMARY

***IL-1 β* , *IL-8* and *VEGF* gene polymorphism in prostate cancer**

Objective

Angiogenesis plays an important role in the development, growth and spread of solid tumors, including prostate cancer. Numerous studies link potentially functional single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes important in prostate angiogenesis with increased risk and aggressive form of prostate cancer. The aim of this study was to investigate the influence of polymorphisms in the *IL-1 β* , *IL-8* and *VEGF* pro angiogenic cytokine genes on the development, growth and progression to more aggressive form of prostate cancer.

Participants and methods

A prospective case control study included 275 participants from the eastern Croatia: 120 with prostate cancer, 120 with benign prostatic hyperplasia and 35 healthy controls. All participants underwent digital rectal examination (DRE) and blood sampling for prostate specific antigen (PSA) determination and the analysis of polymorphisms of interest. Patients with positive DRE and/or elevated PSA underwent prostate biopsy. Each subject gave written informed consent form to participate in the study after having been acquainted with the manner and purpose of conducting tests. PSA concentration was determined by electrochemiluminescent assay and genotyping was performed by polymerase chain reaction in real time.

Results

Polymorphism of *IL-1 β* gene was significantly more frequent in patients with BHP and prostate cancer compared to healthy controls (P=0.001). Patients with prostate cancer had more common polymorphic TT genotype and T allele than the BHP group with borderline statistical significance ($\chi^2=1.77$; P=0.061) and with a higher risk of cancer development (OR 2.02; 95% CI 0,84- 4.86) with the TT genotype. By analyzing the interactions between polymorphisms with etiologic factors we found correlation of hereditary forms of cancer (OR 8.83; CI 95% 1.09 to 71.58 for the T allele) and obesity (OR 3,68; CI 95% 1,29-10,5 for the CT genotype) with a risk of prostate cancer due to polymorphism of the *IL-1 β* gene. It is noted an increased frequency of *IL-8* -251 AA genotype in patients with prostate cancer and BMI \geq 30, although with no statistical significance (P=0.093). BHP subjects, smokers have

more frequent polymorphic *IL-8* allele/genotype (P=0.057 for the AA genotype; P=0.057 for the A allele). There was no correlation of polymorphic alleles/genotypes examined cytokine genes with a more aggressive form of prostate cancer, nor with serum PSA values.

Conclusion

In conclusion, this study suggests that the specific polymorphisms of *IL-1 β* and *IL-8* gene potentially increase susceptibility to prostate cancer development in our population and confirms the importance of angiogenesis in pathogenesis of prostate cancer.

Key words: IL-1 β ; IL-8; prostate cancer; polymorphism; VEGF.

10. LITERATURA

1. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2006;11:1388-413. Epub 2005/12/22.
2. Spanjol J, Maricic A, Cicvaric T, Valencic M, Oguic R, Tadin T, et al. Epidemiology of prostate cancer in the mediterranean population of Croatia--a thirty-three year retrospective study. *Collegium antropologicum*. 2007;31(1):235-9.
3. Aragon-Ching JB, Madan RA, Dahut WL. Angiogenesis inhibition in prostate cancer: current uses and future promises. *J Oncol*. 2010;2010:361836. Epub 2010/02/20.
4. Kesarwani P, Mittal RD. Association of Pro/Anti-inflammatory Cytokine Gene Polymorphisms with Benign Prostate Hyperplasia Risk. *Indian J Clin Biochem*. 2010;25(4):342-8. Epub 2011/10/04.
5. Borozdenkova S, Mant TG, Allen E, Pu K, Hoshino S, Jurcevic S. Effects of a cytokine inhibitor, JTE-607, on the response to endotoxin in healthy human volunteers. *International immunopharmacology*. 2011;11(11):1837-43.
6. Santos-Rosa Manuel BJ, Whicher J, Tietz NW. Cytokines. In: Burtis CA, Ashwood ER, Tietz NW, editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999. p. 541-616.
7. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current molecular medicine*. 2003;3(7):643-51.
8. Chung BI, Sommer G, Brooks JD. Anatomy of the Lower Urinary Tract and Male Genitalia. In: Kavoussi LR Partin AW, Novick AC, Peters CA, editor. *Campbell-Walsh Urology*. 10th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 33-70.
9. Thorpe A, Neal D. Benign prostatic hyperplasia. *Lancet*. 2003;361(9366):1359-67. Epub 2003/04/25.

10. Mokos I. Benigna hiperplazija prostate i smetnje donjeg urinarnog trakta. *MEDICUS*. 2012;21(1):67-71.
11. Oesterling JE. Benign prostatic hyperplasia: a review of its histogenesis and natural history. *The Prostate Supplement*. 1996;6:67-73. Epub 1996/01/01.
12. Wein AJ, Lee D. Benign Prostatic Hyperplasia and Related Entities. In: Hanno P, Malkowicz B, Wein AJ, editor. *PENN CLINICAL MANUAL OF UROLOGY*. Philadelphia: Saunder Elsevier; 2007. p. 479-521.
13. Wilson JD. The Pathogenesis of Benign Prostatic Hyperplasia. *Am J Med*. 1980;68(5):745-56.
14. Barry MJ. Epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. *The Urologic clinics of North America*. 1990;17(3):495-507. Epub 1990/08/01.
15. Roehrborn CG. Benign Prostatic Hyperplasia: Etiology, Pathophysiology, Epidemiology, and Natural History. In: Kavoussi LR Partin AW, Novick AC, Peters CA, editor. *Campbell-Walsh Urology*. 10th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 2570-610.
16. Debes JD, Tindall DJ. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer letters*. 2002;187(1-2):1-7. Epub 2002/10/03.
17. Andriole G, Bruchofsky N, Chung LW, Matsumoto AM, Rittmaster R, Roehrborn C, et al. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5alpha-reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *The Journal of urology*. 2004;172(4 Pt 1):1399-403. Epub 2004/09/17.
18. Galic J, Simunovic D. Serum concentration of nine hormones in aging male population and association with potency and libido problems. *Collegium antropologicum*. 2006;30(4):735-8. Epub 2007/01/25.

19. Zumoff B, Strain GW, Kream J, O'Connor J, Rosenfeld RS, Levin J, et al. Age variation of the 24-hour mean plasma concentrations of androgens, estrogens, and gonadotropins in normal adult men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1982;54(3):534-8. Epub 1982/03/01.
20. Briganti A, Capitanio U, Suardi N, Gallina A, Salonia A, Bianchi M, et al. Benign Prostatic Hyperplasia and Its Aetiologies. *Eur Urol Suppl*. 2009;8(13):865-71.
21. Kramer G, Mitteregger D, Marberger M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? *European urology*. 2007;51(5):1202-16. Epub 2006/12/22.
22. Bostwick DG, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2004;17(3):360-79. Epub 2004/01/24.
23. Epstein JI. Pathology of Prostatic Neoplasia. In: Kavoussi LR, Partin AW, Novick AC, Peters CA, editor. *Campbell-Walsh Urology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 2726-34.
24. DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet*. 2003;361(9361):955-64. Epub 2003/03/22.
25. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *European urology*. 2012;61(6):1079-92. Epub 2012/03/20.
26. Strnad M. Epidemiologija raka prostate. U: Šamija M, urednik. *Rak prostate - najvarijabilniji zloćudni tumor*. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. p. 23-40.
27. prema: <http://eu-cancer.iarc.fr/EUCAN/Default.aspx>. (rujan 2014).
28. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer*. 2013;49(6):1374-403. Epub 2013/03/15.

29. Manvar Ankur M, Pruthi RS, Wallen EM, Nielsen ME. Epidemiology of Prostate Cancer In: Tewari A, editor. Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective London: Springer; 2013. p. 285-99.
30. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer*. 2004;101(10 Suppl):2371-490. Epub 2004/10/21.
31. Plaskon LA, Penson DF, Vaughan TL, Stanford JL. Cigarette smoking and risk of prostate cancer in middle-aged men. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2003;12(7):604-9. Epub 2003/07/19.
32. Ben-Jonathan N, Liby K, McFarland M, Zinger M. Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2002;13(6):245-50. Epub 2002/07/20.
33. Cheetham PJ, Katz AE. Diet and prostate cancer - a holistic approach to management. *Archivos espanoles de urologia*. 2011;64(8):720-34. Epub 2011/11/05.
34. Su LJ, Arab L, Steck SE, Fonham ET, Schroeder JC, Bensen JT, et al. Obesity and prostate cancer aggressiveness among African and Caucasian Americans in a population-based study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2011;20(5):844-53. Epub 2011/04/07.
35. Basen-Engquist K, Chang M. Obesity and cancer risk: recent review and evidence. *Current oncology reports*. 2011;13(1):71-6. Epub 2010/11/17.
36. Rizos C, Papassava M, Golias C, Charalabopoulos K. Alcohol consumption and prostate cancer: a mini review. *Experimental oncology*. 2010;32(2):66-70. Epub 2010/08/10.
37. McTiernan A. Mechanisms linking physical activity with cancer. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(3):205-11. Epub 2008/02/01.

38. Alavanja MC, Samanic C, Dosemeci M, Lubin J, Tarone R, Lynch CF, et al. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *American journal of epidemiology*. 2003;157(9):800-14. Epub 2003/05/03.
39. Krušlin B, Tomas D. Patologija raka prostate. U: Šamija M, urednik. *Rak prostate – najvarijabilniji zloćudni tumor*. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. p. 41-52.
40. Jefferson K, Jefferson N. Prostate cancer. In: Probert LJ, editor. *Urology: an atlas of investigation and diagnosis*. Oxford: Clinical Publishing; 2009. p. 63-74.
41. Pasini J. Rak prostate. *Medicus*. 2001;10(2):201-5.
42. Šamija M. Klinički pregled i dijagnostika raka prostate. *Medix*. 2005;11:83-5.
43. Reljić A, Ružić B, Tomašković I, Šimundić AM, Šamija I, Šamija M, Kusić Z. Klinička slika i dijagnostika raka prostate. U: Šamija M, urednik. *Rak prostate – najvarijabilniji zloćudni tumor*. Zagreb: Medicinska Naklada; 2009. p. 71-136.
44. Loeb S, Carter HB. Early Detection, Diagnosis, and Staging of Prostate Cancer. In: Kavoussi LR Partin AW, Novick AC, Peters CA, editor. *Campbell-Walsh Urology*. 10 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 2763-70.
45. Makarov DV, Loeb S, Getzenberg RH, Partin AW. Biomarkers for prostate cancer. *Annual review of medicine*. 2009;60:139-51. Epub 2008/10/25.
46. Duijvesz D, Jenster G. Tumor Markers. In: Ashutosh T, editor. *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective* London: Springer; 2013. p. 423-44.
47. Getzenberg RH, Partin AW. Prostate Cancer Tumor Markers. In: Kavoussi LR, Partin AW, Novick AC, Peters CA, editor. *Campbell-Walsh Urology*. 10 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 2748-62.
48. Mikolajczyk SD, Song Y, Wong JR, Matson RS, Rittenhouse HG. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? *Clinical biochemistry*. 2004;37(7):519-28. Epub 2004/07/06.

49. Loeb S, Catalona WJ. Prostate-specific antigen in clinical practice. *Cancer letters*. 2007;249(1):30-9. Epub 2007/01/30.
50. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *Jama*. 1993;270(7):860-4. Epub 1993/08/18.
51. Peyromaure M, Fulla Y, Debre B, Dinh-Xuan AT. Pro PSA : a "pro cancer" form of PSA? *Medical hypotheses*. 2005;64(1):92-5. Epub 2004/11/10.
52. Mikolajczyk SD, Rittenhouse HG. Pro PSA: a more cancer specific form of prostate specific antigen for the early detection of prostate cancer. *The Keio journal of medicine*. 2003;52(2):86-91. Epub 2003/07/17.
53. Loeb S, Catalona WJ. What to do with an abnormal PSA test. *The oncologist*. 2008;13(3):299-305. Epub 2008/04/02.
54. You J, Cozzi P, Walsh B, Willcox M, Kearsley J, Russell P, et al. Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2010;73(1):10-22. Epub 2009/03/31.
55. Hong SK. Kallikreins as biomarkers for prostate cancer. *BioMed research international*. 2014;2014:526341. Epub 2014/05/09.
56. Trabulsi EJ, Hapelrn E, Gomella LG. Ultrasonography and Biopsy of the Prostate. In: Kavoussi LR, Partin AW, Novick AC, Peters CA, editor. *Campbell-Walsh Urology*. 10 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 2735-47.
57. Knezevic M, Galic J, Tucak A, Ebling Z. The results after transrectal prostate biopsy with 12 biopsy cores taken. *Collegium antropologicum*. 2004;28 Suppl 2:243-50. Epub 2004/12/02.

58. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological reviews*. 2000;52(2):237-68. Epub 2000/06/02.
59. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-87. Epub 2011/09/20.
60. Yoo SY, Kwon SM. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:127170. Epub 2013/08/29.
61. Lešin J, Zlopata G, Plavec A, Aleksandrova-Stanojević A, Vujić G. Angiogeneza u malignih tumorima. *MEDICUS*. 2008;17(1):143-8.
62. Zabaleta J, Su LJ, Lin HY, Sierra RA, Hall MC, Sartor AO, et al. Cytokine genetic polymorphisms and prostate cancer aggressiveness. *Carcinogenesis*. 2009;30(8):1358-62. Epub 2009/05/29.
63. Sun J, Turner A, Xu J, Gronberg H, Isaacs W. Genetic variability in inflammation pathways and prostate cancer risk. *Urologic oncology*. 2007;25(3):250-9. Epub 2007/05/08.
64. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*. 1995;1(1):27-31. Epub 1995/01/01.
65. Dedić Plavletić N, Letilović T, Vrbanec D. Uloga angiogeneze u rastu i progresiji tumora. *Liječnički Vjesnik*. 2003;125:260-5.
66. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*. 1971;285(21):1182-6. Epub 1971/11/18.
67. Harper J, Moses MA. Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications. *Exs*. 2006(96):223-68. Epub 2005/12/31.
68. Nicholson B, Schaefer G, Theodorescu D. Angiogenesis in prostate cancer: biology and therapeutic opportunities. *Cancer metastasis reviews*. 2001;20(3-4):297-319. Epub 2002/06/28.

69. Sfar S, Saad H, Mosbah F, Chouchane L. Combined effects of the angiogenic genes polymorphisms on prostate cancer susceptibility and aggressiveness. *Molecular biology reports*. 2009;36(1):37-45. Epub 2007/10/06.
70. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *The American journal of pathology*. 1995;147(1):9-19. Epub 1995/07/01.
71. Izawa JI, Dinney CP. The role of angiogenesis in prostate and other urologic cancers: a review. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2001;164(5):662-70. Epub 2001/03/22.
72. Cox MC, Permenter M, Figg WD. Angiogenesis and prostate cancer: important laboratory and clinical findings. *Current oncology reports*. 2005;7(3):215-9. Epub 2005/04/26.
73. Ikram Nadeem HK, Tufail Samina. Cytokines. *International Journal of Pathology*. 2004;2(1):47-58.
74. Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. *The Journal of nutrition*. 2007;137(1 Suppl):194S-9S. Epub 2006/12/22.
75. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45. Epub 2001/03/07.
76. Thomas-Tikhonenko A, Hunter CA. Infection and cancer: the common vein. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(1):67-77.
77. Ono M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer science*. 2008;99(8):1501-6. Epub 2008/08/30.
78. Jin P, Panelli MC, Marincola FM, Wang E. Cytokine polymorphism and its possible impact on cancer. *Immunologic research*. 2004;30(2):181-90. Epub 2004/10/13.

79. Nadler RB, Koch AE, Calhoun EA, Campbell PL, Pruden DL, Bennett CL, et al. IL-1beta and TNF-alpha in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis. *The Journal of urology*. 2000;164(1):214-8. Epub 2000/06/07.
80. Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, Ueda S, Kimura YN, Hamano S, et al. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(11):2979-91. Epub 2005/10/22.
81. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(5):2645-50. Epub 2003/02/25.
82. Michaud DS, Daugherty SE, Berndt SI, Platz EA, Yeager M, Crawford ED, et al. Genetic polymorphisms of interleukin-1B (IL-1B), IL-6, IL-8, and IL-10 and risk of prostate cancer. *Cancer research*. 2006;66(8):4525-30. Epub 2006/04/19.
83. Loureiro RM, D'Amore PA. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16(1):77-89. Epub 2005/03/01.
84. Chua KH, Lau TP, Tee ZY, Tan SY, Lian LH. Genetic Polymorphisms of the Interleukin-1 beta (IL-1 β) -511 and +3954 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Malaysian Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Patients. *Journal of Health Science*. 2009;55(4):65-662.
85. Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TW, et al. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(6):1976-83. Epub 2004/06/10.
86. Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine & growth factor reviews*. 1997;8(4):253-65. Epub 1998/06/10.

87. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000;404(6776):398-402. Epub 2000/04/04.
88. Zabaleta J, Schneider BG, Ryckman K, Hooper PF, Camargo MC, Piazuelo MB, et al. Ethnic differences in cytokine gene polymorphisms: potential implications for cancer development. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(1):107-14. Epub 2007/07/10.
89. Wang N, Zhou R, Wang C, Guo X, Chen Z, Yang S, et al. -251 T/A polymorphism of the interleukin-8 gene and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis based on 42 case-control studies. *Molecular biology reports*. 2012;39(3):2831-41. Epub 2011/06/18.
90. Gao LB, Pan XM, Jia J, Liang WB, Rao L, Xue H, et al. IL-8 -251A/T polymorphism is associated with decreased cancer risk among population-based studies: evidence from a meta-analysis. *European journal of cancer*. 2010;46(8):1333-43. Epub 2010/04/20.
91. Kooijman R, Himpe E, Potikanond S, Coppens A. Regulation of interleukin-8 expression in human prostate cancer cells by insulin-like growth factor-I and inflammatory cytokines. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2007;17(5):383-91. Epub 2007/05/22.
92. Murphy C, McGurk M, Pettigrew J, Santinelli A, Mazzucchelli R, Johnston PG, et al. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(11):4117-27. Epub 2005/06/03.
93. Yang HP, Woodson K, Taylor PR, Pietinen P, Albanes D, Virtamo J, et al. Genetic variation in interleukin 8 and its receptor genes and its influence on the risk and prognosis of

prostate cancer among Finnish men in a large cancer prevention trial. *Eur J Cancer Prev.* 2006;15(3):249-53. Epub 2006/05/09.

94. Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, et al. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2000;6(5):2104-19. Epub 2000/05/18.

95. Savage SA, Hou L, Lissowska J, Chow WH, Zatonski W, Chanock SJ, et al. Interleukin-8 polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in a Polish population. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2006;15(3):589-91. Epub 2006/03/16.

96. Sfar S, Hassen E, Saad H, Mosbah F, Chouchane L. Association of VEGF genetic polymorphisms with prostate carcinoma risk and clinical outcome. *Cytokine.* 2006;35(1-2):21-8. Epub 2006/08/16.

97. Jackson MW, Bentel JM, Tilley WD. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *The Journal of urology.* 1997;157(6):2323-8. Epub 1997/06/01.

98. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2002;20(21):4368-80. Epub 2002/11/01.

99. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood.* 2005;105(4):1383-95. Epub 2004/10/09.

100. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management.* 2006;2(3):213-9. Epub 2007/03/01.

101. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76. Epub 2003/06/05.
102. Duque JL, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff P, Mazzucchi E, Freeman MR. Measurement of plasma levels of vascular endothelial growth factor in prostate cancer patients: relationship with clinical stage, Gleason score, prostate volume, and serum prostate-specific antigen. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006;61(5):401-8. Epub 2006/10/31.
103. Langsenlehner T, Langsenlehner U, Renner W, Krippel P, Mayer R, Wascher TC, et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the gene for vascular endothelial growth factor and risk of prostate cancer. *European journal of cancer*. 2008;44(11):1572-6. Epub 2008/06/03.
104. Onen IH, Konac E, Eroglu M, Guneri C, Biri H, Ekmekci A. No association between polymorphism in the vascular endothelial growth factor gene at position -460 and sporadic prostate cancer in the Turkish population. *Molecular biology reports*. 2008;35(1):17-22. Epub 2007/01/12.
105. Naykoo NA, Hameed I, Aasif M, Shaffi S, Yousuf Q, Bhat IA, et al. Single nucleotide polymorphisms, haplotype association and tumour expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene with lung carcinoma. *Gene*. 2013. Epub 2013/03/06.
106. Jacobs EJ, Hsing AW, Bain EB, Stevens VL, Wang Y, Chen J, et al. Polymorphisms in angiogenesis-related genes and prostate cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2008;17(4):972-7. Epub 2008/04/10.
107. Palli D, Saieva C, Luzzi I, Masala G, Topa S, Sera F, et al. Interleukin-1 gene polymorphisms and gastric cancer risk in a high-risk Italian population. *The American journal of gastroenterology*. 2005;100(9):1941-8. Epub 2005/09/01.

108. Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes and immunity*. 2006;7(4):269-76. Epub 2006/04/28.
109. Lurje G, Zhang W, Schultheis AM, Yang D, Groshen S, Hendifar AE, et al. Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2008;19(10):1734-41. Epub 2008/06/14.
110. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer research*. 2002;62(12):3369-72.
111. Zabaleta J, Camargo MC, Piazuelo MB, Fonham E, Schneider BG, Sicinschi LA, et al. Association of interleukin-1beta gene polymorphisms with precancerous gastric lesions in African Americans and Caucasians. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(1):163-71. Epub 2006/01/13.
112. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, et al. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology*. 1998;51(1):161-7. Epub 1998/02/11.
113. Russo G, Mischi M, Scheepens W, De la Rosette JJ, Wijkstra H. Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging. *BJU international*. 2012;110(11 Pt C):E794-808. Epub 2012/09/11.
114. Taverna G, Grizzi F, Colombo P, Graziotti P. Is angiogenesis a hallmark of prostate cancer? *Frontiers in oncology*. 2013;3:15. Epub 2013/02/08.
115. Moore BB, Arenberg DA, Stoy K, Morgan T, Addison CL, Morris SB, et al. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *The American journal of pathology*. 1999;154(5):1503-12. Epub 1999/05/18.

116. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2002;11(12):1513-30. Epub 2002/12/24.
117. Zhang AQ, Pan W, Gao JW, Yue CL, Zeng L, Gu W, et al. Associations between interleukin-1 gene polymorphisms and sepsis risk: a meta-analysis. *BMC medical genetics*. 2014;15:8. Epub 2014/01/17.
118. Vairaktaris E, Serefoglou Z, Yapijakis C, Stathopoulos P, Vassiliou S, Derka S, et al. The interleukin-1 beta gene polymorphism +3953 C/T is not associated with risk for oral cancer. *Anticancer research*. 2007;27(6B):3981-6. Epub 2008/01/30.
119. Engels EA, Wu X, Gu J, Dong Q, Liu J, Spitz MR. Systematic evaluation of genetic variants in the inflammation pathway and risk of lung cancer. *Cancer research*. 2007;67(13):6520-7. Epub 2007/06/29.
120. Snoussi K, Strosberg AD, Bouaouina N, Ben Ahmed S, Chouchane L. Genetic variation in pro-inflammatory cytokines (interleukin-1beta, interleukin-1alpha and interleukin-6) associated with the aggressive forms, survival, and relapse prediction of breast carcinoma. *European cytokine network*. 2005;16(4):253-60. Epub 2006/02/09.
121. Balasubramanian SP, Azmy IA, Higham SE, Wilson AG, Cross SS, Cox A, et al. Interleukin gene polymorphisms and breast cancer: a case control study and systematic literature review. *BMC cancer*. 2006;6:188. Epub 2006/07/18.
122. Zabaleta J, Lin HY, Sierra RA, Hall MC, Clark PE, Sartor OA, et al. Interactions of cytokine gene polymorphisms in prostate cancer risk. *Carcinogenesis*. 2008;29(3):573-8. Epub 2008/01/05.

123. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Ahmed SB, Helal AN, Chouchane L. Genetic variation in IL-8 associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *Human immunology*. 2006;67(1-2):13-21. Epub 2006/05/16.
124. Lee WP, Tai DI, Lan KH, Li AF, Hsu HC, Lin EJ, et al. The -251T allele of the interleukin-8 promoter is associated with increased risk of gastric carcinoma featuring diffuse-type histopathology in Chinese population. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(18):6431-41. Epub 2005/09/17.
125. Uehara H, Troncoso P, Johnston D, Bucana CD, Dinney C, Dong Z, et al. Expression of interleukin-8 gene in radical prostatectomy specimens is associated with advanced pathologic stage. *The Prostate*. 2005;64(1):40-9. Epub 2005/01/15.
126. Kim SJ, Uehara H, Karashima T, McCarty M, Shih N, Fidler IJ. Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia*. 2001;3(1):33-42. Epub 2001/04/28.
127. Van Moorselaar RJ, Voest EE. Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Molecular and cellular endocrinology*. 2002;197(1-2):239-50. Epub 2002/11/15.
128. Lin CC, Wu HC, Tsai FJ, Chen HY, Chen WC. Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer. *Urology*. 2003;62(2):374-7. Epub 2003/08/02.
129. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(9):2496-508. Epub 2009/09/17.

130. The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA)2004.

131. Kohli M, Kaushal V, Spencer HJ, Mehta P. Prospective study of circulating angiogenic markers in prostate-specific antigen (PSA)-stable and PSA-progressive hormone-sensitive advanced prostate cancer. *Urology*. 2003;61(4):765-9. Epub 2003/04/03.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1. srpnja 1967. godine u Osijeku. Osnovnu i srednju školu pohađala sam u Osijeku, Đakovu i Zagrebu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1986. godine a diplomirala sam 1991. godine. Obavezni pripravnički staž provela sam u Domu zdravlja Osijek i u Domu zdravlja Črnomerec od 1991. do 1992. godine. Državni ispit položila sam 1993. godine.

U razdoblju od 1993. godine do 1999. godine radila sam u Medicinsko-biokemijskom laboratoriju Doma zdravlja Osijek.

Specijalizaciju iz medicinske biokemije započela sam 1999. godine u Odjelu za medicinsku biokemiju Kliničke bolnice Osijek a specijalistički ispit položila sam u veljači 2003. godine i od tada radim kao specijalist medicinske biokemije u Odjelu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Poslijediplomski doktorski studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završila sam 2009. godine a 2012. godine završila sam razlikovni doktorski poslijediplomski studij biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku.

Od 1995.-2003. godine bila sam predavač (suradnik u nastavi) u Medicinskoj školi Osijek, za predmet Opća biokemija. Od 2007. godine sudjelujem u nastavi na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku u sklopu kolegija Sudska medicina a od 2009. godine kao naslovni asistent iz znanstvenog područja biomedicine i zdravstva, znanstvenog polja kliničke medicinske znanosti, znanstvene grane klinička biokemija, na Katedri za patološku anatomiju i sudsku medicinu, na Medicinskom fakultetu u sastavu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Od 2011. godine sudjelujem u nastavi u sklopu kolegija Klinička biokemija s laboratorijskim tehnologijama I i Klinička biokemija I, od 2012. u sklopu kolegija Klinička biokemija s laboratorijskim tehnologijama II i Klinička biokemija II, od 2013. godine u sklopu kolegija Toksikološka kemija a od 2014. godine u sklopu kolegija Kontrola i osiguranje kvalitete u biomedicinskom laboratoriju na izvanrednom studiju Biomedicinsko-laboratorijskih tehnologija na Medicinskom fakultetu u sastavu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Stručno sam se usavršavala na tečajevima u Hrvatskoj i u Europi te aktivno sudjelovala na većem broju kongresa i simpozija te bila predavač na kongresima, simpozijima i u sklopu podružnice HDMBLM.

Autor sam i koautor više znanstvenih i stručnih radova objavljenih u Curent Contensu i drugim indeksiranim časopisima a također sam i koautor više poglavlja u sveučilišnom udžbeniku Osnove forenzične toksikologije, D. Sutlović i sur., Redak 2011.

Aktivno vladam engleskim jezikom. Član sam HDMBLM, HKMB (predsjednica sam III. Područnog vijeća), HLZ, Hrvatskog društva sudskih medicinara i toksikologa pri HLZ, HDSV (stalni sam sudski vještak za kemiju i toksikologiju od 2012. godine) te Radne skupine za sustav ranog upozoravanja u slučaju pojave nove psihoaktivne tvari u RH, Ureda za suzbijanje zlouporabe opojnih droga, Vlada RH. Udana sam.