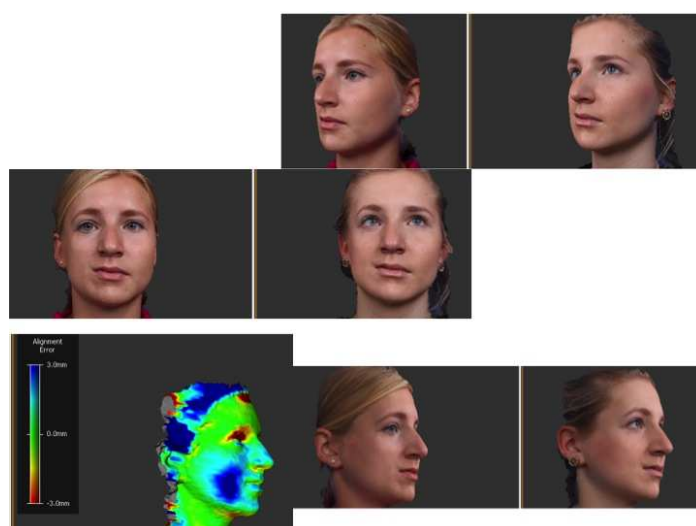


# OBČIANSKE ZDRUŽENIE MAMMA FEMININA

doc. RNDr. Ivan Varga, PhD.

## BIOMEDICÍNSKY VÝSKUM II.

ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC



Bratislava 2014

## **Biomedicínsky výskum II.**

Editor: doc. RNDr. Ivan Varga, PhD.

Vydal: © Občianske združenie Mamma Feminina, Bratislava, 2014

Recenzenti: doc. MUDr. Eliška Kubíková, PhD.  
doc. MUDr. Daniel Böhmer, PhD.

Publikácia neprešla jazykovou korektúrou a za odbornú stránku zodpovedajú autori.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani žiadnu jeho časť nemožno reprodukovať, ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez písomného súhlasu majiteľa autorských práv.

**ISBN: 978-80-971370-1-4**

## OBSAH

1.	Anna Nádaždyová, Andrej Thurzo, Peter Stanko: <b>Súčasnú možnosti 3D analýzy mäkkých tkanív tváre</b> .....	3
2.	Martin Boháč, Andrej Thurzo, Anna Nádaždyová, Lukáš Šimko, Vladimír Bella, Jozef Fedeleš sen.: <b>Využitie DI3D scanu na meranie objemov tkaniva pri autotransplantácii tuku</b> .....	9
3.	Peter Záhorec, Miroslav Tomáš, Dorota Červenková, Martin Boháč, Ján Koller: <b>Mezenchymálne kmeňové bunky ako možná terapia hypertrofických jaziev – literárny prehľad</b> .....	16
4.	Stanislav Žiaran: <b>Novel candidate biomarkers for determination prostate cancer diagnosis and prognosis</b> .....	22
5.	Peter Weismann, Eva Weismanová, Marta Škultétyová, Ján Markus: <b>Genetické vyšetrenie pacientky s karcinómom prsníka so zameraním na význam individuálnej liečby</b> .....	30
6.	Peter Weismann, Hisham El Falougy: <b>Variácie <i>Arteria communicans posterior</i>: morfológická štúdia</b> .....	32
7.	Ľuboš Danišovič, Zuzana Varchulová Nováková, Stanislav Žiaran: <b>Hypermethylation of DNA – new biomarker for prostate cancer (mini review)</b> .....	36

# SúčasnÉ možnosti 3D analýzy mäkkých tkanív tváre

Anna Nádaždyová, Andrej Thurzo, Peter Stanko

*Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave a Onkologický ústav Svätej Alžbety, Heyduková 10, 812 50, Bratislava*

## Abstrakt

Hodnotenie mäkkých tkanív tváre je v čelústnej ortopédii kľúčovým krokom pre stanovenie optimálneho liečebného plánu. Neustále sa zvyšujúci tlak zo strany pacientov na zlepšenie ich výzoru podčiarkuje nutnosť exaktnej analýzy. Posudzovanie tvárových skenov metódou stanovenia vzdialeností a uhlov medzi referenčnými bodmi na 3D tvárových modeloch, respektíve metódou hodnotenia ich povrchového reliéfu poskytuje doteraz najpresnejšie a najdetailnejšie hodnotenie mäkkých tkanív. Dôvodom je skutočnosť, že proporcie tváre sa analyzujú v trojdimenzionálnom priestore. Hlavnou úlohou nášho prehľadového článku je predstaviť uvedené dve metódy, taktiež poukázať na výhody, ktoré analýza tvárových skenov poskytuje; tj. možnosť posúdenia asymetrie, stanovenia deviácie a možnosť volumetrického hodnotenia zmien vzniknutých v dôsledku liečby.

**Kľúčové slová:** analýza, tvárový sken, mäkké tkanivá

## Úvod

21. storočie je v čelústnej ortopédii charakterizované zmenou postoja k liečbe, a tým zmenou stanovenia hlavných liečebných cieľov. Pozornosť upriamenú na dosiahnutie ideálnych vzťahov tvrdých zubných tkanív, ako to bolo hlavne v období 20. storočia, strieda sústredenie sa na ideálne proporcie mäkkých tkanív, tj. výzor pacienta. Práve proporcionalitu mäkkých tkanív, výzor, vníma pacient najcitlivejšie. Aj keď tvrdé tkanivá vytvárajú podklad mäkkým tkanivám, a ako to bolo v minulom storočí, mohli by sme predpokladať, že dosiahnutím ideálnych proporcií tvrdých zubných tkanív dosiahneme optimálny výzor, tento postoj v období soft tissue paradigmu neplatí. Hlavným argumentom je, že kľúčový vplyv na estetiku tváre má hrúbka, respektíve objem mäkkých tkanív. Danú skutočnosť možno dokázať na stovkách pacientov, ktorí napriek odchýlkam v pozícii tvrdých tkanív disponujú atraktívnym vzhľadom. Na základe tohto poznania pri čelústno-ortopedickej liečbe uprednostňujeme existenciu menších odchýlok vo vzájomnom vzťahu tvrdých zubných štruktúr pred narušením estetiky tváre. Práve tieto argumenty pobádajú čelústnych ortopédov analyzovať mäkké tkanivá.

Posudzovanie proporcií mäkkých tkanív v 2D je v súčasnosti nedostatočné. Jeho limity spočívajú v hodnotení estetiky tváre v rovine, pričom nám, či už pri pohľade en face alebo z profilu, uniká tretí rozmer. Tento nedostatok možno eliminovať vďaka 3D tvárovým skenom, ktoré nám ponúkajú vernú reprodukciu tváre a možnosť prevedenia 3D analýz mäkkých tkanív v troch smeroch.

Najnovšia WHO klasifikácia z roku 2004 (tab. 2) sa výrazne neodlišuje od WHO/ISUP z roku 1998 a vychádza z dohody pracovnej skupiny uropatológov v Lyone z decembra 2002 (Eble et al., 2004).

## **Analýza mäkkých tkanív tváre na základe stanovenia vzdialeností a uhlov medzi referenčnými bodmi na 3D tvárových modeloch**

Analýzovanie 3D tvárových modelov pomocou vzdialeností a uhlov medzi referenčnými bodmi ponúka možnosť posúdenia veľkosti a proporcionality mäkkých tkanív v 3D priestore. Analýzu prevádzame prostredníctvom aplikácie bodov v programe Blender. Pri analýze vychádzame z prirodzenej polohy hlavy.

Antropometrické body (obr. 1) umiestnené v 3D na povrchu tvárového skenu:

- v spojitosti s nosom sú uvedené v tabuľke 1;
- v spojitosti s perou sú uvedené v tabuľke 2;
- v spojitosti s bradou sú uvedené v tabuľke 3;
- ďalšie dôležité antropometrické body sú uvedené v tabuľke 4.

Posudzované uhly a línie sú uvedené v tabuľke 5.



**Obr. 1.** Pozícia antropometrických bodov na povrchu tvárového skenu.

**Tab. 1.** Popis umiestnenia antropometrických bodov v spojitosti s nosom

<i>Pronasale (Pn)</i>	najprotrudovanejšie miesto na mäkkých tkanivách nosa
<i>Nasal ala (AL)</i>	najlaterálnejšie miesto na alárnej kontúre
<i>Alar curvature point (Ac)</i>	najlaterálnejší bod v priebehu zakrivenia bazálnej línie krídla nosa, znázorňujúci napojenie krídla nosa k tvári

**Tab. 2.** Popis umiestnenia antropometrických bodov v spojitosti s perou

<i>Cupid bow point (CBP)</i>	najvyššie miesto filtra na kontúre červene hornej pery
<i>Alar curvature - cheilion midpoint (ACMP)</i>	stred medzi alar curvature point (Ac) a cheilion
<i>Christa philtri (cph)</i>	bod v mieste kríženia línií vzhádzajúcich z vermilionu a prechádzajúcich vyvýšeným okrajom filtra
<i>Labrale inferius (Li)</i>	stred kontúry červene dolnej pery
<i>Lower lip bow point (LLBP)</i>	miesto zakrivenia na okraji červene dolnej pery
<i>Stomion (Stm)</i>	stred ústnej štrbiny pri jemne zavretých perách bod lokalizovaný na labiálnej commissure

**Tab. 3.** Popis umiestnenia antropometrických bodov v spojitosti s bradou

<i>Soft tissue B point (B)</i>	najhlbšie miesto na stredovej línii tváre medzi spodnou perou a bradou
<i>Soft tissue pogonion (Pog)</i>	najanteriornejší bod brady na stredovej línii tváre
<i>Soft tissue menton (Me)</i>	najnižšie uložený bod v stredovej línii na dolnom okraji mandibuly

**Tab. 4.** Ďalšie dôležité antropometrické body

<i>Endocanthion (en)</i>	bod na mäkkých tkanivách lokalizovaný na vnútornom krížení očnej štrbiny
<i>Exocanthion (ex)</i>	bod na mäkkých tkanivách lokalizovaný na vonkajšom krížení očnej štrbiny
<i>Soft tissue zygon (st zy)</i>	bod lokalizovaný na mäkkých tkanivách v mieste kríženia línie (orbitale – soft tissue porion) a (exocanthion – subaurale)
<i>Tragion (t)</i>	bod lokalizovaný v najkonkávnejšom mieste napájania sa horného okraja tragu
<i>Trichion (tr)</i>	bod lokalizovaný na vlasovej línii v mieste v stredu čela
<i>Soft tissue pogonion (pg)</i>	najanteriornejší bod stredu brady
<i>Pupil reconstructed point (prp)</i>	bod lokalizovaný v strede nosa na bipulárnej línii

**Tab. 5.** Posudzované línie a uhly

<i>V spojitosti s nosom</i>	$Al_{RT} - Al_{LT}$ $Ac_{RT} - Ac_{LT}$
<i>V spojitosti s hornou perou</i>	$ACMP_{Rt} - ACMP_{Lt}$ $CBP_{Rt} - CBP_{Lt}$ $Ls - Ac$ $Ch_{Rt} - Ls - Ch_{Lt} (^\circ)$
<i>V spojitosti s ústnym kútikom</i>	$Ch_{RT} - Ch_{LT}$
<i>V spojitosti s dolnou perou</i>	$LLBP_{Rt} - LLBP_{Lt}$ $Li - Ac$ $Ch_{RT} - Li - Ch_{Lt} (^\circ)$
<i>V spojitosti s výškou perí</i>	$Sn - Ls$ $Ls - Stm$ $Stm - Li$ $Ls - Li$
<i>V spojitosti s výškou brady</i>	$Stm - B$ $Stm - Me$
<i>V spojitosti s anteriornou dolnou výškou tváre</i>	$Sn - B$ $Sn - Me$
<i>V spojitosti s horným Vermilionom</i>	$Ch - CBP$
<i>V spojitosti so stomionom</i>	$Ch_{RT} - Stm - Ch_{Lt} (^\circ)$ $Ls - Stm - Li (^\circ)$
<i>Výška tváre</i>	$Te - Me$
<i>Výška strednej a dolnej tretiny tváre</i>	$n - pg$
<i>Výška dolnej tretiny tváre</i>	$sn - pg$
<i>Stredná šírka tváre</i>	$t_r - t_l$
<i>Šírka spodnej časti tváre</i>	$gor - gol$
<i>Hĺbka spodnej časti tváre</i>	$pg - (t_r - t_l)$
<i>Dĺžka tela sánky</i>	$pg - (go_r - go_l)$
<i>Vzdialenosť hornej pery k E línií</i>	$Ls - (prn - pg)$
<i>Pomer posteriornej výšky dolnej časti tváre/anteriornej výšky dolnej časti tváre</i>	$t - go / sn - pg$
<i>Konvexita hornej časti tváre</i>	$ex_r - n - ex_l$
<i>Konvexita dolnej časti tváre v horizontálnej rovine</i>	$t_r - pg - t_l$
<i>Konvexita tela sánky</i>	$go_r - pg - go_l$
<i>Pravostranný goniový uhol</i>	$t_r - go - pg$
<i>Ľavostranný goniový uhol</i>	$t_l - go - pg$
<i>Konvexita tváre zahŕňajúca nos</i>	$n - prn - pg$
<i>Tvárová divergencia</i>	$t - ac / go - pg$
<i>Interlabial</i>	$sn - ls / sl - pg$

### 3D analýza povrchového reliéfu a objemových zmien tváre

Hoci 3D analýza mäkkých tkanív tváre na základe stanovenia vzdialeností a uhlov medzi referenčnými bodmi ponúka cenné metrické zhodnotenie jej proporcií, 3D analýza povrchového reliéfu a objemových zmien je schopná exaktne analyzovať priestorové zmeny ako konkavity a konvexity tváre.

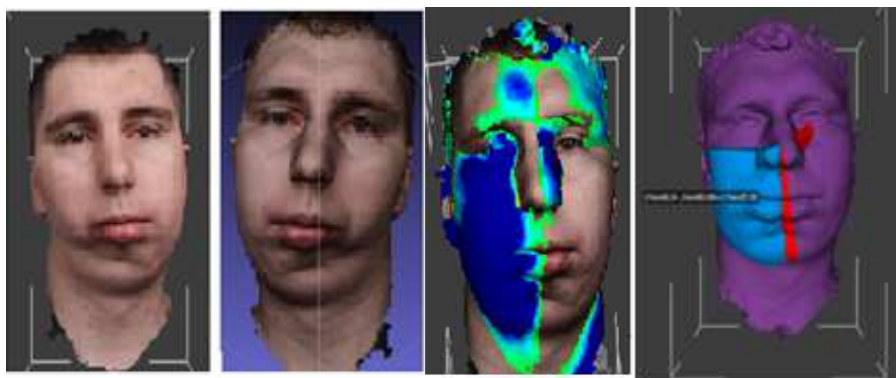
Prostredníctvom 3D analýzy povrchu tvárových skenov sme schopní posúdiť napr. symetriu tváre, objemové zmeny mäkkých tkanív v oblasti pier pri posunoch zubov, či zmeny spôsobené ortognátnymi operáciami.

#### Posúdenie symetrie tváre

Vo všeobecnosti možno povedať, že u každého človeka možno nájsť určitý stupeň asymetrie. Pacientov s vyšším stupňom asymetrie vnímame ako osoby s estetickou odchýlkou a často krát sami pre túto skutočnosť vyhľadávajú liečbu.

Posudzovanie symetrie tváre sa uskutočňuje prekryvaním vlastného 3D skenu jeho 3D zrkadlovým obrazom. Týmto postupom dosiahneme to, že pravá polovica tváre sa prekryva ľavou polovicou tváre a analogicky ľavá polovica jej pravou polovicou. Výsledkom prekryvania je diferenciálna mapa, ktorá označí miesta, kde nedošlo k absolútnemu prekrytiu, ale je medzi nimi určitá vzdialenosť. Táto vzdialenosť je vyhodnotená farebne. Jej veľkosť možno odčítať podľa nastavenej mierky. V našom prípade sú miesta, s maximálnym prekryvom tvárových skenov symetrické miesta, znázornené zelenou farbou. Odtieňmi modrej, červenej, či žltej sú označené miesta, ktoré sú asymetrické. Na základe diferenciálnej mapy sme teda schopní exaktne určiť oblasti s asymetriou a následne vypočítať chýbajúci, respektíve nadbytočný objem tkanív prostredníctvom programu DI3D capture.

3D analýza súmernosti tváre u pacientov s viditeľnou odchýlkou je nenahraditeľná forma rozboru proporcionality tváre. Na základe výsledkov z prevedeného merania možno stanoviť rozsah a objem diskrepancie medzi „polovicami“ a dopočítať tak požadované množstvo tkanív. Súčasný technologický pokrok nám ponúka možnosť virtuálneho modelovania, a teda možnosť exaktného stanovenia ideálneho výsledku liečby asymetrie.



**Obr. 2.** Posúdenie asymetrie tváre: vlastný tvárový sken, zrkadlový obraz tvárového skenu, diferenciálna mapa, volumetrické vyhodnotenie

### Zmena povrchu reliéfu, objemu mäkkých tkanív pri zmene polohy zubov

Povrchové zmeny reliéfu tváre ako aj objemové zmeny nastávajú pri každom posune zubov. Na 3D modeli možno analýzou povrchového reliéfu presne určiť miesta s nárastom respektíve úbytkom mäkkých tkanív hlavne v oblasti pier. Uvedeným spôsob možno vyhodnotiť zmeny výzoru tváre v 3D pred a po ukončení čelustno-ortopedickej liečby

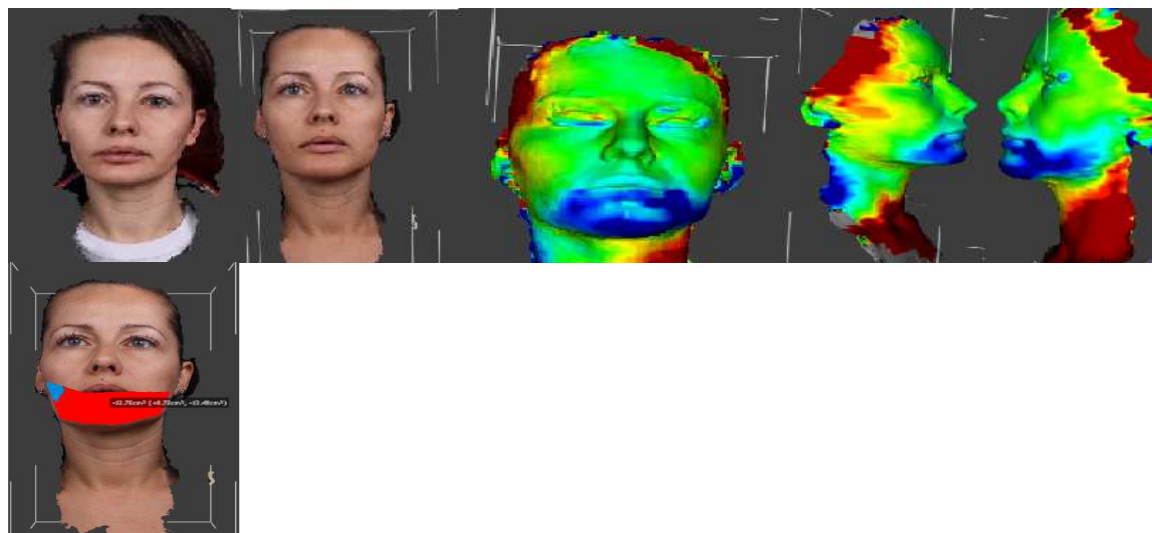
Postup získavania diferenciálnej mapy a vyhodnotenia volumetrických zmien je analogický k postupu prevádzanom pri posudzovaní asymetrie. Pri posudzovaní objemových zmien, ako dôsledok zmeny polohy zubov, prekryvame 3D tvárový model pacienta získaný pred čelustno – ortopedickou liečbou s 3D tvárovým modelom pacienta po liečbe. Výsledkom prekryvania je opäť diferenciálna mapa, ktorá farebne označí miesta s maximálnym prekryvom mriežok 3D tvárových modelov, teda miesta bez zmeny a miesta, kde sa nachádza medzi mriežkami určitá vzdialenosť, tj. miesta, kde došlo k objemovým zmenám.



**Obr. 3.** Zmena povrchu reliéfu, objemu mäkkých tkanív pri zmene polohy zubov: 3D tvárový sken pacientky pred liečbou, 3D tvárový sken pacientky po liečbe, diferenciálna mapa znázorňujúca zmenu v oblasti pier

## Zmena povrchového reliéfu, objemu mäkkých tkanív pri ortognátnych zákrokoch

Ortognátne operácie, ako operácie sústreďujúce sa prevažne na anteroposteriórne posuny maxily a mandibuly, markantne menia výzor pacienta. Mandibulárny setback, maxillárny advancement či ďalšie typy chirurgických zákrokov môžeme vopred virtuálne nasimulovať. Opäť pri tom dbáme na paradigmu 21. storočia, ktorá umiestňuje ideálne proporcie mäkkých tkanív na prvé miesto a podľa tohto rebríčka hodnôt predbežne simulujeme požadovaný výzor pacienta. Polohovanie tvrdých zubných tkanív je síce významné, no druhoradé.



**Obr. 4.** Zmena povrchového reliéfu, objemu mäkkých tkanív pri ortognátnych zákrokoch: 3D tvárový sken pacientky pred mandibulárnym advancementom, 3D tvárový sken pacientky po mandibulárnom advancemente, diferencialna mapa - pohľad en face, diferencialna mapa - pohľady z profilu, volumetrické vyhodnotenie zmien

### Diskusia

V súčasnosti, v období, kedy sa kladie dôraz na atraktívny vzhľad, sú čelustní ortopédi nútení upriamiť svoju pozornosť na mäkké tkanivá. Hoci zabezpečenie funkčnej oklúzie stále predstavuje prvoradý predmet záujmu, menšie odchýlky medzičelustných vzťahov sú tolerovateľné na úkor dosiahnutia ideálnych proporcií mäkkých tkanív. Nakoniec, adaptácia mäkkých tkanív k novovytvorenej pozícii zubov determinuje, či výsledok čelustno – ortopedickej liečby bude stabilný. Analýza 3D modelu predstavuje najpresnejší postup hodnotenia mäkkých tkanív tváre. Tretí rozmer eliminuje skreslenie hodnôt jednotlivých proporcií. Štúdium 3D modelov dnes prevádzame dvomi možnými postupmi: 1. Analýzou mäkkých tkanív tváre na základe stanovenia vzdialeností a uhlov medzi referenčnými bodmi na 3D tvárových modeloch; 2. 3D analýzou povrchového reliéfu a objemových zmien tváre. Prostredníctvom nich možno posúdiť asymetrie a mieru deviácie jednotlivých proporcií. Vyhodnotením odchýlky získavame potrebné údaje, ktoré nám výrazne uľahčujú a spresňujú tvorbu liečebného plánu. Prostredníctvom tvárových skenov máme možnosť záverečného prehodnotenia výsledku terapie na základe prepočítania hodnôt proporcií a ich objemových zmien.

### Záver

3D analýza tvárových skenov či už na základe stanovenia vzdialeností a uhlov medzi referenčnými bodmi na 3D tvárových modeloch alebo analýza povrchového reliéfu a objemových zmien tváre ponúka v súčasnosti najexaktnejší spôsob hodnotenia mäkkých tkanív. Vzhľadom na to, že mäkké tkanivá sú v 21. storočí hlavným determinantom výsledku terapie, od ktorého závisia ďalšie kroky liečby jednotlivých druhov maloklúzie, uvedené postupy sú schopné zefektívniť stanovenie diagnózy, určiť požadovaný výsledok terapie a tým optimalizovať liečebný plán a v konečnom dôsledku urýchliť liečbu a zvýšiť spokojnosť pacienta s výsledkom terapie.



### **Použitá literatúra**

1. Poffit W.R., Fields H.W., Sarver D.M. Contemporary orthodontics. 5th edition. St. Louis: Mosby, 2012, 768s. ISBN 978-0323083171.
2. Al-Sanea R.A., Kusnoto B., Evans C.A. 3D facial soft tissue changes due to orthodontic tooth movement. In: Orthodontics - Basic Aspects and Clinical Considerations. Bourzgui F. (ed.). Rijeka: InTech, 2012, 29-52.
3. Plooij J.M., Swennen G.R., Rangel F.A., Maal T.J., Schutyser F.A., Bronkhorst E.M., Kuijpers-Jagtman A.M., Bergé S.J. Evaluation of reproducibility and reliability of 3D soft tissue analysis using 3D stereophotogrammetry. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009;38(3):267-73.
4. Deli R., Galantucci L.M., Laino A., D'Alessio R., Di Gioia E., Savastano C., Lavecchia F., Percoco G. Three-dimensional methodology for photogrammetric acquisition of the soft tissues of the face: a new clinical-instrumental protocol. *Prog Orthod.* 2013;14:32.

# Využitie DI3D scanu na meranie objemov tkaniva pri autotransplantácii tuku

Martin Boháč<sup>1</sup>, Andrej Thurzo<sup>2</sup>, Anna Nádaždyová<sup>2</sup>, Lukáš Šimko<sup>1</sup>, Vladimír Bella<sup>3</sup>, Jozef Fedeleš sen.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika plastickej estetickej a rekonštrukčnej chirurgie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave a UNB Ružinov, Pažitková 4, 821 01, Bratislava; <sup>2</sup>Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave a Onkologická ústav Svätej Alžbety, Heyduková 10, 812 50, Bratislava; <sup>3</sup>Mammologické oddelenie, Onkologický ústav Svätej Alžbety, Heyduková 10, 812 50, Bratislava

## Abstrakt

Zväčšovanie objemu mäkkých tkanív pri vrodených, získaných defektoch alebo za kozmetickým účelom, je možné realizovať pomocou autológneho tkaniva alebo pomocou cudzorodých materiálov. Autotransplantácia tuku je sľubnou metódou na augmentáciu mäkkých tkanív. Je výhodná v tom, že pri nej nedochádza ku komplikáciám spojeným s prítomnosťou cudzorodého materiálu a ďalšej tvorbe jaziev. Preto je v súčasnosti asi najfrekventnejšie rozoberanou témou v plastickej chirurgii. Táto procedúra je však momentálne stále vo vývoji a intenzívnom skúmaní jednotlivých jej krokov. My sme sa v našom výskume zamerali okrem iného aj na poslednú fázu zákroku a tou je mapovanie prežívania tukového tkaniva po autotransplantácii, na čo sme využili skenovacie zariadenie DI3D scan. Cieľom tohto prehľadového článku je opísať možnosti úspešného využitia DI3D scanu aj v meraní objemu tkaniva pri autotransplantácii tuku a prezentácia nami zistených výsledkov.

**Kľúčové slová:** DI3D scan, meranie objemov, autotransplantácia tuku

## Úvod

Akokoľvek sú už prebádané procesy vrámci metodológie autotransplantácie tuku, stále zostáva táto metóda veľmi technicky závislá a exaktne málo predikovateľná. Jedným z faktorov, ktoré treba ešte doskúmať je aj to, akým spôsobom prežíva tukové tkanivo a zachováva si svoj objem po dlhšom čase bez mikrochirurgickej revaskularizácie a akými faktormi je to ovplyvnené. V literatúre sa uvádza percento úspešnosti prihojenia tuku v oblasti prsníkov v priemere okolo 55%, bez použitia expanzie, avšak v prípade jej použitia sa dá dosiahnuť až 90% úspešnosť. Čo sa týka prežitia tuku po aplikácii do oblasti tváre, je podľa literatúry toto percento o niečo vyššie v priemere okolo 60-70% vzhľadom na bohatú vaskularizáciu recipientného tkaniva.<sup>1,2</sup> Štandardná reprodukcia mäkkých tkanív bola až do súčasnosti problematická a trpela častými chybami merania či už pre ich pasívnu deformovateľnosť alebo aktívnu variabilitu (výraz tváre, opuchy, zmeny hmotnosti, vplyv gravitácie). Na objektivizovanie zmien mäkkých tkanív sa najčastejšie používa MRI vyšetrenie<sup>2</sup>, ktoré je však veľmi finančne náročné a obmedzene dostupné na frekventné používanie. Súčasné moderné diagnostické metódy priniesli širšie a prepracovanejšie možnosti hodnotenia mäkkých tkanív. Bolo však vyvinutých množstvo presnejších, či menej presných mapovacích systémov za účelom merania objemu. Štúdiá realizovaná Creasmanom et al bola asi najprepracovanejšia čo sa týka analýzy meraní zmien objemov mäkkých tkanív. Odprezentovali prácu ohľadom 4D zobrazenia a merania pri prsníkoch, s následným možným klinickým využitím. Mechanizmus automatizácie v kombinácii s 3D systémom teda nazvali 4D. Ich celý systém s názvom Precision Light, bol porovnávaný s MRI meraniami a dosiahol koreláciu 91% s predpokladanou deviáciou 9%. Dokázali reprodukovateľnosť meraní 4D systému na veľmi vysokej úrovni so spoľahlivosťou až 99,6%.<sup>3</sup>

## Materiál

V našom výskume boli realizované 3D analýzy u pacientiek, ktoré podstúpili autotransplantáciu tuku zo zdravotných i kozmetických príčin. Väčšina pacientiek v súbore bola, hospitalizovaná na Klinike plastickej, estetickej a rekonštrukčnej chirurgie SZU a Lekárskej fakulty UK UN v Bratislave od januára 2011 do januára 2014. U pacientiek bol následne hodnotený výsledok operácie pomocou DI3D scanu na Klinike stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie Lekárskej fakulty UK v Bratislave a Onkologického ústavu Svätej Alžbety. Súbor tvorilo dokopy 16 pacientiek. Vek pacientiek bol v priemere 43 rokov +/-

15,96 (SD), najmladšia mala 16 a najstaršia 68 rokov (tab.1). Každá pacientka podpísala informovaný súhlas a celá štúdia bola tiež schválená etickou komisiou UNB Ružinov.

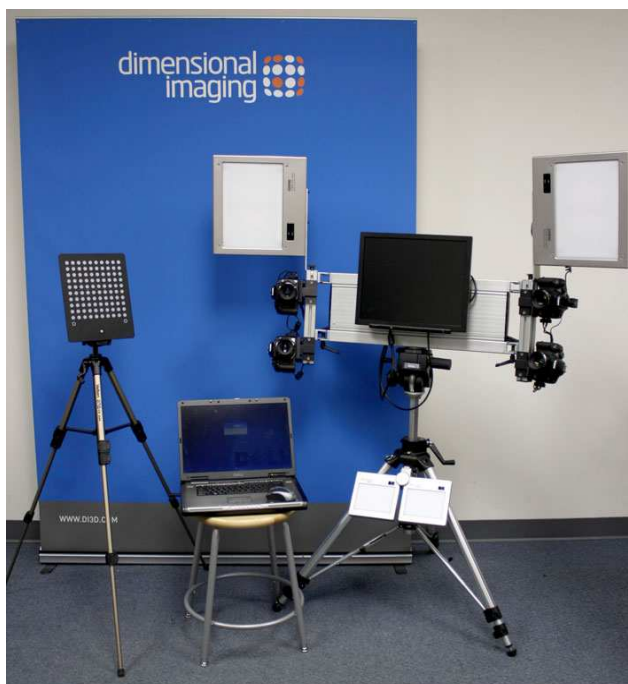
Dimensional Imaging predstavuje zariadenie prostredníctvom ktorého sme schopní získať 3D obraz častí tela pomocou pasívnej stereofotogrammetrie. Medzi jeho hlavné časti patria presne usporiadané a prekalibrované digitálne statické fotoaparáty ( najmenej dva). Hlavnou úlohou spomínaných fotoaparátov je vytvárať súbežne a okamžite obrázky. Prostredníctvom softvéru DI3D capture sa automaticky vytvorí stereo pár obrázkov. Na mieste, kde sa obrázky prekrývajú, dosiahneme zvýšenie denzity. Zmena hustoty v mieste prekrytia obrázkov je podklad pre vytvorenie mapy. Spomínaná mapa je vysoko účinná štruktúra, ktorá umožňuje ukladanie zahustených 3D dát. Každý pixel v mape predstavuje 3D postavenie toho pixelu v priestore. DI3D capture je schopný vypočítať 3D pozíciu každého pixelu vo vstupných obrázkoch, až 10 miliónov 3D bodov/ stereo pár alebo viac, v závislosti na rozlíšení použitých kamier. Získanie 3D modelu je rýchle a jednoduché, porovnateľné s bežným fotografovaním

Pri použití jedného páru stereoskopických fotoaparátov častotokrát nie je možné zachytiť všetky požadované povrchy. Riešenie tohto problému môžeme vidieť v použití viacerých stereo párov fotoaparátov, ktoré vytvoria súčasne 3D povrchy miest z viacerých pohľadov. Takto je možné, aby povrchy boli automaticky zlúčené a bezproblémovo vytvorili jednu 3D sieť.

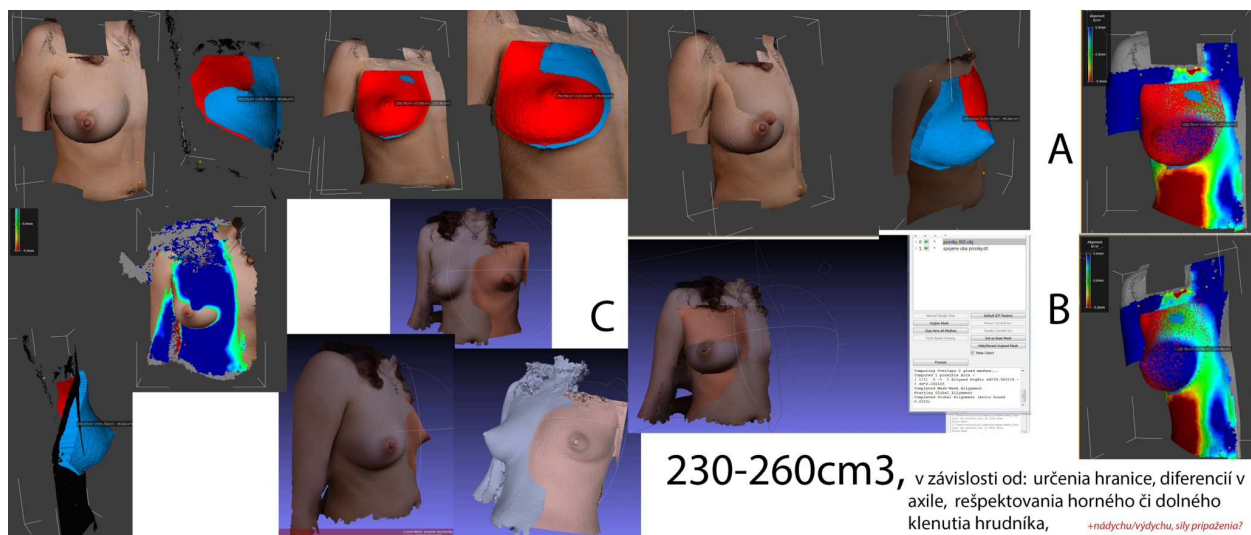
Pre vytvorenie skenov na našu 3D analýzu sme použili prístroj Dimensional Imaging so štyrmi stereoskopickými kamerami (obr. 1). Príslušné skeny vytvorené programom DI3D capture boli následne upravené v programe Blender tak, aby sme získali požadované zmeny v objeme mäkkých tkanív v pooperačnom procese a tým stanovili % úspešnosti prežívania transplantovaného tuku (obr. 3). Bolo teda možné stanoviť percento úspešnosti prihojenia transplantovaného tukového tkaniva, nakoľko sme vedeli presný objem tuku, ktorý sme aplikovali a následne, koľko nám reálne pribudlo. Pacientky boli snímané tesne predoperačne a následne pol roka od operácie

V predoperačnom procese nám u niektorých pacientiek sken napomohol určiť objem tkaniva, ktorý chýbal, v lokalite s tkanivovým deficitom, v porovnaní s kontralaterálnou resp. referenčnou oblasťou (obr. 2). Na základe tejto analýzy, sme vedeli objem tkaniva potrebný na aplikáciu počas operácie s cieľom dosiahnuť čo najoptimálnejšiu proporciu.

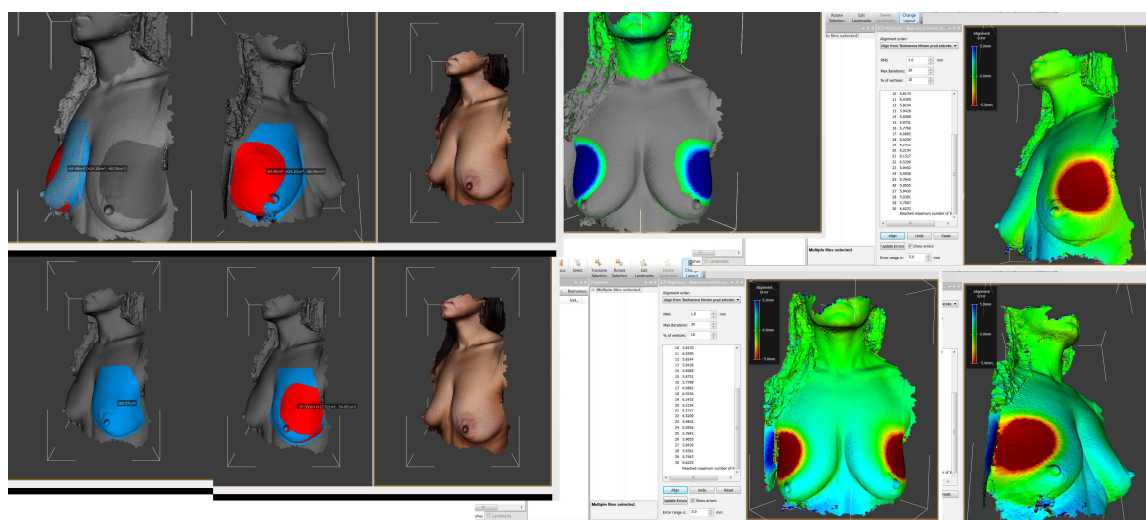
Blender je multiplatformový voľne šíriteľný softvér pre modelovanie a renderovanie 3D dát. Podporuje import a export rôznych 3D formátov počítačovej grafiky, umožňuje všetky základne funkcie vhodné pre manipuláciu a editáciu 3D modelu.



**Obr. 1.** DI3D Scan.



**Obr. 2.** Predoperačné stanovenie deficitu tkaniva pri jednostrannej hypoplázii prsníka pomocou DI3D scanu (Boháč, M.).



**Obr. 3.** Zobrazenie množstva pridaného tkaniva 6 mesiacov po aplikácii tuku do oblasti laterálnych horných kvadrantov prsníka pomocou DI3D Scanu (Boháč, M.).

## Metódy

Na prevedenie 3D analýzy objemu mäkkých tkanív bolo potrebné vytvorenie 3D modelov. 3D modely povrchových štruktúr mäkkých tkanív sme získali prostredníctvom prístroja Dimensional Imaging so štyrmi stereoskopickými fotoaparátmi. V našej práci sme sa rozhodli analyzovať zmeny objemu mäkkých tkanív tváre a prsníkov ako cieľových oblastí autotransplantácie tuku, preto sme uskutočnili skenovanie samostatne u oboch typov nasledujúcim spôsobom: Pacient sedel na stoličke oproti tvárovému skeneru so zatvorenými ústami v pokojovom stave bez úsmevu. Hľadeli priamo pred seba na stojan, ktorý držal statické fotoaparáty. Vlasy mal upravené tak, aby nezakrývali žiadne proporcie tváre. Po zapnutí prístroja a uvedenom polohovaní pacienta sme dbali na to, aby každý fotoaparát zachytil tvár, čo sme kontrolovali tým, že v programe DI3D capture sa zobrazili všetky štyri pohľady na tvár a previedli sme skenovanie. Následnou fúziou obrazov sme v uvedenom programe získali 3D model. Obdobným spôsobom sme realizovali analýzu prsníkov vo vzpriamenej polohe a expíriu pacientky.

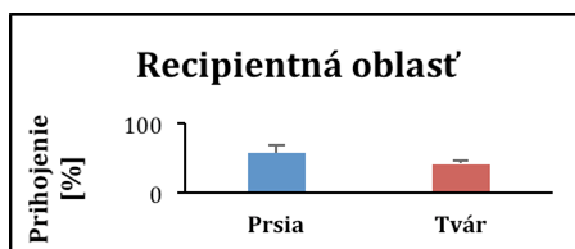
Pomocou softvéru DI3D capture sme exportovali 3D skeny do formátu OBJ. Tento formát dobre reprezentuje 3D geometriu a zachováva mapovacie súradnice modelov. Súčasne pri exportovaní z DI3D capture dostávame aj súbor vo formáte MTL, ktorý vyjadruje vizuálne vlastnosti materiálu. Oba tieto súbory importujeme do programu Blender.

## Výsledky

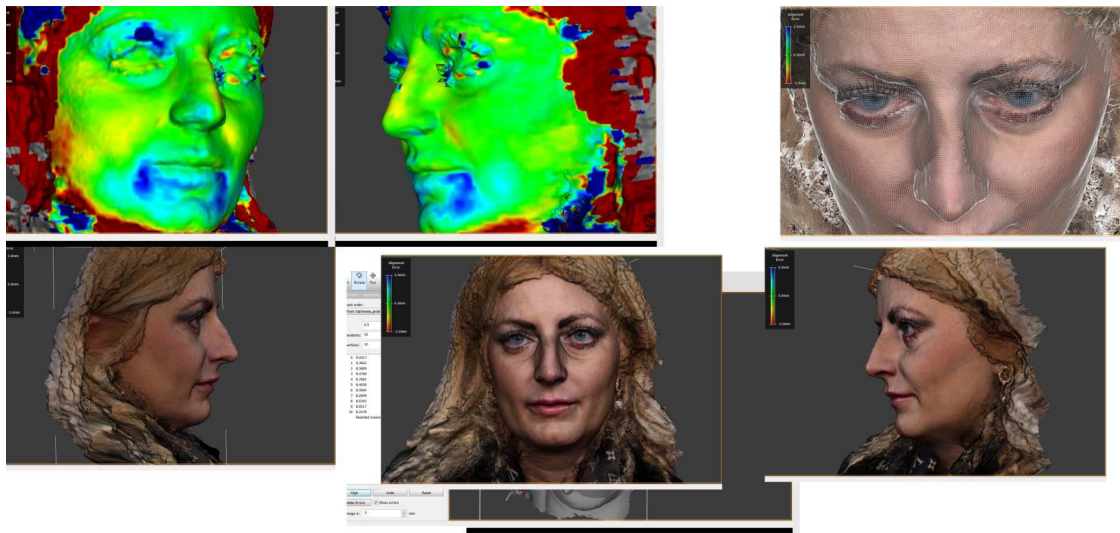
Vyhodnotením záverov z DI3D scanu bolo zistené, že po autotransplantácii tuku do oblasti tváre v našom súbore pacientov pretrvalo po 6 mesiacoch v priemere 40,6% aplikovaného objemu a v oblasti prsníkov v priemere 56,7% objemu transplantovaného tuku so signifikantným rozdielom v prospech prs ako recipientnej oblasti (graf 1). Na obrázkoch 4. až 6. sú zmapované príklady autotransplantácie tuku u pacientiek, do oblasti tváre s volumetrickou analýzou pomocou DI3D scanu. Obrázky 7. až 9. zase približujú predoperačný, pooperačný stav a volumetrickú analýzu u pacientiek s autotransplantáciou tuku, do oblastí prsníkov, za účelom rekonštrukcie mäkkých tkanív.

**Tab. 1.** Analyzovaný súbor pacientiek po autotransplantácii tuku

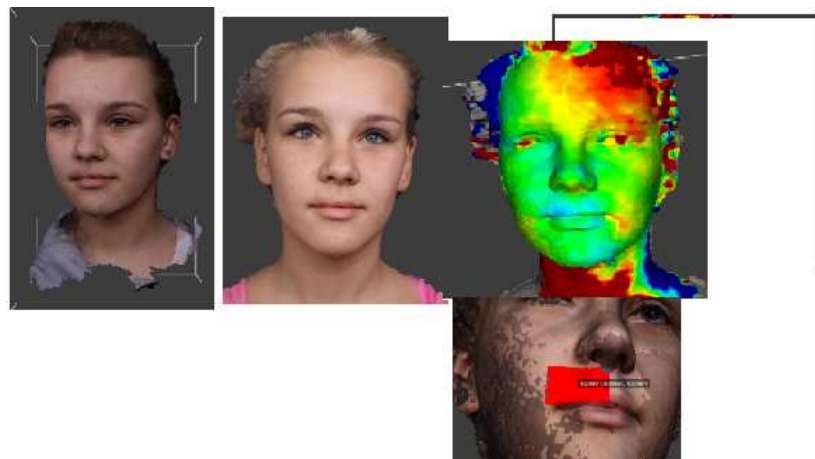
Pacientka číslo	Vek	Recipientná oblasť	Aplikovaný objem v ml	% prihojenia
1	56	Prsia	600	57
2	39	Prsia	180	51
3	22	Tvár	48	47
4	61	Prsia	180	37
5	59	Prsia	350	55
6	34	Tvár	8	39
7	16	Tvár	4	43
8	21	Prsia	330	79
9	37	Prsia	200	60
10	62	Prsia	280	62
11	68	Prsia	110	45
12	51	Tvár	24	43
13	29	Tvár	4	37
14	42	Prsia	260	58
15	33	Tvár	6	35
16	57	Prsia	290	63



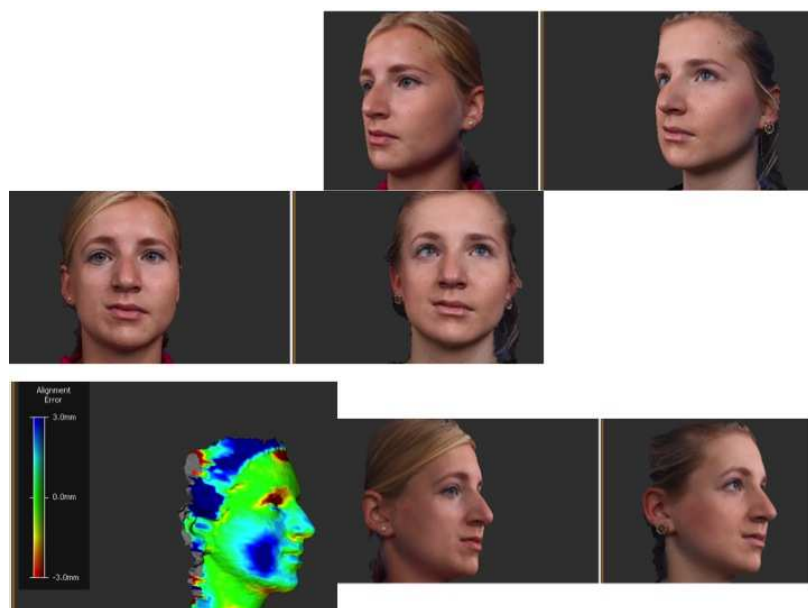
**Graf 1.** Vplyv recipientnej oblasti na % prihojenia autotransplantovaného tuku



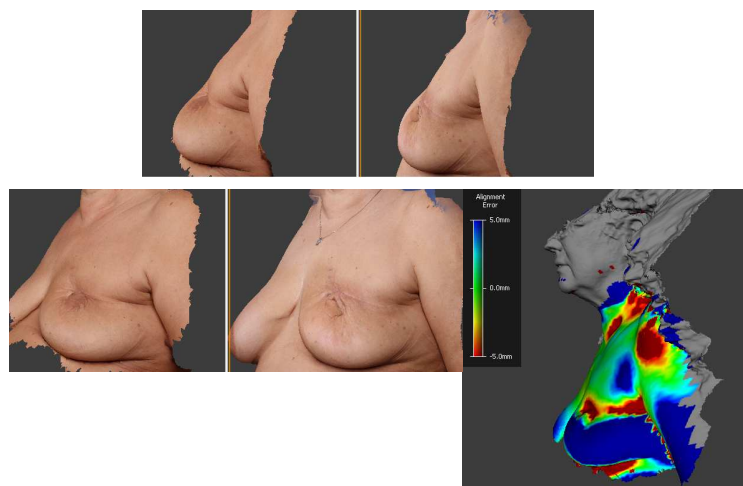
**Obr. 4.** Zobrazenie množstva pribudnutého tkaniva 6 mesiacov po aplikácii tuku do oblasti vrások pomocou DI3D Scanu (Boháč, M.)



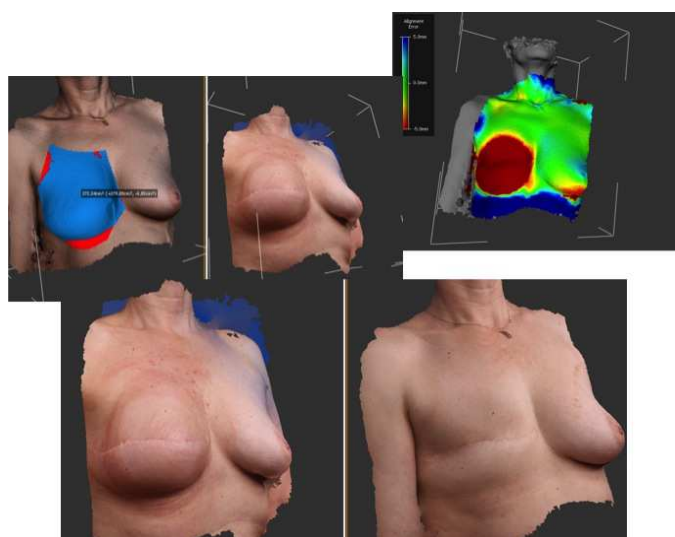
**Obr. 5.** Zobrazenie množstva pribudnutého tkaniva 6 mesiacov po aplikácii tuku do oblasti defektu hornej pery po pohryznutí pomocou DI3D Scanu (Boháč, M.)



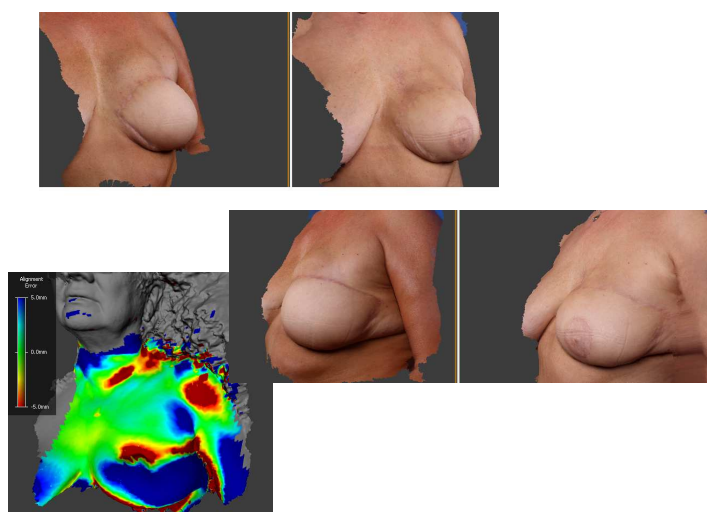
**Obr. 6.** Zobrazenie množstva pribudnutého tkaniva 6 mesiacov po aplikácii tuku do pravej časti tváre pre hypopláziu pomocou DI3D Scanu (Boháč, M.)



**Obr. 7.** Zobrazenie množstva pribudnutého tkaniva 6 mesiacov po aplikácii tuku po kvadrantektómii a rádioterapii vľavo pomocou DI3D Scanu (Boháč, M.)



**Obr. 8.** Zobrazenie množstva pribudnutého tkaniva 6 mesiacov po aplikácii tuku s cieľom vytvoriť neoprsník vpravo pomocou DI3D Scanu (Boháč, M.)



**Obr. 9.** Zobrazenie množstva pribudnutého tkaniva 6 mesiacov po aplikácii tuku s cieľom doplniť neoprsník z TRAM laloka vľavo pomocou DI3D Scanu (Boháč, M.)

## Diskusia

Meranie objemu po autotransplantácii tuku je dôležitou súčasťou ďalšieho sledovania pacientov, obzvlášť pri hodnotení výsledkov z dlhodobého hľadiska, ktoré boli doposiaľ zväčša založené len na subjektívnom hodnotení operatérov alebo finančne náročnom a obmedzene dostupnom MRI vyšetrení. Využitie DI3D scanu s cieľom sledovania % úspešnosti prihojenia tuku pri autotransplantácii sa nám osvedčilo podobne ako bolo dokázané aj v iných klinických štúdiách.<sup>3,4</sup> Rezorbcia tuku po autotrasplantácii je dobre známym javom. Naša trojdimenzionálna dátová analýza potvrdila subjektívne nálezy, ktoré objektívne kvantifikovala. Hodnotenie pooperačných objemových zmien nám potvrdilo, že postupne dochádzalo k postupnej rezorbccii, ktorá však nikdy nedosiahla predoperačnú úroveň objemu recipientného tkaniva a dosiahla v šiestom mesiaci približne úroveň prihojenia tukového tkaniva 40,6 % aplikovaného objemu v oblasti tváre a v oblasti prsníkov úroveň 56,7%. Nami zistený výsledok prežívania tuku v oblasti prs koreluje s výsledkami zistenými na iných svetových pracoviskách.<sup>4</sup> Nižšie percento prežitia tukového tkaniva v oblasti tváre možno odôvodniť aj aplikáciou menšieho množstva tuku, táto veličina vykazovala významnú koreláciu, a menej presným vyhodnotením pomocou DI3D scanu zistenými aj v iných štúdiách.<sup>4</sup> Po tejto dobe sme nezaznamenali výraznejšie zmeny v objeme, avšak za podmienky, že nedošlo k významnej zmene BMI. Na základe zistených výsledkov úrovne prežívania transplantovaného tukového tkaniva sme zistili, že metóda autotransplantácie tuku sa klinicky osvedčila aj v našich podmienkach a percentom úspešnosti autotransplantácie tuku, vypočítaným pomocou DI3D scanu, sme dosiahli úroveň ostatných svetovo uznávaných pracovísk.

## Záver

Prostredníctvom prístroja Dimensional Imaging a softvéru DID3capture sme schopní objemovo analyzovať 3D tvárové a prsníkové skeny, ktoré nám ponúkajú skutočný obraz pacienta a jeho mäkkých tkanív zo všetkých strán. Táto skutočnosť nám umožňuje presne posúdiť proporcie zo všetkých potrebných pohľadov. Získaný sken teda zobrazuje mäkké tkanivá čiže vonkajší vzhľad, ktorý následne po fúzii pred a po operácii je schopný presne vypočítať zmeny v objeme mäkkého tkaniva čo sa nám osvedčilo aj pri vypočítavaní objemu tkaniva, ktorý prežil po autotransplantácii tuku.

## Pod'akovanie

Práca bola podporená grantom UK 94/2014.

## Použitá literatúra

1. Illouz Y.G., Sterodimas, A. Adipose stem cells and regenerative medicine. Berlin: Springer Verlag, 2011, 278s.
2. Khouri R.K., Eisenmann-Klein M., Cardoso E., Cooley B.C., Kacher D., Gombos E., Baker T.J. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: Result of a 6-year, 81 patient, prospective multicenter study. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(5):1173-87.
3. Creasman C.N., Mordaunt D., Liolios T., Chiu C., Gabriel A., Maxwell G.P. Four-dimensional breast imaging, part I: introduction of a technology-driven, evidence-based approach to breast augmentation planning. *Aesthet Surg J.* 2011;31(8):914-24.
4. Choi M., Small K., Levovitz C., Lee C., Fadl A., Karp N.S. The volumetric analysis of fat graft survival in breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2013;131(2):185-91.



# Mezenchymálne kmeňové bunky ako možná terapia hypertrofických jaziev – literárny prehľad

Peter Záhorec<sup>1</sup>, Miroslav Tomáš<sup>3</sup>, Dorota Červenková<sup>1</sup>, Martin Boháč<sup>2</sup>, Ján Koller<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika popálenín a rekonštrukčnej chirurgie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Pažítková 24, 821 01 Bratislava; <sup>2</sup>Klinika plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Pažítková 4, 821 01 Bratislava;

<sup>3</sup>Klinika chirurgickej onkológie, Slovenská zdravotnícka Univerzita a Národný Onkologický Ústav v Bratislave, Klenová 1, 833 01 Bratislava

## Abstrakt

Mezenchymálne kmeňové bunky predstavujú jedinečný nástroj pre tkanivové inžinierstvo a regeneratívnu medicínu. Mezenchymálne kmeňové bunky vzhľadom k ich jedinečným biologickým vlastnostiam sa zdajú byť perspektívna metóda pre liečbu rôznych ochorení. Mnohé predklinické a klinické štúdie ukazujú na možnosť využitia týchto buniek v regenerácii tkanív, hojenie akútnych a chronických rán, hlbokých popálenín a jaziev. Účelom tohto článku je zhrnúť aktuálne informácie o mezenchymálnych kmeňových bunkách, ich biologických vlastnostiach a, ako aj ich klinické použitie v liečbe hypertrofických jaziev.

**Kľúčové slová:** mezenchymálne kmeňové, terapia, hypertrofické jazvy

## Úvod

Schopnosť regenerácie ľudskej kože je pri poraneniach, ktoré prechádzajú cez epidermu obmedzená. Takto vzniknuté poranenia sa nezriedka hoja jazvou. Pacienti po prekonaní termálneho úrazu hlbokého stupňa trpia vznikom jaziev popálených plôch. Aj v súčasnosti sa popáleninová medicína zameriava čoraz viac na riešenie vzniku, prevencie a terapie hypertrofických jaziev po hlbokom popálení. Lokálna a intralezionálna aplikácia kortikosteroidov, kompresívneho krytia, kryoterapie a ďalších liečebných možností v liečbe jaziev nie sú vo všetkých prípadoch rovnako úspešné. Hypertrofické jazvy sú devastujúce. Spôsobujú rozvoj kontraktúr, môžu zhoršiť spoločenské uplatenie, sociálnu izoláciu, stratu sebavedomia, diskrimináciu v spoločnosti.

## Hypertrofické jazvy

Mancini v r.1962 a Peacock v r.1970 definujú jazvu ako hypertrofickú, ak je jazva nad úrovňou kože a zároveň zostáva v kontúrach pôvodnej lézie. Hypertrofická jazva je vypuklá, ružovo červená, vyvýšená nad okolie kože, zhrubnutá, ohraničená na oblasť pôvodnej traumy. Býva následkom porušenia rovnováhy medzi katabolickými a anabolickými dejmi v procese hojenia rany. Hypertrofické jazvy najčastejšie vznikajú v mieste, kde dochádza k napätiu kože a ku častým pohybom (Klauzová 2008). Väčšina hypertrofických jaziev vzniká obvykle do jedného mesiaca od poranenia a môžu časom spontánne, pozvoľna zregredovať. Približne u jednej tretiny hypertrofických jaziev je udávané svrbenie a ďalšie dysestézie (Konigová 2010). Dôležitá z funkčného hľadiska je lokalizácia jazvy ( nad kĺbom , v oblasti fascie atď. ), ďalej jej bolestivosť a pružnosť vo všetkých vrstvách mäkkých tkanív. Ak je jazva pružná vo všetkých vrstvách, okolité tkanivá sa voľne posúvajú a je palpačne nebolestivá, hovoríme, že jazva je asymptomatická. Môže byť iba kozmetickým problémom.

Pri proťahovanom hojení tkaniva, pri pretrvávajúcom zápale alebo chronickom preťažení v oblasti jazvy, dochádza k uvoľňovaniu mediátorov typu histamín, leukotrién, interleukín typu 1 a 6, prostaglandín, cyklooxygenáza, draslíkových iónov, oxidu dusnatého a iných mediátorov , ktoré spôsobia vazodilatáciu kapilár a rozvoj edému v podkoží. Znižuje sa prah pre bolesť, následkom je primárna hyperestézia - zvýšená precitlivosť v jazve. Vplyvom zmeny elasticity a viskozity kože v oblasti jazvy je znížená tolerancia pre termické a mechanické podnety. Koža s jazvou je tak menej odolná na zmeny tepelnej a tlakovej sily a môže tak dôjsť k preťaženiu pohybového segmentu. Aktívna jazva - citlivá a bolestivá, býva príčinou obmedzenej posunlivosti a pružnosti mäkkých tkanív a následnej funkčnej blokády v danom segmente. Mení sa pohyblivosť v kĺbe, vzniká aj asymetria svalového napätia medzi agonistickou a antagonistickou svalovou skupinou.

Za jednu z možných príčin hypertrofických jaziev možno označiť neprimerane dlhé prežívanie fibroblastov, ako následok zníženej expresie apoptických proteínov, ktoré sú zodpovedné za reguláciu bunkovej smrti, rovnako ako aj za fibroprodukcii kolagénnych vlákien (Sayah 1999). Doteraz bolo detekovaných 64 pro-apoptických proteínov, pričom u 8 hlavných proteínov bol zistený pokles funkcie na hodnoty 18-54% z pôvodnej aktivity (Sumi 2000). U fibroblastov selektovaných z keloidných a hypertrofických jaziev boli zistené poruchy génovej expresie v porovnaní s fibroblastami zo zdravej dermis. Poruchy génovej expresie sa dejú na dvoch miestach, a to pretranskripčne a potranskripčne, na úrovni regulácie syntézy kolagénu typu I: ako u keloidných, tak aj u hypertrofických jaziev bola dokázaná nadmerná expresia génu pre prokolagén  $\alpha 1$ , z ktorého sa následne vytvára kolagén typu I. Na rozdiel od keloidov, u hypertrofických jaziev sa postupne posttranskripčne upravuje génová expresia pre  $\alpha 1$  prokolagén. U keloidov navyše dochádza k nadprodukcii kolagénu typu III (Friedman 1999).

Pre hojenie rán bez hypertrofiie je dôležitý pomer a rovnováha medzi Th1 a Th2 bunkovou imunitnou odpoveďou. Vylučovanie a aktivácia cytokínov a mediátorov Th1/Th2 imunitnej odpovede počas zápalovej fázy hojenia, je predpokladom pre procesy, ako sú angiogenéza, proliferácia fibroblastov a reepitelizácia (Tonnesen 2000, Stenn 1992).

Zápal a nadmerná zápalová reakcia nie sú jedinou príčinou v rozvoji fibrotickej reakcie. Jedným z dôvodov pre podporu tejto hypotézy je zlyhanie protizápalovej terapie, a to aj v kombinácii so silnými imunopresívami, s cieľom zlepšiť výsledky u fibroproliferatívnych ochorení, ako je napr. pľúcna fibróza (Sasaki 2011). Súčasný výskum prevencie fibrózy sa zameriava na priamu inhibíciu špecifických induktorov fibrogenézy, ako sú prozápalové cytokíny, proliferácia fibroblastov a zložiek extracelulárnej matrix spojiva (Ross 1992).

Všeobecne ku vzniku hypertrofických jaziev a zvlášť keloidných jaziev prispieva zmena fenotypu u fibroblastov (Teofoli 1999, Herndon 2007). Fibroblasty derivované z keloidov produkujú zvýšené množstvo fibronektínu v porovnaní s fibroblastami normálnej jazvy. Toto môže vysvetliť zvýšenú koncentráciu fibronektínu nájdeného hlavne v perivaskulárnej oblasti a v kolagénnych uzloch. V normálnej jazve sa fibronektín stratí počas niekoľkých dní po uzavretí rany, ale u hypertrofických jaziev a keloidov aktivita fibronektínu pretrváva na vysokej úrovni mesiace a roky. V porovnaní s normálnymi fibroblastami, keloidné fibroblasty vykazujú zvýšený počet receptorov pre rastové faktory a rýchlejšiu odpoveď na rastové faktory, ako je PDGF a TGF- $\beta$ , ktoré môžu zvyšovať proliferáciu týchto abnormálnych buniek od začiatku hojenia rany (Smith 1999). TGF- $\beta$  prispieva k normálnemu hojeniu rán, ale podieľa sa aj na mnohých ochoreniach väziva. Po zranení je TGF- $\beta$  uvoľnené z trombocytov po degranulácii, v mieste poranenia, kde pôsobí ako chemoatraktant pre lymfocyty, fibroblasty, monocyty a neutrofilné granulocyty (Smith 1999, Teofoli 1999).

Oxygenácia je ďalším faktorom, ktorý môže mať vplyv na tvorbu jaziev. Zmeny na úrovni transkripčného faktora HIF-1 (hypoxia inducible factor), ktorý sa podieľa na novotvorbe kožného krytu u plodu, môže byť čiastočne zodpovedný za pokles v tvorbe jaziev. Avšak zistenia, podľa ktorých sú hypertrofické jazvy vysokovaskularizované, sú v rozpore s hypotézou, že hypoxia vplyva na vznik a rozvoj jaziev (Scheid 2000, Scheid 2002).

Ďalšie zistenia z experimentálneho výskumu potvrdzujú pozitívny vplyv epiteliálnych inhibítorov na proliferáciu fibroblastov (Teofoli 1999), prípadne vplyv cytokínov, hlavne TGF- $\beta$  podporujúci rast a proliferáciu fibroblastov (Smith 1999). Z rodiny TGF- $\beta$  sú pre hojenie rán fyziologicky dôležité prvé tri polypeptidy, TGF- $\beta 1$ ,  $\beta 2$  a TGF- $\beta 3$ . Tieto patria medzi najvýznamnejšie stimulatory syntézy kolagénu a proteoglykánov a ovplyvňujú zloženie ECM nielen tým, že stimulujú syntézu kolagénu, ale tiež tým, že bránia jeho rozkladaniu (Lozito 2009). Nadmerná aktivita rastových faktorov z rodiny TGF- $\beta$  býva spojená s rozvojom hypertrofických jaziev a keloidnými formáciami v mnohých prípadoch. Silné a trvalé expresie humorálneho faktora TGF- $\beta$ , boli preukázané u fibroblastov počas vzniku hypertrofických jaziev po popálení (Hall 2003). Zvýšená expresia TGF- $\beta 1$  a  $\beta 2$  bola zistená u keloidných fibroblastov, s výrazne nižšou expresiou TGF- $\beta 3$  (Smith 1999, Lu 2011). Pomer koncentrácie TGF- $\beta 1$  ku TGF- $\beta 3$  sa v keloidných jazvách výrazne zvyšuje. Dôležité je porovnanie koncentrácie rastových faktorov TGF- $\beta 1$ , TGF- $\beta 2$  a TGF- $\beta 3$  vo fibroblastoch pre keloidné jazvy, hypertrofické jazvy a normálnu kožu. Významne nižšia TGF- $\beta 2$  expresia bola zistená u fibroblastov hypertrofických jaziev v porovnaní s fibroblastmi získanými z keloidných jaziev. Zatiaľ čo expresia TGF- $\beta 3$  bola významne nižšia u keloidných fibroblastov v porovnaní s fibroblastami získaných z hypertrofickou jaziev a fibroblastov normálnej kože (Chamberlain 2007). Javí sa, že rozdielne expresie izoformy TGF- $\beta$  môžu mať významnú úlohu (zvýšená expresia TGF- $\beta 1$  a znížená expresia TGF- $\beta 3$  vo fibroblastoch) na rozvoji keloidných a hypertrofických jaziev (Aggarwal 2005).

V roku 2007 Okazaki a kol. porovnávali fibroblasty z miest na tele, kde sa hypertrofické jazvy netvorí (bukálna sliznica), s ostatnými lokalitami na tele. Bolo zistené, že fibroblasty z bukálnej sliznice sú vybavené schopnosťou vyššej expresie rastových faktorov, čoho výsledkom je, že sa defekty uzatvárajú rýchlejšie než na ostatných miestach tela (Okazaki 2007). Taktiež v posledných rokoch študované voľné radikály kyslíka a dusíka, hlavne oxid dusnatý môžu hrať dôležitú rolu v etiopatogenéze hypertrofických alebo keloidných jaziev (Ihara 1990, Armstrong 1995).

### **Mezenchymálne kmeňové bunky**

Mezenchymálne kmeňové bunky (MSC) patria do skupiny multipotentných kmeňových buniek, sú schopné sebaobnovy a schopné sa diferencovať do buniek spojivového tkaniva ako sú osteocyty, chondrocyty, myocyty, adipocyty. Pre svoju univerzálnosť nachádzajú v súčasnosti široké terapeutické uplatnenie. Pojem "mesenchymálna kmeňová bunka" zaviedol Arnold Caplan v roku 1991, avšak už 60-rokoch boli MSC izolované z kostnej drene, ako uvádzajú práce Friedsteina a Petrakovej (1966). Najbežnejším zdrojom MSC bola kostná dreň, avšak pre náročný invazívny výkon odberu MSC a pre nedostatočný objem izolovaných MSC z tukového tkaniva, sa od tohto zdroja postupne upúšťa. V súčasnosti je najbežnejším zdrojom MSC tukové tkanivo, pre ľahkú dostupnosť a pre oveľa vyšší záchyt MSC. Množstvo získaných MSC z tukového tkaniva závisí od lokalizácie odberu lipoaspirátu. MSC získané z povrchových abdominálnych oblastí menej podliehajú apoptóze ako MSC získané z hornej končatiny, stehien alebo z hlbších abdominálnych oblastí (Witkowska –Zimny 2011, Zuk 2002).

### **Vlastnosti kmeňových buniek**

Existuje niekoľko štúdií o vplyve MSC na hojenie rán a regeneráciu tkanív.

Ľudské MSC migrujú do miesta poranenia a exprimujú chemokínové receptory k ďalšej činnosti (Ponte a kol., 2007. Sasaki kol., 2008).

MSC navyše preukázali chemotaxiu k cytokínom zúčastňujúcim sa procesov hojenia ako sú trombocytárny rastový faktor, IGF-1, IL-8 a TNF. (Mishima a kol.,2008. Hameda a kol., 2010). Po dosiahnutí miesta poranenia je imunomodulačný fenotyp MSC aktivovaný IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$  a adrenomedulínom (Ren a kol., 2008)

Ďalšou pravdepodobnou vlastnosťou MSC v procese hojenia rán je regulovať funkcie leukocytov v mieste hojenia. Vplyv MSC sa pozoroval rovnako u T-buniek aj B-buniek lymfocytov. (Ren a kol. 2008, Chamberlain a kol., 2007).

T- bunky lymfocytov podporujú MSC v proliferácii a aktivite v mieste poranenia, naopak pri B-bunkách a NK-bunkách dochádza ku potlačeniu ich proliferácie, teda ku zmierneniu akútnej zápalovej odpovede. (Corcione a kol.,2006, Sotiropoulou a kol. 2006). Zoslabenie aktivity týchto buniek, spolu so zmiernením zápalovej odpovede v rane, môžu MSC týmto spôsobom redukovať reakcie vedúce k tvorbe fibrózneho tkaniva.

MSC vylučujú celý rad cytokínov a rastových faktorov, ktoré majú anti-fibrózne vlastnosti, ako sú HGF, IL-10, adrenomedulin. (Li a kol. 2009). Bolo preukázané, že HGF tlmí fibrogenézu a rozvoj jaziev rôznymi mechanizmami. Fibroblasty reagujú poklesom regulácie génov pre TGF- $\beta$ 1, a enzýmov pre syntézu kolagénu typu I a III. ktoré sa podieľajú na fibrogenéze. (Mou a kol., 2009, Schievenbusch a kol. 2009), HGF taktiež stimuluje zvýšenú reguláciu matrixových metaloproteináz MMP-1, MMP-3 a MMP-13 u fibroblastov, ktoré naopak menia zloženie ECM. (Kanemura a kol. 2008).

Pri ochoreniach spôsobených nadmernou fibrogenézou, HGF potláča možnosť diferenciácie fibroblastov do myofibroblastov, a tým sa znižuje funkcia myofibroblastov, vedúca ku tvorbe fibrózneho tkaniva. (Shukla a kol., 2009) HGF teda prispieva k tvorbe vysokokvalitného dobre vaskularizovaného granulačného tkaniva. (Bevan a kol., 2004).

MSC vplyvajú aj na angiogénu a vaskularitu. Produkujú cytokíny FGF and VEGF-A, ktoré podporujú mitogénnu aktivitu, diferenciáciu a proliferáciu cievnych endotelových buniek. (Gruber a kol., 2003, Keigler a kol, 2003) MSC tiež exprimujú spomínaný adrenomedulin ako parakrinný faktor na podporu cievnej stability a vasoprotekcie. (Renault a kol., 2003).

Existujú in vitro štúdie podľa, ktorých je možné preukázať diferenciáciu MSC do dermálnych typov buniek. Na základe in vitro definovaných podmienok došlo ku transdiferenciácii MSC do endotelových a epidermálnych buniek. (Sasaki a kol.,2008, Fu a kol.,2009, Lozito a kol.,2006).

MSC sa môžu transdiferencovať do keratinocytov a sú schopné komunikovať s prirodzenými epidermálnymi bunkami. (Wu a kol., 2010). Tieto štúdie naznačujú, že MSC sa priamo zúčastňujú štruktúrálnej regenerácie dermálneho a epidermálneho tkaniva.

## **MSC využité v liečbe hypertrofických jaziev**

Klinger a kol. v roku 2008 pristúpil k terapii hypertrofických jaziev popálení na tvári pomocou autológneho tukové tkaniva spracované Colemanovou metódou na vzorke 3 pacientov. Tukové tkanivo bolo aplikované intralezionálne 2-krát s 13 mesačným odstupom, pred aj po výkone bola realizovaná biopsia tkaniva. Klinické príznaky a subjektívne pocity pacientov boli sledované po dobu 6 mesiacoch. Výsledky ukazujú výrazné zlepšenie mimických funkcií, a zníženie hrúbky jazvy. Histologické vyšetrenie ukázalo nové depozície kolagénu, hypervaskularitu tkaniva a dermálnu hyperpláziu pri novotvorbe tkaniva.

Majani a kol. v roku 2012 použil v terapii jaziev po popálení autológne tukové tkanivo a PRP (platelet-rich plasma) na vzorke 28 pacientov. Po 30 dňoch od výkonu došlo u všetkých pacientov k zlepšeniu elasticity jaziev a estetickému zlepšeniu operovaných oblastí.

Guisantes a kol. v roku 2012 uskutočnili štúdiu na vzorke 8 pacientov s jazvami a kožnými deformitami na bruchu, tvári a ramene. Všetci boli liečení autológnym tukovým tkanivom, ktoré bolo aplikované intralezionálne. U všetkých pacientov došlo k zlepšeniu estetického vzhľadu jaziev. Jedna operácia bola nutná v 5 prípadoch a 2 operácie v 3 prípadoch. U každého pacienta, nenastali žiadne komplikácie a výsledky boli trvalé vo všetkých prípadoch. Priemerná doba sledovania bola 18 mesiacov.

Klinger a kol. (2013) na vzorke 20 pacientov uskutočnili štúdiu liečby jaziev pomocou autológneho tukového tkaniva spracovaného Colemanovou metódou. Všetci pacienti v súbore mali kontrahujúce a bolestivé jazvy, obmedzujúce pohyb v kĺboch. Subjektívne boli jazvy pred aj po výkone hodnotené metódou POSAS (Patient and Observer Scar Assessment Scale) a objektívne boli hodnotené kožnou durometriou. Vo všetkých liečených jazvách bolo preukázané kvalitatívne zlepšenie, a to ako z estetického tak aj z funkčného hľadiska. Došlo ku zníženiu alebo úplnej strate bolesti a ku zvýšeniu pružnosti jazvy, čo bolo objektívne vyhodnotené vo všetkých prípadoch. U pacientov hodnotených kožnou durometriou a POSAS skóre, mali plochy ošetrené autológnym tukovým tkanivom štatisticky významne nižšie nameranú hodnotu odolnosti kože v porovnaní s oblasťami infiltrovanými roztokom chloridu sodného.

## **Diskusia a záver**

Okrem rozvoja kontraktúr, jazvy nežiaduco ovplyvňujú fyzický vzhľad pacienta a funkčný stav končatín, čím invalidizujú pacienta a znemožňujú mu návrat do pracovného procesu, so psychosociálnou izoláciou a rizikom rozvoja tzv. „sociálnej smrti“.

Presný mechanizmus vzniku jaziev, napriek rozsiahlemu výskumu hojenia rán v posledných desaťročiach nie je celkom objasnený. Všetky druhy jaziev sú multifaktoriálny problém. Veľkou nádejou pri komplikovanom hojení rán predstavujú MSC. Biomedicínsky výskum kmeňových buniek sa snaží preniesť získané skúsenosti a pozitívne vlastnosti MSC pri liečbe chronických chorobných stavov z experimentov na zvieratách do humánnej medicíny. Jednou z výnimočných vlastností mezenchymálnych kmeňových buniek je, že svojim pôsobením dokážu nahradiť pôsobenie mnohých doteraz neúčinných alebo málo účinných liečebných postupov, bez vedľajších a nežiadúcich účinkov.

Ukazuje sa možnosť, že MSC podané allogénnym alebo autológnym spôsobom, môžu prispieť k urýchleniu hojenia. MSC svojim parakrinným pôsobením majú na ranu analgetický, anti-infekčný a imunomodulačný efekt, čím prispieva k priaznivému priebehu hojenia a remodelácii jaziev.

## **Podakovanie**

Práca bola podporená grantom UK 570/2014.

## **Použitá literatúra**

1. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815- 1822.
2. Armstrong JR, Ferguson MW (1995) Ontogeny of the skin and the transition from scar-free to scarring phenotype during wound healing in the pouch young of a marsupial, *Monodelphis domestica*. *Dev Biol* 169: 242–260.
3. Artuc, M., Hermes, B., Steckelings, U. M., Grutzkau, A., and Henz, B. M., Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders, *Exp Dermatol*, 8, 1 (1999).
4. Clark JA, Leung KS, Cheng JC, Leung PC (1996) The hypertrophic scar and microcirculation properties. *Burns* 22: 447–450.

5. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J: Concise review: Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007, 25:2739-2749.
6. Dawn, B.; Bolli, R. Adult bone marrow-derived stem cells: Regenerative potential, plasticity and tissue commitment. *Basic Res. Cardiol.* 2005, 100, 495-503.
7. Fu X, Fang L, Li X, Cheng B, Sheng Z: Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen* 2006, 14:325-335.
8. Gruber R, Kandler B, Holzmann P, Vogele-Kadletz M, Losert U, Fischer MB, Watzek G: Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng* 2005, 11:896-903.
9. Guisantes, Eva MD, PhD\*; Fontdevila, Joan MD, PhD†; Rodríguez, Guillermo MD†, Autologous Fat Grafting for Correction of Unaesthetic Scars *Annals of Plastic Surgery: November 2012 - Volume 69 - Issue 5 - p 550–554 doi: 10.1097/SAP.0b013e31821ee386*
10. Hart, J., Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds, *J Wound Care*, 11, 205 (2002).
11. Herndon DN. *Total Burn Care*. W. B Saunders, 2007.
12. Ihara S, Motobayashi Y, Nagao E, Kistler A (1990) Ontogenetic transition of wound healing pattern in rat skin occurring at the fetal stage. *Development* 110: 671–680.
13. Kanemura H, Iimuro Y, Takeuchi M, Ueki T, Hirano T, Horiguchi K, Asano Y, Fujimoto J: Hepatocyte growth factor gene transfer with naked plasmid DNA ameliorates dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology* 2008, 38:930-939.
14. Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, Mooney DJ: Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. *Tissue Eng* 2003, 9:95-103.
15. Klauzová K. *Jizvy. Interní Med.* 2008; 10(11): 522–525.
16. Klinger M., Marazzi, D. Vigo, M. Torre Fat Injection for Cases of Severe Burn Outcomes: A New Perspective of Scar Remodeling and Reduction *Aesthetic Plastic Surgery* May 2008, Volume 32, Issue 3, pp 465-469
17. Klinger M1, Caviggioli F, Klinger FM, Giannasi S, Bandi V, Banzatti B, Forcellini D, Maione L, Catania B, Vinci V. Autologous fat graft in scar treatment. *J Craniofac Surg.* 2013 Sep;24(5):1610-5. doi: 10.1097/SCS.0b013e3182a24548.
18. Konigová R. *Komplexní léčba popáleninového traumatu*. Karolinum ISBN 978-80-246-1670-4, Praha 2010.
19. Lozito TP, Kuo CK, Taboas JM, Tuan RS: Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. *J Cell Biochem* 2009, 107:714-722.
20. Lu D, Chen B, Liang Z et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;92: 26-36.
21. Mishima S, Nagai A, Abdullah S, Matsuda C, Taketani T. Effective ex vivo expansion of hematopoietic stem cells using osteoblast-differentiated mesenchymal stem cells is CXCL12 dependent. *Eur J Haematol.* 2010 Jun;84(6):538-46.
22. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y: Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Stem Cell* 2008, 2:141-150.
23. Renault MA, Roncalli J, Tongers J, Misener S, Thorne T, Jujo K, Ito A, Clarke T, Fung C, Millay M, Kamide C, Scarpelli A, Klyachko E, Losordo DW: The Hedgehog transcription factor Gli3 modulates angiogenesis. *Circ Res* 2009, 105:818-826. 108.
24. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H: Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell
25. type.
26. Schievenbusch S, Strack I, Scheffler M, Wennhold K, Maurer J, Nischt R, Dienes HP, Odenthal M: Profiling of anti-fibrotic signaling by hepatocyte growth factor in renal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 385:55-61.
27. Scheid A, Wenger RH, Schaffer L, Camenisch I, Distler O, et al. (2002) Physiologically low oxygen concentrations in fetal skin regulate hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor-beta3. *FASEB J* 16: 411–413.
28. Smith P., Mosiello G., Deluca L., et. al. TGF-B activates proliferative scar fibroblasts. *J Surg Res*, 1999, 82 (2), p. 319-323.

29. Stenn K.S, Malhotra R: Epithelization , in Wound Healing . Eds . Cohen, Diegelmann a Lindblad, WB Saunders 1992 , s.115 – 128.
30. Teofoli P., Barduagni S., Ribuffo M. et al. Expression of Bcl-2, p53,c-jun and c-fosprotooncogenes in keloids and hypertrophic scars. J Derm Sci, 1999, 22 (1) p. 1502-1513.
31. Tonnesen, M. G., Feng, X., and Clark, R. A., Angiogenesis in wound healing, J Investig Dermatol Symp Proc, 5, 40 (2000).

# Novel candidate biomarkers for determination prostate cancer diagnosis and prognosis

Stanislav Žiaran

*Department of Urology with Centre for Kidney Transplantation, Faculty of Medicine and University Hospital, Comenius University, Limbova 5, 833 05 Bratislava, Slovakia*

## Abstract

The clinical behavior of PCa is highly variable. Current „traditional“ prognostic markers cannot reliably distinguish the potentially life-threatening cancer from indolent cancer. Therefore, identification of additional new predictors of cancer aggressiveness are therefore urgently required. Pubmed systematic search was performed to collect both original and review articles addressing CaP prognostic biomarkers using key words genetics, prostate cancer, biomarkers, prognosis. The development of molecular and immunohistochemical methods enabled the identification of potential biomarkers in relation to diagnosis and prognosis of PCa. Some of these markers may be translated into clinical practice after verification in larger prospective trials in future, and can help to determine diagnosis and prognosis of CaP more accurately.

**Key words:** prostate cancer, biomarkers, diagnostics and prognostics

## Introduction

Prostate cancer (CaP) is most common nondermatologic malignancy of men in Western Europe (1). The clinical behaviour of PCa is highly variable. To identify patient subgroups that require less treatment from those that should be targeted with more aggressive therapy is therefore urgently required. Overtreatment of CaP is a particular concern leading to substantial cardiovascular and skeletal morbidity (2-6) This is typical for many prostate-specific antigen (PSA) screen-detected cancers, which in the absence of treatment, may never become life threatening, and thus does not require any treatment. Conversely, more conservative approaches to disease detection and management can leave potentially aggressive cancers untreated. Therefore, improved biomarkers are required to allow radical therapies to be targeted to men with potentially lethal cancers, so that the others, with more benign-behaving indolent cancers, are spared inappropriate treatment.

Current „traditional“ clinicopathologic prognostic markers predictive of outcome in men with CaP after radical retropubic prostatectomy (RRP) consist of Gleason score, TNM stage, surgical margin status, and preoperative serum prostate-specific antigen (PSA) (7-10). Beyond the current clinicopathologic parameters, there have been other biomarkers and approaches proposed to: (i) distinguish between indolent and potentially life threatening disease (ii) aid the decision for rebiopsy in previous negative biopsies with rising PSA, (iii) monitor the disease progression and its responsiveness to therapy These approaches and markers include genome-wide association studies (GWAS), chromosomal aberrations, DNA-based markers, RNA-based biomarkers, and protein markers (tissue, serum, urine biomarkers) (11). Available methods to identify potential biomarkers include genomics, proteomics and tissue based immunohistochemical staining (12). Quantitation of cancer biomarker transcripts using real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) of large samples may help in the search for clinically useful cancer biomarkers that can be integrated into clinical trial design (12). Gene expression array technology applied to PCa has resulted in the identification of a number of genes that have been associated with outcome. More recently, next-generation sequencing (NGS) have been described, which could bring promising information in our understanding of the cancer genome of several tumor types (13)

This article provides review of current most promising molecular and immunohistochemical biomarkers in CaP diagnosis, prognosis, and clinical behavior.

## Methods

Pubmed systematic search was performed to collect both original and review articles addressing CaP prognostic biomarkers using key words genetics, prostate cancer, biomarkers, prognosis.

## **Genetics and prostate cancer**

Initiation of prostate cancer is a process resulting from the progressive accumulation of genetic disorders (14). On the basis of the constellation of polymorphisms of germ cell cancer the risk of developing cancer is individual (15). The cumulative effect of polymorphism genome may lead to one or more disorders, and / or may "offer" an environment for further genetic alterations in prostate epithelial cells. Over time, additional somatic genetic disorders alter the behavior of prostate epithelial cells until it represents signs of malignancy (16). Epigenetic alterations are other common events in carcinogenesis, including CaP, which may lead to aberrant expression of critical genes such as tumor suppressors and oncogenes. Although most CaP are classified into a single group of adenocarcinomas, there is no universal molecular path of CaP development. It is also unlikely that two prostate adenocarcinomas share the same genetic path in the development of cancer. Genetic and genomic technologies have helped to clarify the changes in genes that lead to the development of CaP. These changes provide a molecular basis from which diagnostic, prognostic and predictive biomarkers can be developed (17). For genetically determined diseases, genetic alterations can be identified via methods of molecular genetics (e.g. polymerase chain reaction, fluorescence in situ hybridisation, genome sequencing etc.). These alterations, when identified, can be in turn used as biomarkers for prognosis of CaP and other cancers.

## **Criteria for a candidate biomarker**

The National Cancer Institute defines a biomarker as "a biological molecule found in blood, other body fluids, or tissues that is a sign of a normal or abnormal process or of a condition or disease." A biomarker may be objectively measured and evaluated as an indication of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a particular treatment or condition (18,19). Biomarker is an analyte that signifies the presence or degree of a biological process, which in itself is frequently directly linked to the clinical expressions and result of a particular disease (20) The selection of a cancer biomarker should have a biological or therapeutic basis or, at minimum, the biomarker should indicate a reliable correlation with the presence, characteristics, or aggressiveness of the cancer. Also, there should be an evaluation of the strength of the marker in relation to the outcome of the disease, which, together with other factors, should be carried out as an independent predictor in a multivariable assay in the general population. (21). Biomarkers for the diagnosis and prognosis of PCa include DNA-based markers, RNA-based biomarkers, and protein markers. They may be useful for prognostic purposes in the outcome of diseases, with particular attention on the quantitative biomarkers that demonstrate a relationship with the clinical manifestation of the disease and that have an effect on quality of life, risk of complications, or survival. Surrogate biomarkers have a significant function in disease monitoring after accepted treatments are introduced. Surrogates are particularly important for those treatments that are uncommon, such as cases in which the direct study has proved to be very difficult because of the limited number of patients and varying expression of their primary illness or in which the efficiency of the treatment must justify the high cost (20).

## **Identifying Discriminating Markers**

With the completion of the Human Genome Project, the publication of the International Haplotype Map Project (a catalog of millions of common single nucleotide polymorphisms, or SNPs, in the human population), and a decrease in the cost of high-throughput genotyping, an unbiased genomewide search for inherited variants associated with PCa risk has become feasible. This approach, called a genomewide association study (GWAS), scans the entire genome, evaluating common inherited variants (minor allele frequency >1–5% in the population) in large numbers of cases and controls (11).

GWAS indicate genetic heterogeneity for the onset of disease with numerous low risk loci described along with two notable high-risk loci at 8q24 and 7q31. The linked loci on 8q24 are located immediately downstream of the MYC gene that is upregulated in PCa (see below,22,23).

The Practical consortium recently reported the conclusion of their successive GWAS studies. They evaluated over 500,000 alleles (SNPs) in 3 separate cohorts of cases/controls (up to 30,000 men (24). The consortium eventually identified alleles in 7 genomic regions (encompassing 11 genes) that were linked to PCa diagnosis. The allele penetrance ranged from 6–50% of the population and each allele altered PCa risk by 0.35–1.89 (odds ratio). It is interesting, that the risk markers reside largely in noncoding regions of the genome. The mechanism of inherited risk is therefore not readily apparent and the risk alleles provide an opportunity to gain insight into prostate carcinogenesis. There are several potential mechanisms by which a genetic variant may be associated with altered cancer risk, including: (i) genetic linkage to a coding variant in a cancer-relevant gene (ie, the risk SNP is merely a proxy for the



true causal exonic variant that was not tested in the GWAS), (ii) alteration in promoter/enhancer binding sites or chromatin structure affecting expression of adjacent or distant genes, or (iii) change in the expression of noncoding RNAs. There is also a high probability that PCa genes/alleles act cooperatively in the aetiopathogenesis of the disease supporting the notion that it is unlikely that any one biomarker alone is likely to be conclusive in detecting and predicting outcome of cancer (25).

### **Novel biomarkers for CaP diagnosis**

#### ***PCA3 and TMPRSS2:ERG fusion***

PCA3 is a noncoding RNA with expression confined to the prostate, and which is highly overexpressed in 95% of PCas compared with normal or benign hyperplastic prostate tissue (26). PCA3 has been assayed from urine following prostatic massage in 11 separate clinical studies totalling 2737 men from Western countries (27,28,29) with an overall sensitivity of 69% and specificity of 70% for men with PCa. The role of PCA3 in clinical practice as a commercially-available test remains uncertain with most advocates indicating a place in patients who have already had TRUS biopsies with a negative result for cancer but in whom PCa remains suspected.

Detection of the TMPRSS2:ERG fusion in urine has been reported to yield >90% specificity and 94% positive predictive value for PCa detection (30), although a clinical diagnostic test is not yet available. The combination of urinary PCA3 and TMPRSS2- ERG with serum PSA levels has been reported to improve screening performance compared to PSA alone (31). Moreover, the recent study indicates that integration of levels TMPRSS2:ERG transcripts in urine, with PCA3-score, androgenic status, genetic status and traditional clinical variables could significantly increase detection of high risk localized PCa. (32)

#### ***Early Prostate Cancer Antigen***

Leman et al. (31) reported results on a serum biomarker called early prostate cancer antigen (EPCA) using an antibody assay against the EPCA-2.22 epitope. The study involved 385 men and reported a 92% specificity for healthy men and men with benign prostatic hyperplasia and a 94% sensitivity for overall PCa detection. In addition, the authors indicated that EPCA-2.22 was highly accurate in differentiating between localized and extracapsular disease (33).

#### ***SPINK1***

SPINK1 (also referred to as TAT1) is a biomarker for PCa that can be detected in prostatic massage urine. SPINK1, a trypsin inhibitor secreted from pancreatic acinar cells, is thought to function in the prevention of trypsin-catalyzed premature activation of zymogens within the pancreas and the pancreatic duct. Mutations of this gene are associated with hereditary pancreatitis and tropical calcific pancreatitis (34,35).

Laxman et al. (36) showed that a multiplexed qPCR assay including SPINK1 on sedimented urine from patients presenting for prostate biopsy or prostatectomy outperformed serum PSA or PCA3 alone. SPINK1 expression in urine is also an independent predictor of biochemical recurrence after resection. On the other hand, recent study concludes that SPINK1 protein expression (evaluated by immunochemistry) may not be a predictor of recurrence or lethal PCa amongst men treated by radical prostatectomy (37).

#### ***$\alpha$ -Methylacyl Coenzyme A Racemase (AMACR)***

AMACR is an enzyme localized to the peroxisome and involved in fat metabolism and has been identified to function as a growth promoter, independent of androgens, in prostate cancer (38,39). By using various experimental methods and different PCa specimens, the AMACR gene has been shown to be overexpressed in PCa tissue at the mRNA and protein levels and making it a highly specific tissue biomarker currently used to aid in the pathological diagnosis (40).

When PCa tissues were compared with normal controls, a 9-fold increase in mRNA levels of AMACR was discovered in 88% of the sample PCa tissues (41). Immunodetectable serum autoantibodies generated in response to the AMACR tumor-associated antigen may also be useful in preliminary diagnosis, especially if combined with PSA screening. A considerably more enhanced sensitivity and specificity in PCa patients with mid-range PSA levels have been observed with AMACR antibodies than that with PSA. This demonstrates that AMACR can be useful in discriminating control subjects from those with PCa (42). Interestingly, it has been described, that trifluorobuprofen, an AMACR inhibitor,

reduces cancer cell proliferation and Inhibits in vivo tumor growth in aggressive PCa models (43). This makes AMACR one of possible therapeutical targets in future.

### ***Glutathione S-transferase P1 (GSTP1)***

GSTs are ubiquitous family of multifunctional enzymes that conjugate reactive substrates with reduced glutathione (GSH), and are involved in detoxification. Their role is in protecting the cells from oxidative attack (44) The GSTP1 gene has been observed to be unmethylated in all normal human tissues and BPH, but hypermethylated in specimens of PCa tissues (45). GSTP1 has been shown to be acutely sensitive in detecting the presence of prostatic intraepithelial neoplasia and PCa, thereby distinguishing patients with these diseases from patients with BPH (46).

### ***DAB2IP***

DAB2 interacting protein (DAB2IP) is a Ras GTPase-activating protein that functions as a tumor suppressor. The human DAB2IP gene is located on chromosome 9q33.1-q33.3 (47), and is frequently observed to be downregulated in PCa cell lines (48). Studies have shown that loss of expression of DAB2IP may be a result of altered epigenetic regulations, for example DNA methylation and histone modification (49). The abnormal methylation in the promoter region of the DAB2IP gene has been reported to be responsible for transcriptional silencing and consequently performs a significant function in the progression of PCa (50). Duggan et al. in their study reported a link between a genetic variation in DAB2IP and the risk of aggressive PCa (51). This research indicates that DAB2IP protein, after further studies, can potentially be used as a very effective novel biomarker for PCa diagnosis, though larger prospective trials are warranted.

### ***NK3 homeobox 1(NKX3.1) gene***

The product of the NKX3.1 gene, which is a prostate restricted homeobox protein that is involved in the regulation of prostate development, is expressed in normal prostate epithelium and is often decreased in PIN lesions and in prostate tumor cells (52,53).

NKX3.1 protein has also been implicated in helping to decrease oxidant genome damage by virtue of its ability to activate expression of genes involved in scavenging oxidant radicals (54). The fact that NKX3.1 is expressed in most PCa, and not in most other tumor types, suggests that NKX3.1 may be an excellent immunohistochemical marker of PCa (55). Some studies indicate, that the loss of NKX3 gene leads to poorer prognosis in PCa (56).

## **Biomarkers for determining CaP prognosis and progression**

### ***TMPRSS2, ERG and ETV1 fusions, ETS family***

Transmembrane protease serine proteinase 2 (TMPRSS2), is an androgen-regulated, type II transmembrane-bound serine protease that is locally expressed in the prostate and overexpressed in neoplastic prostate epithelium. TMPRSS2 was thought to play a possible role in PCa metastasis through the activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2) (57). An extensive study focusing on gene fusion transcripts in PCa identified the fusion between TMPRSS2 (located at 21q22.3) with the transcription factor genes ERG (21q22.2) and ETV1 (7p21.1) (58). One TMPRSS2 allele loses its promoter, and one of the ERG alleles gains it, resulting in an overexpression of ETS family members) in the cancer cells (59) and consequently tumor progression (60). TMPRSS2-ERG is the most frequent oncogenic gene fusion rearrangement in PCa (61):

ERG and ETV1 show mutually exclusive overexpression in PCa tissues, suggesting a redundant function in PCa development. In addition, ERG and ETV1 gene fusions have been detected in only a limited number of BPH and High-Grade Prostate Intra-epithelial Neoplasia (HGPIN) lesions, albeit in the absence of ETS upregulation (62).

ETS fusions are strongly linked with survival when associated with loss of PTEN ( $P < 0.001$ ) (63) and have been identified in 48% of men who died of castrate-resistant disease (64)

### ***Loss of PTEN***

The PTEN gene on 10q23 is mutated in up to 1/3 of hormone refractory PCa (65) and homozygous deletions and mutations have been identified in a subset of primary PCa (65) Loss of PTEN protein in primary PCa, as determined by immunohistochemistry, correlates with high Gleason score and advanced stage (66). PTEN is a dual protein and lipid phosphatase that is responsible for

dephosphorylation and inactivation of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3), a second messenger that is produced after activation of PIP3 kinase in response to ligation of several growth factor receptors, including IGF-1. PIP3 activates the protein kinase AKT. AKT signalling results in inhibition of apoptosis in response to a variety of signals and to increased cell proliferation (67).

In assessing the relationship of PTEN deletion with the TMPRSS2-ERG fusion, two independent groups found that patients with neither lesion had a favorable prognosis (68, 69).

Other markers tested in combination with PTEN loss for prognostic information include tumor protein p27 gene loss (70), hemoxygenase-1 overexpression (71), and HER2/3 overexpression (72). A four-protein signature, as assessed by immunohistochemical staining for PTEN in combination with a subset of proteins involved in tumor growth factor- $\beta$  signaling: SMAD4, cyclin D1, and SPP1, was found to predict biochemical recurrence significantly better than Gleason score alone (73). The most promising pathway in which this is likely to be employed in the near future is the PTEN/PI3K pathway as a number of clinical trials using inhibitors of this pathway are in development or underway in PCa (74).

Thus, the measurement of PTEN protein levels and downstream targets of AKT in prostate needle biopsies may have value in the future if these trials show promise (74). It remains to be determined which combinations of events will provide the most reliable prognostic information to guide clinical decision making. Moreover, it has been found that PI3K and androgen receptor (AR) pathway crosstalk plays an important role in castrate resistant PCa development, with potentially important implications for PCa etiology and therapy (75).

## Conclusion

There is an urgent need for novel biomarkers for assessing CaP diagnosis and prognosis, due to the highly variable natural history of CaP. „Traditional“ markers cannot reliably distinguish the potentially life-threatening cancer from insignificant cancer. The development of molecular and immunohistochemical methods enabled the identification of potential biomarkers in relation to prognosis. Numerous promising markers and approaches have been identified and used (loss of PTEN, fusion of genes TMPRSS2 ERG and ETV1, GWAS, next generation sequencing, combination of „traditional“ markers with novel biomarkers...) In addition, attempts to identify cancers with different response to hormonal therapy have been used. The common feature of most current studies is their lack of prospectivity, limited number of patients and have to be verified in larger prospective studies. However, some of these markers may be translated into clinical practice in future, and can help to assess prognosis of CaP more accurately.

## Acknowledgement

This study was supported by grant VEGA No. 1/1250/12.

## References

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ Cancer statistics. *Cancer J Clin* 2009; 59(4):225-249.
2. Gandaglia, Giorgio, et al. "The Impact of the Androgen Deprivation Therapy on the Risk of Coronary Heart Disease in Patients with Non - Metastatic Prostate Cancer: A Population - Based Study." *BJU international* (2014). [Epub ahead of print]
3. Roayaei, Mahnaz, and Sedighe Ghasemi. "Effect of androgen deprivation therapy on cardiovascular risk factors in prostate cancer." *Journal of Research in Medical Sciences* 18.7 (2013).
4. Albertsen, Peter C., et al. "Cardiovascular morbidity associated with gonadotropin releasing hormone agonists and an antagonist." *European urology* 65.3 (2014): 565-573.
5. Yong, Candice, Eberechukwu Onukwugha, and C. Daniel Mullins. "Clinical and economic burden of bone metastasis and skeletal-related events in prostate cancer." *Current opinion in oncology* 26.3 (2014): 274-283.
6. McKay, Rana R., Mary-Ellen Taplin, and Toni K. Choueiri. "Optimizing Bone Health and Minimizing Skeletal Morbidity in Men with Prostate Cancer." *Hematology/oncology clinics of North America* 27.6 (2013): 1261-1283.
7. Humphrey PA: Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol* 17:292-306, 2004
8. Blute ML, Bergstralh EJ, Iocca A, et al: Use of Gleason score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy. *J Urol* 165:119-125, 2001.

9. Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, et al: Prognostic factors in prostate cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124:995-1000, 2000.
10. Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, et al: Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol* 216:34-63, 2005.
11. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010;363:166–76.
12. Jiang W, Freidin B, Simon R. Biomarker-Adaptive Threshold Design: A Procedure for Evaluating Treatment With Possible Biomarker -Dfined Subset Effect. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99:1036–1043.
13. Macconnaill LE, Garraway LA. Clinical implications of the cancer genome. *J Clin Oncol* 2010;28:5219–28.
14. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med.* 2003;349:366-381.
15. Zheng SL, Sun J, Wiklund F, et al. Cumulative association of 5 genetic variants with prostate cancer. *N Engl J Med.*2008;358:910-919.
16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
17. Febbo PG. Genomic Approaches to Outcome Prediction in Prostate Cancer. *Cancer* 2009;115(13 suppl):3046–57
18. Atkinson AJ Jr, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Biomarkers Definitions Working Group. *Clinical Pharmacol & Therapeutics* 2001; 69: 89–95.
19. National Cancer Institute. Dictionary of Cancer Terms. <http://www.cancer.gov/dictionary/?searchTxt=biomarker>.
20. Cox TM. Biomarkers in lysosomal storage diseases. Fabry disease: Perspectives from 5 years of FOS. In: Mehta, A; Beck, M; Sunder-Plassmann, G, editors. Oxford (UK): Oxford Pharma
21. Hartwell L, Mankoff D, Paulovich A, et al. Cancer biomarkers: a systems approach. *Nature Biotechnology* 2006; 24: 905-8.
22. Beuten, J.; Gelfond, J.A.; Martinez-Fierro, M.L.; Weldon, K.S.; Crandall, A.C.; Rojas-Martinez, A.; Thompson, I.M.; Leach, R.J. Association of chromosome 8q variants with prostate cancer risk in Caucasian and Hispanic men. *Carcinogenesis* 2009, 30, 1372–1379.
23. Robbins, C.; Torres, J.B.; Hooker, S.; Bonilla, C.; Hernandez, W.; Candreva, A.; Ahaghotu, C.; Kittles, R.; Carpten, J. Confirmation study of prostate cancer risk variants at 8q24 in African Americans identifies a novel risk locus. *Genome Res.* 2007, 17, 1717–1722.
24. Eeles, R.A.; Kote-Jarai, Z.; Al Olama, A.A.; Giles, G.G.; Guy, M.; Severi, G.; Muir, K.; Hopper, J.L.; Henderson, B.E.; Haiman, C.A.; et al.; UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators/British Association of Urological Surgeons' Section of Oncology; UK ProtecT Study Collaborators; PRACTICAL Consortium, Easton DF. Identification of seven new prostate cancer susceptibility loci through a genome-wide association study. *Nat. Genet.* 2009, 41, 1116–1121.
25. Clarke, R. A., Schirra, H. J., Catto, J. W., Lavin, M. F., & Gardiner, R. A. (2010). Markers for detection of prostate cancer. *Cancers*, 2(2), 1125-1154.
26. Salagierski M, Schalken JA. Molecular diagnosis of prostate cancer: PCA3 and TMPRSS2:ERG gene fusion. *J Urol* 2012;187: 795–801.
27. Tosoian, J.J.; Loeb, S.; Kettermann, A.; Landis, P.; Elliot, D.J.; Epstein, J.I.; Partin, A.W.; Carter, H.B.; Sokoll, L.J. Accuracy of PCA3 measurement in predicting short-term biopsy progression in an active surveillance program. *J. Urol.* 2010, 183, 534–538
28. van Gils, M.P.; Hessels, D.; van Hooij, O.; Jannink, S.A.; Peelen, W.P.; Hanssen, S.L.; Witjes, J.A.; Cornel, E.B.; Karthaus, H.F.; Smits, G.A.; Dijkman, G.A.; Mulders, P.F.; Schalken, J.A. The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. *Clin. Cancer Res.* 2007, 13, 939–943.
29. Marks, L.S.; Fradet, Y.; Deras, I.L.; Blasé, A.; Mathis, J.; Aubin, S.M.; Cancio, A.T.; Desaulniers, M.; Ellis, W.J.; Rittenhouse, H.; Groskopf, J. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology* 2007, 69, 532–535.
30. Hessels D, Smit FP, Verhaegh GW, Witjes JA, Cornel EB, Schalken JA. Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:5103–8.
31. Salami, S. S., Schmidt, F., Laxman, B., Regan, M. M., Rickman, D. S., Scherr, D., ... & Sanda, M. G. (2011, May). Combining urinary detection of TMPRSS2: ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier.

32. Cornu, Jean - Nicolas, et al. "Urine TMPRSS2: ERG fusion transcript integrated with PCA3 score, genotyping, and biological features are correlated to the results of prostatic biopsies in men at risk of prostate cancer." *The Prostate* 73.3 (2013): 242-249.
33. Leman, E.S.; Cannon, G.W.; Trock B.J.; Sokoll, L.J.; Chan, D.W.; Mangold, L.; Partin A.W.; Getzenberg, R.H. EPCA-2: a highly specific serum marker for prostate cancer. *Urology* 2007, 69, 714–720.
34. Witt, H.; Luck, W.; Hennies, H.C.; Classen, M.; Kage, A.; Lass, U.; Landt, O.; Becker, M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1, are associated with chronic pancreatitis. *Nat. Genet.* 2000, 25, 213–216.
35. Bhatia, E.; Choudhuri, G.; Sikora, S.S.; Landt, O.; Kage, A.; Becker, M.; Witt, H. Tropical calcific pancreatitis: strong association with SPINK1 trypsin inhibitor mutations. *Gastroenterology* 2002, 123, 1020–1025.
36. Laxman, B.; Morris, D.S.; Yu, J.; Siddiqui, J.; Cao, J.; Mehra, R.; Lonigro, R.J.; Tsodikov, A.; Wei, J.T.; Tomlins, SA.; Chinnaiyan, A.M. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res.* 2008, 68, 645–649.
37. Flavin, Richard J., et al. "SPINK1 Protein Expression and Prostate Cancer Progression." *Clinical Cancer Research* (2014): clincanres-1341.
38. Kuefer R, Varambally S, Zhou M, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: expression levels of this novel cancer biomarker depend on tumor differentiation. *Am J Pathol* 2002; 161: 841-8
39. Zha S, Ferdinandusse S, Denis S, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase as an androgen-independent growth modifier in prostate cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 7365-76.
40. Jiang Z, Wu CL, Woda BA, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. *Histopathology* 2004; 45: 218-25.
41. Rogers CG, Ya G, Zha S, et al. Prostate cancer detection on urinalysis for alpha methylacyl coenzyme A racemase protein. *J Urol* 2004; 172: 1501-3.
42. Sreekumar A, Laxman B, Rhodes DR, et al. Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. *J NCI* 2004; 96: 834-43
43. Festuccia, C., et al. "Trifluoroibuprofen inhibits  $\alpha$ -Methylacyl Coenzyme A Racemase (AMACR/P504S), Reduces Cancer Cell Proliferation and Inhibits in Vivo Tumor Growth in Aggressive Prostate Cancer Models." *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* (2014).
44. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzyme to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 445-600.
45. Harden SV, Guo Z, Epstein JI, et al. Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol* 2003; 169: 1138-42.
46. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11733-7.
47. Chen H, Pong RC, Wang Z, et al. Differential regulation of the human gene DAB2IP in normal and malignant prostatic epithelia: cloning and characterization. *Genomics* 2002; 79: 573-81
48. Chen H, Toyooka S, Gazdar AF, et al. Epigenetic regulation of a novel tumor suppressor gene (hDAB2IP) in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem* 2003; 278:3121-30.
49. Chen H, Tu SW, Hsieh JT. Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer. *J Biol Chem* 2005; 280: 22437-44.
50. Chen H, Toyooka S, Gazdar AF, et al. Epigenetic regulation of a novel tumor suppressor gene (hDAB2IP) in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem* 2003; 278: 3121-30.
51. Duggan D, Zheng SL, Knowlton M, et al. Two genome-wide association studies of aggressive prostate cancer implicate putative prostate tumor suppressor gene DAB2IP. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1836-44.
52. Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR, Abate-Shen C, Shen MM. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev.* 1999; 13:966–977.
53. Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, Gasser TC, Koivisto P, Lack EE, Kononen J, Kallioniemi OP, Gelmann EP. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res.* 2000; 60:6111–6115. [In Process Citation].

54. Ouyang X, DeWeese TL, Nelson WG, Abate-Shen C. Loss-of-function of Nkx3.1 promotes increased oxidative damage in prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005; 65:6773–6779.
55. Ali TZ, Eptein JI, Beiberich CJ, De Marzo AM. NKX3.1 as a new tissue marker of prostatic adenocarcinoma. *Laboratory Investigation.* 2006; 86:128a.
56. Barnabas, Nandita, et al. "Chromosome 8 markers of metastatic prostate cancer in African American men: Gain of the MIR151 gene and loss of the NKX3 - 1 gene." *The Prostate* 71.8 (2011): 857-871.
57. Wilson S, Greer B, Hooper J, et al. The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. *Biochem J* 2005; 388: 967-72.
58. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 497-511
59. Mwamukonda K, Chen Y, Ravindranath L, et al. Quantitative expression of TMPRSS2 transcript in prostate tumor cells reflects TMPRSS2-ERG fusion status. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13: 47-5.
60. Cai C, Wang H, Xu Y, et al. Reactivation of androgen receptor-regulated TMPRSS2:ERG gene expression in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 6027-32.
61. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; 310: 644-8.
62. Furusato, B.; Gao, C.L.; Ravindranath, L.; Chen, Y.; Cullen, J.; McLeod, D.G.; Dobi, A.; Srivastava, S.; Petrovics, G.; Sesterhenn, I.A. Mapping of TMPRSS2-ERG fusions in the context of multi-focal prostate cancer. *Mod. Pathol.* 2008, 21, 67–75.
63. Reid, A.H.; Attard, G.; Ambrosine, L.; Fisher, G.; Kovacs, G.; Brewer, D.; Clark, J.; Flohr, P.; Edwards, S.; Berney, D.M.; Foster, C.S.; Fletcher, A.; Gerald, W.L.; Møller, H.; Reuter, V.E.; Scardino, P.T.; Cuzick, J.; de Bono, J.S.; Cooper, C.S; Transatlantic Prostate Group. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. *Br. J. Cancer* 2010, 102, 678–684.
64. Mehra, R.; Tomlins, S.A.; Yu, J.; Cao, X.; Wang, L.; Menon, A.; Rubin, M.A.; Pienta, K.J.; Shah, R.B.; Chinnaiyan, A.M. Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* 2008, 68, 3584–3590.
65. Bookstein, R. Tumor suppressor genes in prostate cancer. Chung, LW.; Isaacs, WB.; Simons, JW., editors. Humana press; Totowa, NJ: 2001. p. 61-93.
66. McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.* 1999; 59:4291–4296. [PubMed: 10485474]
67. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:489–501.
68. Yoshimoto M, Joshua AM, Cunha IW, et al. Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Mod Pathol* 2008;21:1451–60.
69. Reid AH, Attard G, Ambrosine L, et al. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. *Br J Cancer* 2010;102:678–84
70. Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1474–9.
71. Li Y, Su J, DingZhang X, et al. PTEN deletion and heme oxygenase-1 overexpression cooperate in prostate cancer progression and are associated with adverse clinical outcome. *J Pathol* 2011;224:90–100.
72. Ahmad I, Patel R, Singh LB, et al. HER2 overcomes PTEN (loss)- induced senescence to cause aggressive prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:16392–7.
73. Ding Z, Wu CJ, Chu GC, et al. SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 2011; 470:269–73.
74. Thomas GV, Horvath S, Smith BL, Crosby K, Lebel LA, Schrage M, Said J, De Kernion J, Reiter RE, Sawyers CL. Antibody-based profiling of the phosphoinositide 3-kinase pathway in clinical prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:8351–8356. [PubMed: 15623612]
75. Mulholland, David J., et al. "Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth." *Cancer cell* 19.6 (2011): 792-804.

# Genetické vyšetrenie pacientky s karcinómom prsníka so zameraním na význam individuálnej liečby

Peter Weismann<sup>1</sup>, Eva Weismanová<sup>2</sup>, Marta Škultétyová<sup>1</sup>, Ján Markus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Anatomický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovensko; <sup>2</sup>Oddelenie klinickej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety, Heydukova 10, 812 50 Bratislava, Slovensko

## Abstract

In this paper we discuss the ductal invasive breast cancer and the subsequent adjuvant therapy based on standard chemotherapy FAC (5FU / Adriamycine / cyclophosphamide) and the palliative therapy selected according the results of genetic analysis of selected ABC genes responsible for multidrug resistance. The genetic testing before palliative therapy could optimize the choice of therapeutic agents and the disease became stabilized. We can conclude, that genetic testing of ABC genes can help to select the most effective therapy and so it should be beneficial for cancer patients. The idea that cancer patients should be tested for multidrug resistance before treatment is becoming increasingly challenging.

**Key words:** ABC genes , individual treatment, breast cancer

## Úvod

Nadmerná expresia ABC génov hrá podstatnú úlohu pri liekovej odolnosti onkologických pacientov. Onkologická liečba podľa štandardného protokolu využíva konkrétne liečivá, ale v prípade zlyhania terapie a teda progresie ochorenia je možné vybrať inú liečbu. V tomto článku sa zaoberáme konkrétnou liečbou karcinómu prsníka s neo-adjuvantným, adjuvantným a paliatívnym liečebným postupom podľa štandardného protokolu. V tomto prípade boli po zlyhaní liečby detekované metastázy mozgu. Nasledovala paliatívna liečba založená na základe výsledkov genetického testovania vybraných ABC génov a topoizomerázy 2 $\alpha$ . Pomocou genetických analýz sme identifikovali liečivá, ktoré môžu byť substrátom pre nadmieru exprimované ABC transportéry, čím sa znižuje účinok liečby. Nadmerná expresia topoizomerázy 2  $\alpha$  je považovaná za marker pre liečbu založenú na antracyklíne.

## Pacienti a metódy

Pacientka (46 ročná) s duktálnym invazívnym karcinómom prsníka tretieho stupňa s metastázami vo všetkých dvanástich axilárnych lymfatických uzlinách s desať percentnou pozitivitou na estrogénový receptor, pozitivita na progesterónový receptor bola negatívna. Pozitivita na receptor Her2/neu bola signifikantne pozitívna (3+). S nasadením neoadjuvantnej chemoterapie (CHT): FAC sa dosiahol len čiastočný ústup ochorenia. Pacientke boli odobrané obidva prsníky. Nasledovala genetická analýza ABC génov a expresie topoizomerázy 2 $\alpha$ . Adjuvantná chemoterapia pomocou Docetaxelu, Herceptínu a Tamoxifénu nezabrala a ochorenie naďalej progredovalo. Zvýšila sa hladina CA15-3 a vyskytli sa metastázy v kostiach a mediastinálnych lymfatických uzlinách. Po paliatívnej liečbe Navelbinom a Herceptínom ochorenie naďalej progredovalo. Vyskytli sa metastázy v obidvoch mozgových hemisférach. Ochorenie postupovalo aj počas samotnej liečby. Nasadila sa rádioterapia CNS. Potom bola použitá čiastočne personalizovaná liečba Gemzarom s Navelbinom. Po tejto liečbe sa ochorenie stabilizovalo.

## Výsledky 1/2

Pomocou qRT-PCR (relatívna kvantifikácia –  $\Delta\Delta Ct$ ) bolo nádorové tkanivo pacientky analyzované na zvýšenú expresiu ôsmich vybraných ABC génov, génu pre topoizomerázu 2 $\alpha$  (*TOP2 $\alpha$* ) a päť referenčných génov pre normalizáciu dát (Tab1.). Hodnota RQ (hodnota nadmernej expresie) bola akceptovateľná v prípade ak  $\Delta CtSE \leq 1,7$ . ABC gény s RQ >2 boli považované za nadmerne exprimované.

**Tab. 1.** Zoznam vybraných ABC génov a referenčné gény pre normalizáciu.

<b>ABC TRANSPORTERS + topoisomerase 2<math>\alpha</math></b>
ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCG2, ABCC11 + TOP2A
<b>REFERENCE GENES</b>
GAPDH, IPO8, EIF, PPIA, B2M

## Výsledky 2/2

V neoadjuvantnom režime liečby bol aplikovaný komplex liečiv - 5fluorouracil, Adriamycín a cyklofosamid (FAC). Pričom 5-fluorouracil je substrátom pre ABCC11, ABCC-5 transportéry a cyklofosamid je substrátom pre ABCC1, ABCC4 a ABCG2 transportéry. Pri tejto liečbe bol zaznamenaný len čiastočný ústup nádorového ochorenia.

V nádorovom tkanive po hore uvedenej neoadjuvantnej liečbe a mastektómii bola detekovaná nadmerná expresia génov ABCB1, ABCC3 a mierne zvýšená expresia ABCC4, ABCC11 a TOP2 $\alpha$ . Nasledovala prvá adjuvantná liečba Docetaxelom s Herceptínom a Tamoxifénom. Pričom Docetaxel je substrátom pre ABCB1 transportéru, Tamoxifen je substrátom pre ABCC2 a Herceptin nie je substrátom pre ABC transportéry. U pacientky boli zaznamenané metastázy v kostiach a lymfatických uzlinách mediastína.

*Prvá paliatívna liečba* Navelbinom a Herceptinom. Navelbin je substrátom pre ABCB1 a ABCC1-C3 transportéry. Bol zaznamenaný postup ochorenia a rozvoj metastáz.

*Druhá paliatívna liečba* Gemzarom a Navelbinom. Gemzar je substrátom pre ABCC4, ktorého expresia v nádorovom tkanive pacientky bola len hraničná. A ako sme už spomínali skôr, Navelbin je substrátom pre ABCB1 a ABCC1-C3 transportéry. Po tejto liečbe sa ochorenie stabilizovalo a hladina prognostického nádorového markeru používaného pri karcinóme prsníka - CA15-3 klesla.

## Diskusia

Zistili sme progresiu ochorenia po prvej neoadjuvantnej chemoterapii a prvej adjuvantnej terapii. Je vysoko pravdepodobné, že všetky štandardne použité režimy liečby boli suboptimálne a umožnili progresiu ochorenia a výskyt metastáz (3).

Paliatívna liečba čiastočne založená na výsledkoch genetických analýz ABC transportérov znamenala stabilizáciu ochorenia a pokles nádorového markeru CA15-3 (3).

Podľa popísanej liečby môžeme predpokladať, že onkologickí pacienti by mohli mať prospech z personalizovanej liečby založenej na genetickej analýze ABC génov a topoizomeráz. Zdá sa, že je potrebné rozšíriť genetické analýzy na všetky ABC gény.

## Použitá literatúra

1. Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G., (2001): The Human ATP-binding cassette (ABC) superfamily. *J Lipid Res*, 42, 107-117.
2. Schinkel, A. H., Jonker, J. W., (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 3-29.
3. Zhang, J. T., (2007): Use of arrays to investigate the contribution of ATP binding cassette transporters to drug resistance in cancer chemotherapy and prediction of chemosensitivity. *Cell Res*, 17, 311-323.



# Variácie *Arteria communicans posterior*: morfológická štúdia

Peter Weismann, Hisham El Falougy

*Anatomický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 2, 813 72  
Bratislava, Slovensko*

## Abstrakt

Najčastejšia bežná variácia cievneho priemeru u ľudí sa vyskytuje pri *arteria communicans posterior* (ACoP). Obidve artérie predstavujú kolaterálne cievy medzi *arteria carotis interna* a vertebr bazilárnym systémom. Cieľom tejto štúdie je zhodnotenie diametrov ACoP, P1 segmentu a výskyt cievnych usporiadaní ACoP. V práci sme použili 200 ľudských mozgov (post mortem), ktoré sme získali počas anatomických pitiev na LF UK v Bratislave. Jednostonné fetálne usporiadanie sme našli na 21 mozgoch (10,5% prípadov) a bilaterálne na siedmich mozgoch (3,5% prípadov). Jednostranné usporiadanie typické pre dospelého jedinca sa vyskytovalo na 37 mozgoch (18,5% prípadov) a bilaterálne usporiadanie na 11 mozgoch (5,5% prípadov). Jenostranná hypoplastická artéria sa vyskytovala v 32,5% prípadoch. Rôzne usporiadanie ACoP môže mať z klinického pohľadu rôzne dôsledky hlavne na okcipitálny lalok, ktorý je cievne zásobený z *arteria cerebialis posterior*.

**Kľúčové slová:** morfológia, *arteria comunicans posterior*, morfometria, variácia, hypoplázia

## Úvod

Anomálie a zmeny počas embryonálneho štádia vývoja môžu zapríčiniť mnoho variácií v usporiadaní a diametre mozgových artérií. Jednotlivé artérie tvoriace Willisov okruh môžu byť chýbať, byť hypoplastické, zdvojené alebo až strojené. Najčastejšie sa vyskytujúca variácia diameteru cievy (v tejto oblasti) medzi jedincami, sa vyskytuje pri *arteria comunicans posterior*. Párové *arteriae communicantes posteriores* predstavujú kolaterálne cievy medzi *arteria carotis interna* a vertebr bazilárnym systémom. Podľa morfológických štúdií je ACoP definovaná ako hypoplastická ak má priemer menší ako 1 mm (1, 2). *Arteria cerebialis posterior* je koncová vetva artérie *basilaris* na úrovni *fossa interpeduncularis*. Je rozdelená podľa jej pripojenia s ACoP na prekomunikačnú časť (P1) a postkomunikačnú časť (P2). Mnohí autori na základe vzťahu diameteru ACoP k diameteru P1, rozoznávajú a popisujú tri typy usporiadaní ACoP. Pri dospelom usporiadaní je v oblasti P1 diameter väčší ako má nehypoplastická ACoP. V prechodnom usporiadaní je diameter ACoP rovnaký ako v oblasti P1. Pri fetálnom usporiadaní je diameter ACoP väčší ako diameter pri P1 (3, 4).

Cieľom tejto štúdie bolo zmerať diametre ACoP a P1 segmentu a vyhodnotiť výskyt jednotlivých cievnych usporiadaní ACoP.

## Materiál a metódy

Prácu sme realizovali na 200 ľudských mozgoch (post mortem), ktoré sme získali počas anatomických pitiev na LF UK v Bratislave. Mozgy boli vypreparované z lebečnej dutiny a fixované v roztoku formalínu a benzínalkoholu. Kvôli hodnoteniu diameteru ciev sme z mozgovej bázy opatrne odpreparovali arachnoideu. Na dokumentáciu *circulus arteriosus Willisii* a jeho vetiev sme použili fotoaparát *Camedia C-5050* (Olympus). Vonkajší priemer hodnotených ciev a ich dĺžku sme merali pomocou počítačového programu *Cell F* (Olympus). Nasnímané obrázky boli pre účely počítačovej morfometrie kalibrované pomocou mierky priloženej ku každej nasnímanej fotografii hodnoteného materiálu.

## Výsledky

Jednostranný fetálny spôsob usporiadania sa vyskytol pri 21 mozgoch (10,5% prípadov) a bilaterálny pri siedmich mozgoch (3,5% prípadov). Prechodný spôsob usporiadania sa vyskytoval v 4% prípadov. Jednostranný spôsob usporiadania sa vyskytol pri 37 mozgoch (18,5% prípadov) a obojstranný pri 11 mozgoch (5,5% prípadov).

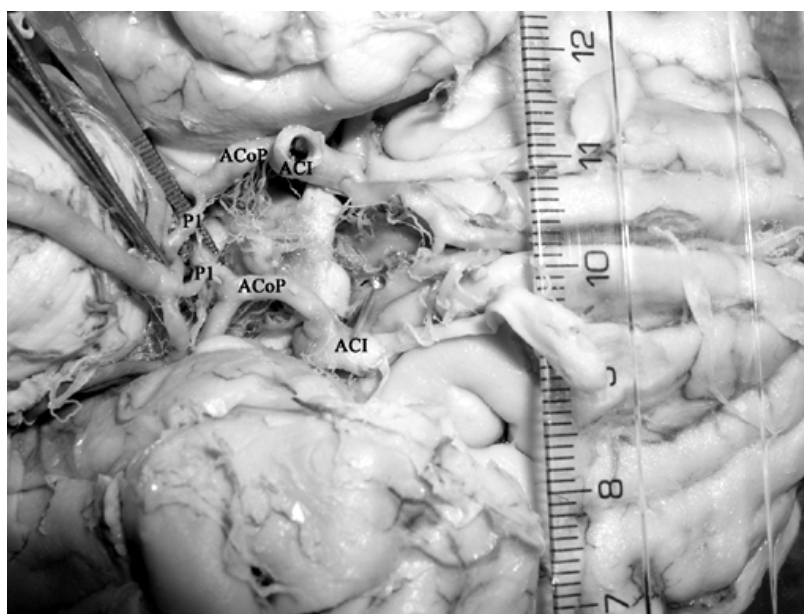
Obojstranná hypoplázia ACoP bola zaznamenaná až pri 77 mozgoch (38,5%) prípadov. Jednostranná hypoplastická artéria sa vyskytovala v 32,5% prípadoch. Pritom ľavostranná hypoplázia

bola pozorovaná pri 39 mozgoch (19,5% prípadov). Pravostranná hypoplázia ACoP sa vyskytovala pri 26 mozgoch (13% prípadov). ACoP chýbala v 5% prípadov. Pravostranná aplázia sa vyskytla pri troch mozgoch a ľavostranná pri siedmich.

Vonkajší diameter P1 bol bilaterálne menší ako 1mm pri piatich mozgoch (2,5%). Pravý P1 segment bol menší ako 1 mm pri deviatich mozgoch (4,5% prípadov) a ľavý P1 segment bol hypoplastický pri štyroch mozgoch (2% prípadov). Zdvojená ACoP bola nájdená v jednom prípade.

**Tab. 1.** Rozsah diametrov a stredný priemer ( $\pm$  smerodajná odchýlka priemeru) arteria communicans posterior (ACoP) a prekomunikačnej časti arteria cerebialis (P1).

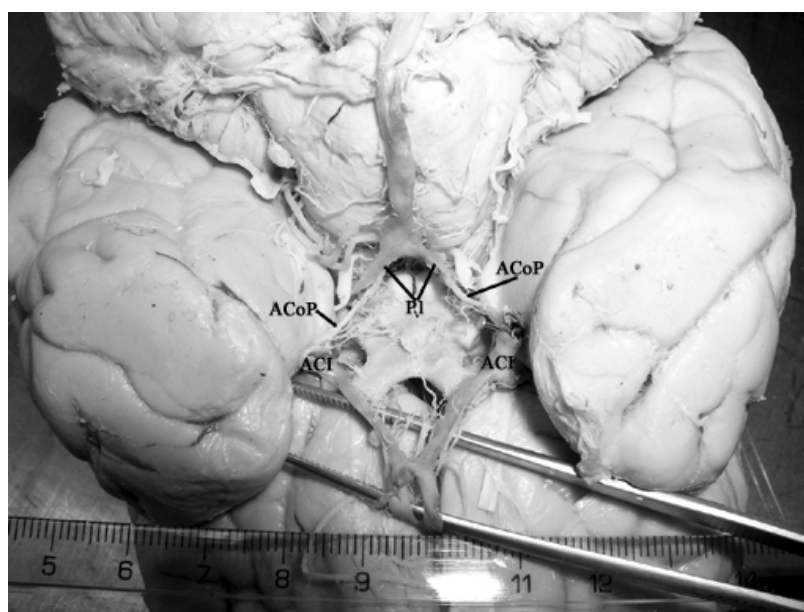
	ACoP	P1
rozsah (mm)	0,34 – 2,78	0,423 – 3,41
stredný priemer (mm)	$1,05 \pm 0,035$	$1,88 \pm 0,038$



**Obr. 1.** Bilaterálny fetálny spôsob usporiadania arteria (ACoP).

ACI - arteria carotis interna.

P1 – prekomunikačná časť arteria cerebialis posterior.



**Obr. 2.** Bilaterálna hypoplázia arteria communicans posterior (ACoP).

ACI – arteria carotis interna.

P1 – prekomunikačná časť arteria cerebialis posterior.

## Diskusia

Variácia mozgových ciev môže byť spôsobená: 1. výberom nezvyčajných ciest z primitívneho cievneho zväzku, 2. pretrvávajúce zvyčajne obliterovaných ciev, 3. vymiznutie zvyčajne pretrvávajúcích ciev, 4. nekompletný vývoj, 5. fúzia a absorbcia bežne odlišných častí ciev (5,6).

Definícia hypoplastickej ACoP sa líši podľa typu štúdie a podľa použitého spôsobu merania. V rôznych morfológických štúdiách sa používa hodnota 1 mm ako prah pre určenie cievnej hypoplázie. Rádiologické štúdie považujú za prahovú hodnotu 0,4 až 0,8 mm (7). My sme považovali za prahovú hodnotu 1 mm. Pri nižších hodnotách sme artérie považovali za hypoplastické. Diameter ciev nie je konštantný a môže sa priebežne v malom rozsahu meniť. Vonkajší diameter hypoplastickej artérie sa preto môže občas zväčšiť a dosiahnuť 1 mm (8). Merania post mortem sú aplikované na prázdnych a scvrknutých cievach, čo môže zapríčiniť odlišnosti v nameraných hodnotách diametrov medzi morfometrickými a rádiologickými štúdiami.

V predchádzajúcich štúdiách iných autorov vykazovalo usporiadanie ACoP pomerne vysokú rôznorodosť. Výskyt fetálneho spôsobu usporiadania sa pohyboval medzi 15 až 40% prípadov. Prechodný spôsob bol dokázaný v 8 až 18% prípadov a dospelý spôsob usporiadania bol zistený v rozsahu od 30 do 77% prípadov.

Hypoplázia ACoP bola v rozmedzí 18 až 32%. Pravá ACoP chýbala v 2,2 až 4,5 % a ľavá v 0,85 až 6,5% prípadov (3, 4, 9, 10). Najčastejším nálezom v našej práci bola hypoplázia ACoP (38,5% bilaterálne a 32,5% unilaterálne). Výskyt fetálneho spôsobu usporiadania bol v rozsahu obdobnom ako v predchádzajúcich prácach iných autorov, ale výskyt prechodného a dospelého usporiadania bol nižší. Netypické konfigurácie usporiadania ACoP môžu mať z klinického hľadiska rôzne dôsledky, hlavne na lobus occipitalis, ktorý je cievne zásobený z arteria cerebialis posterior (3, 11). Vo fyziologickom prípade sú krvné tlaky v oboch systémoch – vertebrobazilárnom aj arteria carotid interna, rovnaké ako v ACoP a ich krv sa teda nemieša. Na druhej strane, ak sa vyskytne v niektorom z týchto systémov obštruktívna choroba, krv bude prúdiť z „normálneho“ systému do toho ktorý bude mať nižší tlak cez komunikačné artérie (5, 7, 12).

Hypoplázia ACoP sa stáva rizikovým faktorom ischemickej mozgovej mŕtvice v prípade výskytu ipsilaterálneho uzáveru arteria carotis interna. Pri výskyte hypoplázie ACoP je vyšší výskyt aneuryziem v prípadoch vo fetálnom a prechodnom systéme usporiadania ciev ako je tomu pri dospelom systéme (4).

## Použitá literatúra

1. Schomer DF, Marks MP, Steinberg GK, et al. The anatomy of the posterior communicating artery as a risk factor for ischemic cerebral infarction. *N Engl J Med* 1994;330:1565–70.
2. Yu-Ming Chuang, Chih-Yang Liu, Po-Jung Pan, Ching-Po Lin. Posterior communicating artery hypoplasia as a risk factor for acute ischemic stroke in the absence of carotid artery occlusion. *Journal of Clinical Neuroscience* 2008; 15: 1376–1381
3. De Silva KRD, Silva TRN, Gunasekera WSL, Jayasekera RW. Variation in the origin of the posterior cerebral artery in adult Sri Lankans. *Neurology India* 2009; 57 (1)
4. Avci E, Baskaya MK. The surgical anatomy of the anomalous posterior communicating artery. *International Congress Series* 2004; 1259: 3 – 10
5. Arey LB. *Developmental anatomy*. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 1965: 1 – 695.
6. Vasovic L, Milenkovic Z, Pavlovic S. Comparative morphological variations and abnormalities of circles of Willis: a minireview including two personal cases. *Neurosurg Rev* 2002; 25:247–251
7. Saha A, Bhagyalakshmi B, Mandal S, Banopadhyaya M. Variation of posterior communicating artery in human brain: a morphological study. *Gomal J Med Sci* 2013; 11: 42-6.
8. Papantchev V, Hristov S, Todorova D et al. Some variations of the circle of Willis, important for cerebral protection in aortic surgery — a study in Eastern Europeans. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* 2007; 31: 982—989
9. Al-Hussain SM, Shoter AM, Bataina ZM. Circle of Willis in adults. *Saudi Medical Journal* 2001; 22 (10): 895-898

10. Van Overbeeke JJ, Hillen B, Tullekena CAF. Comparative study of the circle of Willis in fetal and adult life. The configuration of the posterior bifurcation of the posterior communicating artery. *J. Anat.* 1991; 176: 45-54
11. Krishnamurthy A, Nayak SR, Kumar CG et al. Morphometry of posterior cerebral artery: embryological and clinical significance. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2008; 49(1): 43-45
12. Van Raamt AF, Mali WPTM, Van Laar PJ et al. The Fetal Variant of the Circle of Willis and Its Influence on the Cerebral Collateral Circulation. *Cerebrovasc Dis* 2006; 22: 217-224

## Hypermethylation of DNA – new biomarker for prostate cancer (mini review)

Ľuboš Danišovič<sup>1</sup>, Zuzana Varchulová Nováková<sup>1</sup>, Stanislav Žiaran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia;* <sup>2</sup>*Department of Urology with Centre for Kidney Transplantation, Faculty of Medicine and University Hospital, Comenius University, Limbova 5, 833 05 Bratislava, Slovakia*

### Abstract

Prostate cancer belongs to most common cancers and it is second leading cause of cancer death in men. A genetic predisposition with epigenetic changes in DNA contributes to the development of the disease. The methylation of the cytosine located within dinucleotide CpG of promoter regions of specific genes belong to most studied epigenetic changes. This article is aimed at brief review of information in respect to DNA hypermethylation and prostate cancer development.

**Key words:** prostate cancer, biomarkers, epigenetics, DNA hypermethylation

### Introduction

Prostate cancer (PCa) belongs to most common cancers and it is second leading cause of cancer death in men (over 250.000 men dies worldwide every year). A genetic predisposition or acquired genetic and epigenetic changes with effect of other factors, such as advanced age, race and environmental factors contribute to PCa development (Demichelis and Stanford, 2014).

PCa is a very heterogeneous disease that is characterized by different clinical behaviour, from indolent, slow-growing tumors to aggressive, fast-growing tumors with lethal progression. Early diagnostics and identification of PCa type are crucial prerequisites for efficient treatment of patients. Recently, the diagnostics of early stages of PCa is based mostly on evaluation of prostate-specific antigen (PSA) in serum of patients (Lilja et al., 2008). Men with high levels of PSA undergo biopsy in order to determine histopathological grading of PCa – Gleason scoring which classifies tumors from 1 to 5 (most to least differentiated) (Epstein, 2010) as well as staging – determination of the status of their primary tumors (T1 – T4; from bounded to fully invasive), with or without lymph node involvement (N0 or 1) (Cheng et al., 2012). The results from this screening diagnosis lead into conventional treatment, including radical prostatectomy and brachytherapy. In case of advanced PCa, conventional treatment continues with with androgen deprivation therapy. However, in many cases the cancer recurs (Michaelson et al., 2008).

At present, the clinicians and researchers are forced to find more precise and sensitive biomarker suitable for PCa diagnostics as well as prognostics and therapy. The excessive study of epigenetical mechanisms, including DNA hypermethylation provides promising results in this context (Chin et al., 2011).

The main goal of the present article is to offer brief review of information in respect to DNA hypermethylation and PCa development.

### DNA hypermethylation

Methylation of DNA is their covalent modification by binding of the methyl group to cytosine in dinucleotides containing cytosine and guanine (CpG). These dinucleotides are present in the DNA sequence and they are termed as CpG islands. They occur in about 60% of all genes in the human genome. They are responsible for controlling the gene expression and their methylation lead into silencing of transcriptional activity of the downstream gene. There are a lot of different genes, including tumor suppressor genes, genes involved in metabolism and genes responsible for cell invasion, which has been extensively studied in respect to PCa risk due to their methylation (Yang and Park, 2012).

The most known genome alteration in PCa is hypermethylation of CpG at promoter of Glutathione S transferase P1 (GSTP1). It occurs in majority (>90%) of PCa cases but it is not present in normal tissues (Lee et al., 1997). The loss of GSTP1 activity lead into increasing of oxidative damage of DNA which may lead in increase of PCa risk. GSTP1 hypermethylation is usually detected in high frequency in urine, blood and ejaculates of PCa patients.

Another frequently investigated is gene for Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) which is involved in PCa progression and metastasis. It was documented that hypermethylation of gene for TIMP-2 lead into its down-expression in PCa when compared with normal tissue (Pulukuri et al.,

2007). On the contrary, there are several works which described the overexpression of TIMP-2 in PCa. Moreover, Ross et al. (2003) showed correlation between TIMP-2 expression and clinical stages and recurrence.

The lack of Retinoic acid receptor  $\beta$  (RAR $\beta$ ) expression is typical for tumor tissues. This is due to hypermethylation of promoter RAR $\beta$  which occurs in 40 – 84% of PCa tissues (Nakayama et al., 2001; Zon et al., 2009). Moreover, moderate or high frequencies of RAR $\beta$  promoter methylation were also documented in urine or blood samples (Bastian et al., 2008; Rouprêt et al., 2008). It makes RAR $\beta$  promoter hypermethylation promising biomarker for early PCa detection.

Recent studies, reported hypermethylation in promoter of Caveolin-1 (CAV1) gene in respect to PCa. CAV1 belongs to tumor suppressor genes which are involved in vesicular transport, cholesterol balance, transformation and tumorigenesis. Moreover, it acts as metastasis-promoting gene (Chang et al., 2013; Patra and Bettuzzi, 2007). It was shown that increased DNA hypermethylation of CAV1 gene is associated with biochemical recurrence in patients with PCa (Bachmann et al., 2008). On the other hand CAV1 overexpression was recorded in patients with aggressive PCa recurrence (Karam et al., 2007). These conflicting data suggest that hypermethylation of CAV1 may not be an unfailing biomarker for detection of PCa.

The table 1 provides overview of different genes which has been studied in respect to hypermethylation and PCa development.

**Table 1.** Overview of different genes studied in respect to hypermethylation and PCa development.

<b>Group</b>	<b>Examples</b>
Tumor suppressor genes	Caveolin-1 Cyclin-dependent kinase inhibitors Death-associated protein kinase Fragile histidine triad Lipoprotein lipase Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 Tumor necrosis factor receptor superfamily
Genes involved in metabolism	Androgen receptor Estrogen receptors Retinoic acid receptor $\beta$ Glutathione S transferase P1 Cellular retinol-binding protein 1 Endothelin B receptor Gene Aldehyde dehydrogenase 1A2 and 1A3
Tumor cell invasion / metastasis	Adenomatous polyposis coli (APC) CD44 E-cadherin H-cadherin S100 calcium-binding protein A2 Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 SRC family tyrosine kinase Neutral endopeptidase 24.11
DNA repair genes	Methylguanine-methyltransferase

### **Clinical application of DNA hypermethylation**

The “classical” diagnostics of PCa is based mainly on evaluation of PSA levels in serum and evaluation of needle biopsies. In some cases the results may be false negative. Recently, these standard approaches are supplemented by molecular diagnostics, including evaluation of DNA hypermethylation in selected genes. It was shown that the utilization of a multigene methylation panel including GSTP1, APC, TIG1 and RAR $\beta$ 2 significantly increases the sensitivity of diagnostics of PCa in comparison with histological evaluation (Rosenbaum et al., 2005).

For a more exact interpretation of the results there are available several scoring systems, such as methylation index (MI) which is defined as the ratio of methylated genes and the total number of analyzed genes (Tilandyová et al., 2010). The positive correlation between MI and Gleason score was

demonstrated. It was also demonstrated that increased level of methylation in APC promoter seem to be good predictor of unfavorable prognosis. The higher level of methylation of GSTP1 and APC are in good correlation with high level of PSA. Moreover, hypermethylation of two genes, including GSTP1 and APC correlated with pT stage or Gleason score. The increased levels of their hypermethylation were also associated with progression of PCa and lead into biochemical recurrence after radical prostatectomy (Ellinger et al., 2008).

On the other hand, the utilization of hypermethylation of selected genes in clinical practice may be affected by biological variability (in selected population) as well as by preparation of material and methodological approaches; but this may be overlapped by unification and standardization of selected methods.

### **Conclusion**

A number of studies were established to check the capability of quantitative changes in DNA hypermethylation, as measured either in PCa tissues or in serum and urine, to augment prediction of outcome for PCa patients. Although large trials are required prior clinical implementation, several of these studies suggest that hypermethylation biomarkers may add value to existing models used for prediction of outcome in PCa.

### **Acknowledgement**

The study was supported by the grant VEGA No. 1/1250/12.

### **References**

1. Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(4):268-78.
2. Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *J Urol*. 2010; 183(2):433-40.
3. Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology*. 2012;60(1):87-117.
4. Michaelson MD, Cotter SE, Gargollo PC, Zietman AL, Dahl DM, Smith MR. Management of complications of prostate cancer treatment. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(4):196-213.
5. Chin SP, Dickinson JL, Holloway AF. Epigenetic regulation of prostate cancer. *Clin Epigenetics*. 2011; 2(2):151-169.
6. Lee WH, Isaacs WB, Bova GS, Nelson WG. CpG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 6: 443-50, 1997.
7. Yang M, Park JY. DNA Methylation in Promoter Region as Biomarkers in Prostate Cancer. *Methods Mol Biol*. 2012; 863: 67–109.
8. Pulukuri SM, Patibandla S, Patel J, Estes N, Rao JS. Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors. *Oncogene*. 2007;26(36):5229-37.
9. Ross JS, Kaur P, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RA Jr, Kallakury BV. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer. *Mod Pathol*. 2003; 16(3):198-205.
10. Nakayama T, Watanabe M, Yamanaka M, Hirokawa Y, Suzuki H, Ito H, Yatani R, Shiraishi T. The role of epigenetic modifications in retinoic acid receptor beta2 gene expression in human prostate cancers. *Lab Invest*. 2001; 81(7): 1049-57.
11. Zon G, Barker MA, Kaur P, Groshen S, Jones LW, Imam SA, Boyd VL. Formamide as a denaturant for bisulfite conversion of genomic DNA: Bisulfite sequencing of the GSTP1 and RARBeta2 genes of 43 formalin-fixed paraffin-embedded prostate cancer specimens. *Anal Biochem*. 2009;392(2):117-25.
12. Bastian PJ, Palapattu GS, Yegnasubramanian S, Rogers CG, Lin X, Mangold LA, Trock B, Eisenberger MA, Partin AW, Nelson WG. CpG island hypermethylation profile in the serum of men with clinically localized and hormone refractory metastatic prostate cancer. *J Urol*. 2008; 179(2):529-34.
13. Rouprêt M, Hupertan V, Catto JW, Yates DR, Rehman I, Proctor LM, Phillips J, Meuth M, Cussenot O, Hamdy FC. Promoter hypermethylation in circulating blood cells identifies prostate cancer progression. *Int J Cancer*. 2008; 122(4):952-6.
14. Patra SK, Bettuzzi S. Epigenetic DNA-methylation regulation of genes coding for lipid raft-associated components: a role for raft proteins in cell transformation and cancer progression (review). *Oncol Rep*. 2007; 17(6):1279-90.

15. Chang WS, Lin SS, Li FJ, Tsai CW, Li LY, Lien CS, Liao WL, Wu HC, Tsai CH, Shih TC, Bau DT. Significant association of caveolin-1 (CAV1) genotypes with upper urothelial tract cancer. *Anticancer Res.* 2013; 33(11):4907-12.
16. Bachmann N, Haeusler J, Luedeke M, Kuefer R, Perner S, Assum G, Paiss T, Hoegel J, Vogel W, Maier C. Expression changes of CAV1 and EZH2, located on 7q31 approximately q36, are rarely related to genomic alterations in primary prostate carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008; 182(2):103-10.
17. Karam JA, Lotan Y, Roehrborn CG, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Shariat SF. Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. *Prostate.* 2007; 67(6):614-22.
18. Rosenbaum E, Hoque MO, Cohen Y, Zahurak M, Eisenberger MA, Epstein JI, Partin AW, Sidransky D. Promoter hypermethylation as an independent prognostic factor for relapse in patients with prostate cancer following radical prostatectomy. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(23):8321-5.
19. Tilandyová P, Kajo K, Kliment J, Plank L, Lasabová Z. Detection of DNA hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer. *Klin Onkol.* 2010; 23(5):293-9.
20. Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, Büttner R, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate.* 2008;68(1):42-9.