

Paweł Wieczorek

Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II jako biomarker w diagnostyce i leczeniu raka prostaty

Rozprawa doktorska

Promotor : Dr hab. Andrzej Antczak

Katedra i Klinika Urologii i Onkologii Urologicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu.

Poznań, 2020 r.

*Mojej żonie za wykazaną cierpliwość i pozytywną motywację w procesie twórczym.
Prof. dr hab. Zbigniewowi Kwiasowi oraz Dr hab. Andrzejowi Antczakowi
za nadzór merytoryczny i przygotowanie mnie do zawodu urologa.
Zespołowi pielęgniarskiemu i lekarskiemu Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze
oraz Pani analityk mgr Katarzynie Gramackiej bez wkładu których nie byłoby tej pracy.*

Dziękuję.

Spis treści

1. Wprowadzenie	8
1.1. Podstawowe informacje o gruczole krokowym	8
1.2. Rak gruczołu krokowego	9
1.2.1. Epidemiologia.....	9
1.2.2. Czynniki ryzyka	12
1.2.3. Patomorfologia.....	12
1.2.4. Patofizjologia, objawy i przebieg naturalny	13
1.2.5. Diagnostyka i rozpoznanie	15
1.2.5.1. Wielomiejscowa biopsja stercza	15
1.2.5.2. Wskazania do biopsji	16
1.2.5.3. Ocena stopnia złośliwości w skali Gleasona.....	17
1.2.5.4. Przyporządkowanie do poszczególnych grup ryzyka	19
1.2.6. Markery i ich rola w diagnostyce i monitorowaniu raka prostaty	19
1.2.6.1. PSA	19
1.2.6.2. fPSA/tPSA	21
1.2.6.3. PSAV	21
1.2.6.4. PSAD	23
1.2.6.5. APSA (Age Prostate Specific Antigen)	23
1.2.6.6. Leptyna.....	24
1.2.6.7. PCA3	25
1.2.6.8. TMPRSS2-ERG.....	26
1.2.6.9. PHI	27
1.2.6.10. 4Kscore.....	28
1.2.7. Niedoskonałości dotychczasowo stosowanych markerów	30
1.2.8. Czym jest Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II (IMPDH 2)?	33
1.2.9. Związek IMPDH 2 z rakiem prostaty.....	34
2. Cel pracy	36
3. Materiał i metody	37
3.1. Charakterystyka grupy badanej.	37
3.2. Charakterystyka grupy kontrolnej.....	46
3.3. Analiza statystyczna.	48

4. Wyniki.....	50
4.1. Informacje o zmiennych.....	50
4.2 Wyniki dodatkowe	51
4.3 Wyniki główne.....	58
5. Dyskusja.....	85
6. Wnioski	99
7. Suplement	100
8. Spis rycin	104
9. Spis tabel	104
10. Spis wykresów	105
11. Streszczenia.....	107
11.1. Streszczenie.....	107
11.2. Abstract	109
12. Piśmiennictwo.....	111

Wykaz skrótów stosowanych w tekście

4K score-	Four Kallikrein Score	Panel czterech kalikrein sterczowych
ACS-	Amercan Cancer Society	
	Amerykańskie stowarzyszenie chorób nowotworowych	
ADT-	Androgen Deprivation Therapy	Terapia antyandrogenowa
APSA-	Age Prostate Specific Antigen	
	Norma wiekowa swoistego antygenu sterczowego	
AS-	Active Surveillance	Aktywny nadzór
ASAP-	Atypical Small Acinar Proliferation	Atypowy rozrost drobnozrazikowy
AUC-	Area Under the Curve	Pole pod krzywą
BCR-	Biochemical Relapse	Wznowa biochemiczna
BMI-	Body Mass Index	Indeks masy ciała
BPE-	Benign Prostatic Enlargement	Łagodne powiększenie prostaty
BPH-	Benign Prostatic Hyperplasia	Łagodny przerost prostaty
BOO-	Blader Outlet Obstruction	Przeszkoda podpęcherzowa
CaP-	Prostate Cancer	Rak prostaty
ChNS-	Choroba niedokrwienna serca	
CSS-	Cancer Specific Survival	Przeżycie specyficzne dla nowotworu
CT-	Computed Tomography	Tomografia komputerowa
DRE-	Digital Rectal Exmination	Badanie palcem przez odbytnicę
EAU-	European Association of Urology	Europejskie stowarzyszenie urologiczne
ELISA-	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Test immunoenzymatyczny
EPS-	Expressed Prostatic Secretion	Wyciśnięta wydzielina prostaty
ERSPC-	European Randomized study of Screening for Prostate Cancer	
	Europejskie randomizowane badanie skriningu raka prostaty	
ETS-	Erythroblast Transformation Specific	
	Specyficzny czynnik transformacji erytroblastów	
FDA-	Food and Drug Administration	Agencja żywności i leków
GMP-	Guanosine Monophosphate	Guanozynomonofosforan
hKLK2-	Human Kallikrein 2	Ludzka kalikreina 2
hKLK3-	Human Kallikrein 3	Ludzka kalikreina 3
IMP-	Inosine Monophosphate	Inozynomonofosforan
IMPDH2-	Inosine Monophosphate Dehydrogenase 2	
	Dehydrogenaza inozynomonofosforanowa 2	
iPSA-	Intact Prostate Specific Antigen	Nietknięty PSA
LH-	Luteinizing Hormone	Lutropina

LH-RH-	Luteinizing Hormone Releasing Hormone	Hormon uwalniający lutropinę
LUTS-	Lower Urinary Tract Symptoms	
	Objawy z dolnego odcinka układu moczowego	
mpNMR-	Multiparametric Nuclear Magnetic Resonance	
	Multiparametryczny rezonans magnetyczny	
MRI-	Magnetic Resonance Imaging	Obrazowanie met. rezonansu magnetycznego
NAD-	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Dinukleotyd Nikotynoamidoadeninowy
NCCC-	National Collaborating Centres for Cancer	
	Narodowe współpracujące centra leczenia chorób nowotworowych	
OS-	Overall Survival	Przeżycie całkowite
PCA-3-	Prostate Cancer Gene 3	Gen trzeci raka prostaty
PET-CT	Pozyton Emission Tomography Computed Tomography	
	Pozytonowa tomografia emisyjna	
PHI-	Prostate Health Index	Wskaźnik zdrowia prostaty
PIN-	Prostatic Intraepithelial Neoplasia	Śródnabłonkowe nowotworzenie
PIRADS-	Prostate Imaging Reporting and Data System	
	System oceny i podawania danych obrazów prostaty	
PLCO-	Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial	
	Badanie skriningu raka prostaty, płuc, jelita grubego i jajnika	
PPV-	Positive Predictive Value	Dodatnia wartość predykcyjna
PSA-	Prostate Specific Antigen	Swoisty antygen sterczowy
PSA-ACT-	Alpha 1-Antichymotrypsin PSAPSA związane z Alfa 1-Antychymotrypsyną	
PSA-AMG-	Alpha 2-Makroglobulin PSA	PSA związane z Alfa 2-Makroglobuliną
PSAD-	Prostate Specific Antigen Density	Gęstość PSA
PSADT-	Prostate Specific Antigen Doubling Time	Czas podwojenia PSA
PSA f/t-	Prostate Specific Antigen Free to Total Ratio	
	Stosunek PSA wolnego do całkowitego	
PSA-TZ-	Prostate Specific Antigen-Transition Zone	Gęstość PSA strefy przejściowej stercza
PSAV-	Prostate Specific Antigen Velocity	Prędkość przyrostu PSA
PSMA-	Prostate Specific Membrane Antigen	Ligand antygenu błony komórek stercza
OS-	Overall Survival	Przeżycie całkowite
qRT-PCR-	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction	
	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy =	
	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym	
TNM-	Tumor Nodulus Metastases	
	Skala patomorfologiczna Guz Węzły Przerzuty	
TRUS-	Trans Rectal Ultrasound	Ultrasonografia przezodbytnicza

TUR-P-	Trans Urethral Resection-Prostate	
	Przecewkowa elektroresekcja gruczołu krokowego	
USPIO-	Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide	
	Ultramałe paramagnetyczne cząsteczki tlenku żelaza	
VDR-	Vitamin D Receptor	Receptor witaminy D
WHO-	World Health Organization	Światowa organizacja zdrowia
WW-	Watchful Waiting	Baczna obserwacja
XMP-	Xanthosine Monophosphate	Ksantozynomonofosforan

1. Wprowadzenie

1.1. Podstawowe informacje o gruczole krokowym

Prostata jest nieparzystym, męskim, dodatkowym gruczołem płciowym położonym w miednicy mniejszej pozaotrzewnowo, poniżej pęcherza moczowego. Otacza proksymalną część cewki moczowej, na odcinku od jej ujścia wewnętrznego (szyja pęcherza) do zwieracza zewnętrznego cewki (przepona moczowo-płciowa). Jej powierzchnia tylna oddzielona jest od odbytnicy poprzez cienką warstwę tkanki łącznej, tłuszcz okołoodbytniczy oraz błonę nazwaną powięzią Denonvilliersa. Szczyt stercza jest przytwierdzony do tylnej powierzchni kości łonowej poprzez tzw. więzadła łonowo-sterczowe. Powyżej prostaty, ku tyłowi od pęcherza moczowego znajdują się parzyste pęcherzyki nasienne, których przewody wytryskowe łączą się z nasieniowodami i uchodzą do cewki moczowej na wzgórku nasiennym. W obrębie tkanki łącznej otaczającej gruczoł krokowy znajdują się dwie istotne z chirurgicznego punktu widzenia struktury. Przy powierzchni dolnej i dolno-bocznej biegną sploty żyłne Santoriniego łączące się z układem żył grzbietowych prącia. Na powierzchniach tylnobocznych przebiegają skośnie parzyste pęczki naczyniowo-nerwowe.

Stercz i pęcherzyki nasienne pełnią funkcję wydzielniczą warunkując prawidłowy skład, pH i właściwości biochemiczne nasienia. Gruczoł krokowy wytwarza 0,5ml objętości ejakulatu, natomiast pęcherzyki nasienne od 1,5-2ml. Prostata produkuje między innymi: PSA (Prostate Specific Antigen), kwaśną fosfatazę, specyficzne białko sterczowe PSP-94, aminopeptydazę leucytową, 15-lipooksygenazę, kwas cytrynowy, cynk.

Unaczynienie tętnicze stercza pochodzi głównie od tętnic pęcherzowych dolnych oraz w mniejszej części od tętnicy odbytniczej dolnej. Krew żylna ze splotu sterczowego odpływa do splotów żylnych pęcherzowych i odbytniczych oraz bezpośrednio do żyły sromowej wewnętrznej i żyły biodrowej wewnętrznej. Unerwienie stanowi splot sterczowy, który otrzymuje włókna nerwowe ze splotu podbrzusznego dolnego.

Histologicznie tkanka prostaty jest złożona z dwóch głównych komponentów komórkowych:

Nabłonka, do którego zaliczamy:

- Komórki podstawne
- Komórki przejściowe
- Komórki luminalne (wydzielnicze)
- Komórki neuroendokrynne

Podścieliska (zrębu), które stanowią:

- Komórki tkanki łącznej
- Komórki mięśni gładkich
- Fibroblasty

Nabłonek gruczołowy zorganizowany jest w około 30-50 rozgałęzionych gruczołów cewkowo-pęcherzykowych, których przewody wyprowadzające uchodzą do cewki moczowej. W świetle gruczołów, zwłaszcza u starszych osób, można znaleźć zwapnienia i konkrementy będące zmineralizowanymi skupiskami wydzieliny. Odcinki gruczołowe otacza zrąb złożony z gęstej plecionki włókien kolagenowych sprężystych i licznych komórek mięśni gładkich. Między nimi leżą rzadziej rozmieszczone fibroblasty.

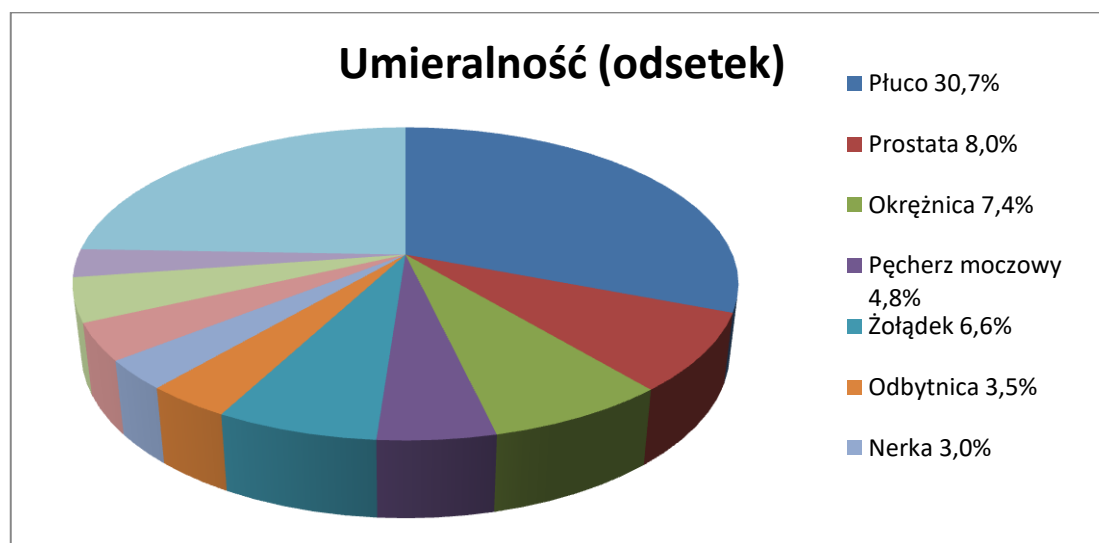
1.2. Rak gruczołu krokowego

1.2.1. Epidemiologia

Według danych Centrum Onkologii Instytutu Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie w 2012 roku rak stercza zajmował drugie miejsce pod względem zapadalności na nowotwory złośliwe i umieralności z ich przyczyny w Polsce. Pierwsze miejsce zajmuje rak płuca.

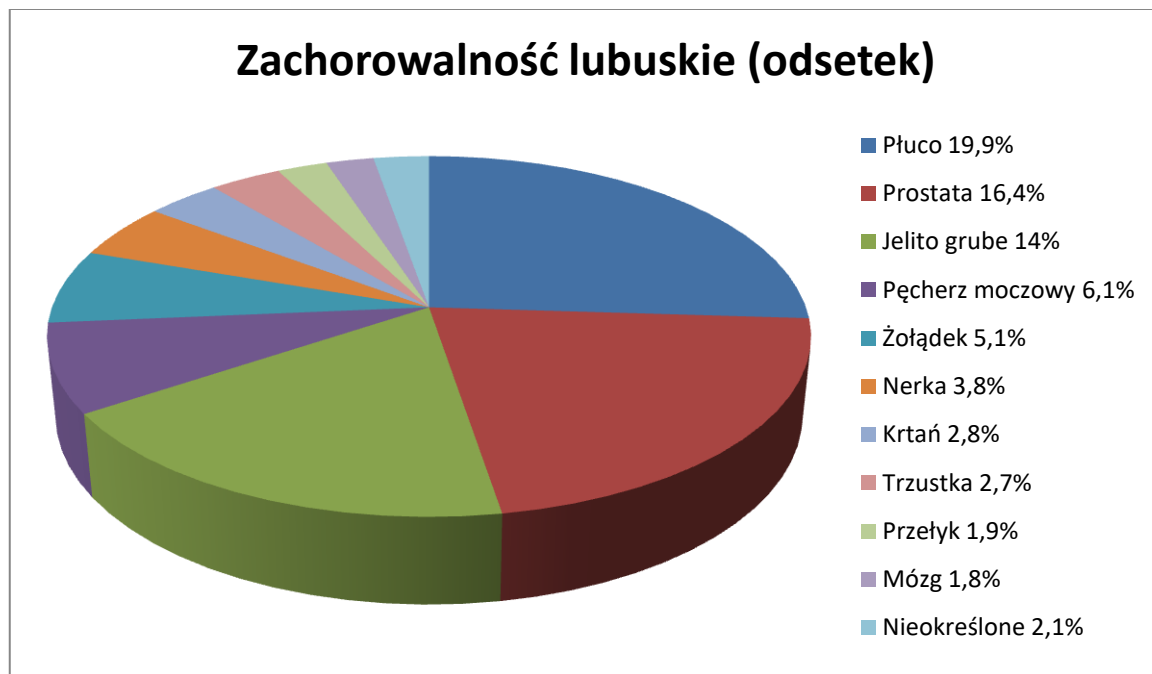


Wykres 1. Zachorowalność na poszczególne rodzaje nowotworów w Polsce w 2012r.¹



Wykres 2. Umieralność na poszczególne rodzaje nowotworów w Polsce w 2012r.¹

Pod względem współczynnika surowego liczby zgonów z powodu raka prostaty według danych WHO (World Health Organization) z 2012 roku Polska zajmuje 26 miejsce na świecie. Natomiast biorąc pod uwagę współczynnik standaryzowany do wieku uplasowaliśmy się na 23 miejscu w populacji światowej².



Wykres 3. Zachorowalność na poszczególne rodzaje nowotworów w województwie lubuskim w 2012r.¹

W 2012 roku stwierdzono 327 przypadków raka prostaty w województwie lubuskim, przy liczbie ludności 1 023 000 osób. Mniej rozpoznań postawiono jedynie w trzech województwach:

- Warmińsko-mazurskim 324 przypadki
- Podlaskim 316 przypadków
- Opolskim 277 przypadków

Jednak przeliczając liczbę diagnoz na ilość osób zamieszkujących powyższe tereny, da się zauważyć w obrębie województwa lubuskiego znacząco wyższy odsetek rozpoznań nowotworu prostaty na 100 000 mieszkańców, niż w innych województwach, za wyjątkiem pomorskiego. Może to wynikać z dwóch powodów: niedociągnięć w skutecznej diagnostyce Ca Prostate lub korzystniejszych warunków środowiskowych (mniej zanieczyszczeń) na innych obszarach. Biorąc pod uwagę dużą liczbę rozpoznań raka stercza w województwie Lubuskim, szpital w Zielonej Górze jako największy na tym terenie był najwłaściwszym miejscem do przeprowadzenia badań będących przedmiotem tej rozprawy doktorskiej. Pod względem umieralności z powodu raka prostaty województwo lubuskie znajduje się w środku

tabeli. Wskazuje to na konieczność podjęcia działań poprawiających wyniki leczenia raka stercza na tym obszarze.

Tabela 1. Lista kolejności województw według wielkości standaryzowanych współczynników zachorowalności na nowotwory złośliwe gruczołu krokowego w Polsce w 2012 roku.¹

Gruczoł krokowy		
1.	Pomorskie	54,5
2.	Lubuskie	44,3
3.	Małopolskie	42,7
4.	Podkarpackie	41,4
5.	Świętokrzyskie	39,3
6.	Śląskie	38,5
7.	Lubelskie	37,9
8.	Wielkopolskie	37,4
9.	Kujawsko-pomorskie	36,5
10.	Opolskie	34,0
11.	Podlaskie	33,5
12.	Dolnośląskie	31,7
13.	Zachodniopomorskie	31,2
14.	Warmińsko-mazurskie	31,2
15.	Mazowieckie	29,9
16.	Łódzkie	22,2
Polska 36,1		

Tabela 2. Lista kolejności województw według wielkości standaryzowanych współczynników umieralności na nowotwory złośliwe gruczołu krokowego w Polsce w 2012 roku.¹

Gruczoł krokowy		
1.	Podlaskie	16,3
2.	Pomorskie	14,5
3.	Zachodniopomorskie	14,0
4.	Kujawsko-pomorskie	13,3
5.	Wielkopolskie	12,8
6.	Śląskie	12,8
7.	Lubuskie	12,6
8.	Łódzkie	12,2
9.	Warmińsko-mazurskie	12,0
10.	Małopolskie	11,9
11.	Dolnośląskie	11,8
12.	Świętokrzyskie	11,7
13.	Mazowieckie	11,6
14.	Lubelskie	11,3
15.	Podkarpackie	11,2
16.	Opolskie	10,7
Polska 12,4		

1.2.2. Czynniki ryzyka

Najważniejszymi czynnikami ryzyka raka prostaty są wiek, czynniki dziedziczne, rasa i czynniki środowiskowe. Rak gruczołu krokowego jest chorobą dotykającą głównie ludzi starszych. Zmiany dysplastyczne nabłonka gruczołu krokowego nasilają się wraz z wiekiem, łącznie z nimi rośnie ryzyko karcynogenezy. Szczyt występowania raka stercza wypada po szóstej dekadzie życia. Spośród wymienionych czynników ryzyka wiek ma największe znaczenie.



Wykres 4. Liczba zachorowań na raka prostaty w zależności od wieku w Polsce w 2012r.¹

1.2.3. Patomorfologia

Karcynogeneza w prostatie rozpoczyna się najczęściej od dysplazji komórek nabłonka. Stanami uważanymi za przedrakowe oraz współistniejące z rakiem prostaty są: śródnabłonkowe nowotworzenie (PIN- Prostatic Intraepithelial Neoplasia) i atypowy rozrost drobnozrazikowy (ASAP- Atypical Small Acinar Proliferation).

W zależności od ciężkości zmian dysplastycznych nabłonka wyróżniamy obecnie 2 formy PIN: low grade PIN- mały stopień dysplazji oraz high grade PIN- duży stopień dysplazji. Stary podział obejmował istnienie 3 form, od najłżejszej do najcięższej: PIN I, PIN II, PIN III. Jako że high grade PIN ma duży związek z wystąpieniem raka, stanowi on wskazanie do wykonania powtórnej biopsji stercza. Jeżeli w pierwszej biopsji stwierdzimy występowanie high grade PIN w wielu rdzeniach, mamy 20-30% ryzyko stwierdzenia nowotworu w następnym badaniu. Podobnie jeśli w bezpośrednim sąsiedztwie High Grade PIN znajdziemy atypowe cewy gruczołowe ryzyko to wynosi 50%. ASAP, atypowy rozrost

drobnorzazikowy, to rzadka zmiana złożona z ognisk małych atypowych gruczołów przypominających utkanie raka stercza, ale nie spełniających wszystkich jego kryteriów. ASAP stwierdzony w poprzedniej biopsji niesie ze sobą 40% ryzyko raka w biopsji kolejnej i stanowi wskazanie do jej wykonania. Najczęściej występującym typem nowotworu jest Gruczolakorak Prostaty (Adenocarcinoma Prostatæ) z podtypami. Obejmuje on około 95% rozpoznań. Choć rzadsze, w gruczole krokowym występują także inne histologiczne typy nowotworów, wymienione w poniższej tabeli.

Tabela 3. Histologiczne typy nowotworów prostaty.

RAKI:	NOWOTWORY NEUROENDOKRYNNE:
Gruczolakorak konwencjonalny: - groniasty 95% (adenocarcinoma acinosum, microacinosum) - zanikowy (atrophicum), - rzekomorozrostowy (pseudohyperplasticum), - piankowatokomórkowy (foamy cell), - koloidalny (colloid), - śluzowokomórkowy (mucocellulare), - onkocytarny (oncocyticum), - „lymphoepithelioma-like”	Rakowiak (carcinoid)
	Raki neuroendokrynne (carcinoma neuroendocrinale)
	Przyzwojak (paraganglioma)
	NOWOTWORY PODŚCIELISKOWE:
	Guz podścieliskowy o niepewnym potencjale złośliwości (STUMP)
	Mięsak podścieliskowy (sarcoma stromale)
Rak z komponentem wrzecionowatokomórkowym (carcinosarcoma, carcinoma sarcomatosum)	NOWOTWORY MEZENCHYMALNE
Gruczolakorak przewodowy (adenocarcinoma ductale)	NOWOTWORY Z TKANKI LIMFATYCZNEJ I KRWIOTWÓRCZEJ
Nowotwory urotelialne: rak urotelialny (carcinoma urotheliale)	NOWOTWORY PRZERZUTOWE
Rak płaskonabłonkowy (carcinoma planoepitheliale)	
Guzy z komórek podstawnych (basal cell adenoma, carcinoma)	

1.2.4. Patofizjologia, objawy i przebieg naturalny

Koncepcję strefowej budowy stercza opisał po raz pierwszy Mc Neal w 1968 roku. Ma ona wyraźny wpływ na charakter zmian patologicznych występujących w gruczole krokowym. Według niego wyróżniamy cztery strefy stercza o różnych cechach morfologicznych i czynnościowych, narażone na różne procesy patologiczne. Budowę gruczołową wykazują strefa przejściowa, obwodowa i centralna. Przegroda (część przednia)

składa się wyłącznie z włóknisto-mięśniowego zrębu. Strefa przejściowa zawierająca 5 % tkanki gruczołowej jest najczęściej punktem rozwoju łagodnego przerostu gruczołu krokowego u mężczyzn w podeszłym wieku. Wywodzi się z niej jedynie 5-10% nowotworów prostaty. W strefie centralnej, zawierającej 25% tkanki gruczołowej, znajduje swój początek 20% raków prostaty. Najwięcej, bo aż 70-75% nowotworów stercza, ma ognisko pierwotne w zawierającej 70% tkanki gruczołowej strefie obwodowej.

Ponieważ większość zmian nowotworowych rozpoczyna się w strefie obwodowej prostaty, w początkowej fazie nie dają one żadnych sygnałów lub dają objawy nietypowe, kojarzone najczęściej z BPH. Należą do nich LUTS (Lower Urinary Tract Symptoms), krwimocz, hematospermia, ból okolicy krocza. Grupę objawów prezentowaną w literaturze pod nazwą LUTS możemy podzielić na: objawy z napełniania (częstomocz, parcia naglące, nykturia), objawy mikcyjne (trudności w rozpoczęciu mikcji, mikcje przy użyciu wysiłku, wąski lub przerywany strumień moczu) oraz objawy pomikcyjne (wykapywanie po mikcji, mikcje podwójne).

Rak stercza w swoim naturalnym przebiegu charakteryzuje się powolnym rozwojem. Czas od rozwinięcia się w prostacie stanów przedrakowych do pojawienia się objawowego raka to często kilkanaście lat. Sam średni czas podwojenia ogniska pierwotnego CaP (Carcinoma Prostatae) to około 4 lata. Wcześnie rozpoznany rak stercza jest ograniczony do narządu, z biegiem czasu rozrasta się naciekowo w kierunku torebki stercza i innych tkanek i narządów leżących w okolicy gruczołu krokowego. Z punktu widzenia możliwości terapeutycznych istotny jest podział na chorobę ograniczoną do narządu (nowotwór nie nacieka torebki stercza), chorobę miejscowo zaawansowaną (z naciekiem na torebkę stercza lub pęcherzyki nasienne, bez przerzutów) i chorobę uogólnioną (z przerzutami do węzłów chłonnych lub narządów odległych). Szerzenie się nowotworu w kierunku szyi pęcherza, a następnie nacieki na trójkąt pęcherza i ujścia moczowodów, doprowadza do utrudnienia odpływu moczu z nerek i obustronnego wodonercza. Stan ten powoduje rozwój przewlekłej niewydolności nerek ze wszystkimi jej objawami takimi jak:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| - nadciśnienie tętnicze | - obrzęki |
| - niewydolność serca | - mocznicowe zapalenie osierdzia |
| - nudności i wymioty | - brak apetytu |
| - zaburzenia mineralizacji kości | - hiperfosfatemia |
| - niedobór witaminy D | - niedokrwistość |
| - kwasica metaboliczna | - skaza krwotoczna |
| - drętwienia i parestezje kończyn | - zaburzenia koncentracji, pamięci i snu |

W przebiegu zaawansowanego raka stercza pojawiają się przerzuty. Początkowo, zgodnie ze spływem chłonki z obszaru gruczołu krokowego, obserwujemy je w węzłach chłonnych biodrowych zewnętrznych, wewnętrznych i wspólnych. Utrudniają one spływ chłonki z kończyn dolnych prowadząc do masywnych obrzęków. Dalszy rozwój choroby owocuje pojawieniem się przerzutów w kościach oraz narządach odległych (płuca, wątroba, otrzewna, nadnercza). Na tym etapie choroby mogą pojawić się bóle kostne oraz złamania patologiczne. Te ostatnie są szczególnie niebezpieczne w obrębie kręgosłupa. W przypadku złamań patologicznych kręgów może dojść do zespołu kompresji rdzenia kręgowego z trwałym niedowładem kończyn dolnych oraz nietrzymaniem/zatrzymaniem moczu i stolca, w zależności od poziomu uszkodzenia. Zaawansowany rak stercza daje też objawy charakterystyczne dla całej grupy chorób nowotworowych, takie jak utrata masy ciała i niedokrwistość.

1.2.5. Diagnostyka i rozpoznanie

1.2.5.1. Wielomiejscowa biopsja stercza

Rozpoznanie raka prostaty ustala się na podstawie wielomiejscowej, rdzeniowej biopsji stercza wykonywanej pod kontrolą TRUS (Trans Rectal Ultrasound). Pierwsza przekroczeniowa biopsja stercza została wykonana przez Fergusona w 1930 roku. Pionierami przezodbytniczych biopsji wykonywanych pod kontrolą TRUS w 1982 roku byli Holm i Gammelgaard. Badanie wykonujemy igłą tru-cut o średnicy 18G.

W przypadku stwierdzenia patologicznych ognisk w sterczu, budzących podejrzenie raka prostaty w TRUS lub DRE (Digital Rectal Examination), należy pobrać oddzielne fragmenty tkankowe z tych miejsc w trakcie biopsji. Następnie uzupełnić ją o kolejne wycinki pobrane obustronnie ze strefy obwodowej. Przyjmuje się, że pierwsza biopsja prostaty mającej objętość 30-40ml powinna zaowocować otrzymaniem 8-10 wycinków, z obszaru stercza położonego jak najbardziej obwodowo. Większe rozmiary gruczołu krokowego zmuszają do pobrania 10-12 rdzeni, przy czym pobieranie ich większej ilości nie ma wpływu na jakość badania. Przy przetrwałym podejrzeniu raka prostaty, po pierwszym negatywnym wyniku histopatologicznym, należy pobrać >20 wycinków z obu płatów. Jest to tzw. biopsja saturacyjna. Pozwala ona na uzyskanie rozpoznania raka w dodatkowych 30-43% przypadków. Kolejne pobrania wycinków powinny się odbywać pod kontrolą multiparametrycznego rezonansu magnetycznego z podejrzanymi ogniskami ujawnionymi w tym badaniu. Można wykonać to jednocześnie lub mając widoczne na monitorze przekroje

z położeniem ogniska we wcześniej wykonanym badaniu mpNMR (Multiparametric Nuclear Magnetic Resonance).

W wyjątkowych przypadkach możemy przeprowadzić biopsję formalną tru-cut pod kontrolą palpacji lub biopsję aspiracyjną. Można je wykonać gdy obserwujemy ewidentne kliniczne cechy raka prostaty, a potrzebujemy jedynie potwierdzenia histopatologicznego lub cytologicznego obecności nowotworu. Należy pamiętać, że te badania nie dostarczą nam wielu informacji, które zapewnia klasyczna biopsja rdzeniowa pod kontrolą TRUS.

1.2.5.2. Wskazania do biopsji

Wskazaniami do wykonania biopsji stercza są:

- Nieprawidłowy poziom PSA i jego pochodnych: PSA, PSA f/t (Prostate Specific Antigen Free to Total Ratio), PSAV (Prostate Specific Antigen Velocity), PSAD (Prostate Specific Antigen Density), PHI (Prostate Health Index), 4K score (Four Kallikrein Score)
- Nieprawidłowy wynik badania palcem przez odbytnicę (DRE+)
- ASAP w poprzedniej biopsji (40% ryzyka raka)
- High Grade PIN w wielu rdzeniach z poprzedniej biopsji (20-30% ryzyka raka)
- Atypowe cewy gruczołowe przylegające bezpośrednio do High Grade PIN w poprzedniej biopsji (około 50% ryzyka raka)
- Rak wewnątrzprzewodowy jako pojedyncze znalezisko w poprzednim badaniu (>90% ryzyka współwystępowania raka prostaty high-grade)
- Nieprawidłowości stwierdzone w badaniu MRI (Magnetic Resonance Imaging) stercza
- Ryzyko rodzinne (jeżeli krewny w pierwszej linii ma raka prostaty ryzyko jest podwojone, jeżeli choruje trzech lub więcej krewnych ryzyko rośnie 5-11 krotnie).

1.2.5.3. Ocena stopnia złośliwości w skali Gleasona.

Czynnikiem wywierającym wpływ na decyzje terapeutyczne jest stopień złośliwości nowotworu stercza. Podaje się go w skali określanej od nazwiska jej twórcy, amerykańskiego patologa Donalda Gleasona. Klasyfikacja ta stosowana jest nieprzerwanie od kiedy WHO (World Health Organization) i ACS (American Cancer Society) zatwierdziły ją w 1978 roku.



Dr Donald Gleason (1920-2008)

Istnieje 5 podstawowych stopni złośliwości w skali Gleasona, od 1 najmniej złośliwego do 5 najbardziej złośliwego. Głównymi kryteriami różnicowania stopni są ułożenie komórek, utrata utkania gruczołowego i ich cechy nowotworowe:

1. Pojedyncze, blisko upakowane ale oddzielone od siebie gruczoły. Jednolite owalne lub okrągłe, średniej wielkości o wyraźnym brzegu.
2. Pojedyncze, bardziej luźno rozmieszczone gruczoły. Mniej jednolite podłużne, poprzeczne, o nieregularnym brzegu.
3. Odrębne skupienia gruczołów mniejszych niż w poprzednich wzorcach, z dużymi różnicami w wielkości i kształcie, pomiędzy nienowotworową tkanką stercza. Występują małe sitowate struktury nowotworowe.
4. Łączące się małe gruczoły, bez wyraźnej struktury, bez światła w ich obrębie. Duże struktury i gruczoły sitowate z niewyraźnymi granicami, rozlane.
5. Nie ma struktury gruczołów. Lite pola i sznury komórek. Komórki raka z martwicą centralną w otoczeniu struktur sitowatych, litych lub brodawkowatych.



Rycina 1. Podstawowe wzory stopni złośliwości w skali Gleasona.

Punktowa ocena w zmodyfikowanej skali Gleasona składa się z sumy dwóch znalezionych w preparacie stopni. Najbardziej rozległego plus kolejnego pod względem rozległości o niższym stopniu. Jeśli w preparacie występują więcej niż dwa stopnie suma składa się z najbardziej rozległego stopnia plus najwyższego występującego po nim (niezależnie od zajmowanego przezeń obszaru, nawet jeśli zajmuje mniej niż 5% badanej tkanki). Obecnie uważa się, że podawanie w rozpoznaniu histopatologicznym stopnia Gleasona 4 lub mniej jest niewłaściwe. Jeśli w preparacie występuje tylko jeden stopień skali, podaje się go podwójnie.

1.2.5.4. Przyporządkowanie do poszczególnych grup ryzyka

Pierwszym kryterium mającym decydujący wpływ na wybór postępowania terapeutycznego w przypadku raka prostaty jest jego stopień zaawansowania klinicznego. Określa się go na podstawie badań PSA, DRE, TRUS, biopsji, limfadenektomii oraz badań obrazowych NMR (Nuclear Magnetic Resonance), CT (Computed Tomography) i scyntygrafii. Każde z tych badań wykonane samodzielnie nie może być wyłączną podstawą oceny zaawansowania klinicznego. Dopiero łączne zastosowanie tych metod umożliwia przewidzenie skali TNM (Tumor Nodulus Metastases) nowo wykrytego nowotworu stercza, przyporządkowanie danego przypadku do określonej grupy ryzyka i wybór stosownego leczenia.

Tabela 4. Grupy ryzyka wznowy biochemicznej EAU (European Association of Urology), zlokalizowanego i lokalnie zaawansowanego raka prostaty

	Niskiego ryzyka (low-risk)	Pośredniego ryzyka (intermediate-risk)	Wysokiego ryzyka (high-risk)	
Kryteria	PSA < 10 ng/mL oraz Gl. Score < 7 oraz cT1-2a	PSA 10-20 ng/mL lub Gl. Score 7 lub cT2b	PSA > 20 ng/mL lub Gl. Score > 7 lub cT2c	każde PSA każdy Gl. Score cT3-4 lub cN+
	Zlokalizowany			Lokalnie zaawansowany

1.2.6. Markery i ich rola w diagnostyce i monitorowaniu raka prostaty

Mianem markerów nowotworowych określa się substancje, których obecność albo zwiększone stężenie w organizmie wiąże się z rozwojem nowotworu. Są to zarówno substancje nieobecne u zdrowych ludzi, jak i związki występujące w prawidłowych warunkach, ale w znacznie mniejszych stężeniach lub tylko na pewnym etapie rozwoju człowieka (np. w życiu płodowym). Poniżej opisane markery nowotworu prostaty zasługują według mnie na szczególną uwagę. Są wśród nich zarówno substancje nowo odkryte i przebadane, jak i stosowane w diagnostyce i leczeniu raka stercza od lat.

1.2.6.1. PSA

Swoisty antygen sterczowy PSA został odkryty w trakcie poszukiwań proteiny specyficznej dla nasienia do celów kryminalistycznych. Pierwszy raz został wykryty w nasieniu i nazwany gamma-seminoproteiną w 1971 roku, przez Hare³. Osiem lat później

Wang wyizolowała go z tkanki stercza⁴. Ostatecznie w 1980 roku Kuriyama zidentyfikował PSA w surowicy mężczyzny⁵. Jest on glikoproteiną zbudowaną z jednego łańcucha 237 aminokwasów z licznymi wiązaniami dwusiarczkowymi oraz czterech wodorowęglanowych łańcuchów bocznych. PSA jest proteazą serynową o ciężarze 34 kDa. Jego gen (ludzka kalikreina 3, hKLK3) jest członkiem rodziny kalikrein tkankowych, które znajdują się na chromosomie 19. Prekursorem PSA jest Pre-Pro-PSA, łańcuch 261 aminokwasów, z którego 17-aminokwasowy region Pre jest odłączany w siateczce śródplazmatycznej komórek nabłonkowych prostaty. Następnie kolejne 7 aminokwasów regionu Pro jest odcinane przez ludzką kalikreinę 2, co pozostawia właściwą, aktywną formę PSA. Głównym zadaniem enzymu jest upłynnienie nasienia, poprzez trawienie wysokocząsteczkowych białek (seminożeliny I i II). Czas półtrwania swoistego antygenu sterczowego w surowicy wynosi 2,2-3,2 dni. Tam PSA w 95% występuje w formie związanej. Pomimo tego, że PSA jest organospecyficzne dla stercza, znikome ilości tego antygenu możemy znaleźć także w: śliniankach, gruczołach okołoodbytniczych, gruczołach okołocewkowych, komórkach adenocarcinoma pęcherza moczowego, kobiecych gruczołach piersiowych i niektórych postaciach raka nerkowokomórkowego u kobiet. Ilości te są pozbawione znaczenia klinicznego.

PSA jest parametrem ciągłym tzn. im wyższa jest jego wartość tym większe ryzyko stwierdzenia raka prostaty u chorego. Trudno w takim przypadku zdefiniować jednoznaczną wartość odcięcia, przy której należy wykonać biopsję gruczołu krokowego. Umownie, na potrzeby praktyki klinicznej, przyjęto wartość 4ng/ml, która daje powyżej 26,9% ryzyka raka oraz powyżej 6,7% szans na nowotwór pośredniego lub wysokiego ryzyka (Gl. Score ≥ 7). Następną tabelą ilustruje powyższe szanse w zależności od innych poziomów PSA.

Tabela 5. Ryzyko raka prostaty i szanse stwierdzenia nowotworu pośredniego i wysokiego ryzyka (Gl. Score ≥ 7) w zależności od poziomu PSA w surowicy.⁶

PSA (ng/ml)	Ryzyko raka prostaty (%)	Ryzyko raka o Gl. Score ≥ 7 (%)
0.0-0.5	6.6	0.8
0.6-1.0	10.1	1.0
1.1-2.0	17.0	2.0
2.1-3.0	23.9	4.6
3.1-4.0	26.9	6.7

1.2.6.2. fPSA/tPSA

Bardzo użytecznym klinicznie odkryciem była prezentacja różnych form PSA w surowicy krwi: PSA wolnego (fPSA) i związanego z inhibitorami proteazy α 1-antychymotrypsyną (PSA-ACT) i α 2-makroglobuliną (PSA-AMG). Tylko fPSA oraz PSA-ACT mają aktywność immunologiczną i mogą być oznaczane przy pomocy metod immunologicznych w surowicy. Wobec tego test oznaczający PSA całkowite podaje nam ilościowo sumę frakcji fPSA oraz PSA-ACT. W teście oznaczającym wolne PSA wynikiem jest ilość fPSA w surowicy. Stosunek fPSA/tPSA jest szeroko stosowany w praktyce klinicznej w celu uniknięcia niepotrzebnych biopsji. Stosujemy go u pacjentów ze stale podniesionym stężeniem PSA (4-10 ng/ml.), po pierwszej ujemnej biopsji, z prawidłowym wynikiem badania palcem przez odbytnicę (DRE). Udowodniono, że w takich przypadkach raka prostaty stwierdza się u 56% mężczyzn ze stosunkiem fPSA/tPSA < 10%, ale tylko 8% ma nowotwór jeżeli stosunek fPSA/tPSA > 25%. Wartości fPSA/tPSA pomiędzy 10-25% są niejednoznaczne i noszą nazwę nowej "szarej strefy".^{7,8}

Niezwiązane, wolne PSA w surowicy krwi (fPSA) można podzielić na dwie podgrupy:

- „nietkniętego” (iPSA- Intact PSA): Formy o pojedynczym łańcuchu, nieaktywne, z obecnymi lub obciętymi pozostałościami krótkiego peptydu aktywującego na końcach łańcucha.

- Formy nieaktywne z powodu wcięć obecnych wewnątrz łańcucha np.:

- a) Nicked PSA: nieaktywne PSA nacięte w miejscu Lys145-Lys146 łańcucha

- b) BPSA: nieaktywne PSA nacięte w miejscach lys145–146 i lys182–183 łańcucha.⁹

Nowo odkryte formy fPSA znalazły zastosowanie w projektach wielu nowych biomarkerów raka prostaty, takich jak PHI, 4Kscore, BPSA, Intact PSA.^{10,11}

1.2.6.3. PSAV

W celu wzbogacenia informacji, które można uzyskać na podstawie oznaczenia PSA stosuje się między innymi dwie metody zwiększające użyteczność kliniczną tego badania. Są to PSAV (Velocity = Prędkość), czyli naturalne tempo przyrostu PSA oraz PSADT (Doubling Time = Czas Podwojenia) tzn. okres w którym PSA podwaja swój poziom. PSAV > 0,75-0,80 ng/ml/rok lub jego wzrost > 20% wartości wyjściowej/rok daje silne wskazówki umożliwiające różnicowanie łagodnego przerostu prostaty w kierunku potencjalnej obecności nowotworu gruczołu krokowego. PSADT używamy głównie w trakcie obserwacji po zakończonym leczeniu i w ocenie jego wyników. Badanie to ma ograniczoną

wartość w wykrywaniu raka stercza. Obecnie PSAV i PSADT używamy w następujących sytuacjach:

1. PSADT może służyć do różnicowania wznowy miejscowej z odległą w przypadku wznowy biochemicznej po leczeniu radykalnym. Po prostatectomii radykalnej średnia wartość PSADT 4.3 miesiąca lub wysokie PSAV są związane z odległymi przerzutami, natomiast średnia wartość PSADT 11.7 miesiąca lub niskie PSAV nasuwa podejrzenie nieradykalności w miejscu operowanym.^{12,13} Po RTG-terapii na wznowę odległą wskazuje średnia wartość PSADT wynosząca 3 miesiące, a miejscowe niepowodzenie można podejrzewać przy średniej wartości PSADT około 13 miesięcy.¹⁴
2. Jako że wartość diagnostyczna CT jamy brzusznej i miednicy oraz scyntygrafii kości w wykrywaniu przerzutów w momencie stwierdzenia wznowy biochemicznej jest niska, badania te powinny być wykonywane dopiero gdy $PSA > 10\text{ng/ml}$, $PSADT < 6$ miesięcy, $PSAV > 0.5\text{ ng/ml/miesiąc}$ lub są objawy przerzutów kostnych.¹⁵
3. Czulość PET-CT (Pozyton Emission Tomography Computed Tomography) jest większa w diagnostyce wznowy biochemicznej jeśli $PSAV > 2\text{ng/ml/rok}$, $PSADT < 3$ miesięcy, $PSA > 5\text{ng/ml}$.¹⁶
4. U pacjentów ze wznową biochemiczną po radykalnej prostatectomii ratunkowa radioterapia jest skuteczna u pacjentów z krótkim PSADT. Ratunkową RTG-terapię można odroczyć w tym przypadku jeśli Gleason score < 7 i $PSADT > 12$ miesięcy.¹⁷
5. Sprzeczne wyniki badań i brak randomizowanych prospektywnych prób nie pozwalają na rutynowe włączenie adjuwantowej hormonoterapii w przypadku wznowy biochemicznej. Stosując podejście indywidualne wczesna hormonoterapia może opóźnić wystąpienie przerzutów u pacjentów wysokiego ryzyka Gleason score > 7 lub $PSADT < 12$ miesięcy. Niestety nie ma ona wpływu na zmniejszenie śmiertelności specyficznej dla nowotworu.¹⁸

Wprowadzenie PSAV i PSADT jako rutynowych parametrów mających na celu poprawę wykrywalności nowych przypadków raka prostaty, wymagałoby udowodnienia, że są one lepsze niż dotychczas stosowane (PSA). Niestety do tej pory nie udało się tego udowodnić. Wiele prac wskazuje, że AUC (pole pod krzywą na wykresie swoistość-czulość) jest większe dla samego PSA, niż dla PSAV.¹⁹ Co pokazuje, że pojedyncze oznaczenie PSA jest jednak lepszym testem diagnostycznym.

1.2.6.4. PSAD

Rozmiar prostaty ma wpływ na stężenie PSA w surowicy. Im większa masa gruczołu tym więcej PSA odnajdujemy we krwi, niezależnie od tego czy swoisty antygen sterczowy jest produkowany przez zdrowe komórki nabłonkowe, czy komórki raka prostaty. Stamey i współpracownicy wykazali, że 1 cm³ tkanki stercza pochodzący z łagodnego przerostu gruczołu krokowego powoduje wzrost stężenia PSA w surowicy o 0,30 ng/ml. Natomiast 1 cm³ tkanki raka prostaty podnosi poziom PSA w surowicy o 3,5 ng/ml.²⁰ Co ciekawe komórki nowotworowe produkują o wiele mniej PSA niż komórki nabłonka gruczołowego prostaty. Jednak powodowane przez nie niszczenie błon podstawnych gruczołów sterczowych powoduje większą przenikalność PSA do krwi.²¹ Udowodniono, że w przypadku BPH z czułością 65-70% i 70% specyficznością, można wykryć prostaty o objętości >40 ml na podstawie samego stężenia PSA co obrazuje poniższa tabela.²²

Tabela 6. Wartości PSA dla stercza o objętości > 40 ml w zależności od wieku.

Wiek	PSA dla prostaty > 40 ml
50-59 lat	>1.6 ng/ml
60-69 lat	>2.0 ng/ml
70-79 lat	>2.3 ng/ml

PSAD (Density=Gęstość), czyli iloraz PSA całkowitego i objętości stercza jest pomocną kalkulacją w diagnostyce różnicowej BPH/CaP. Wykazano, że wartości PSAD >0.18 ng/ml pozwalają przewidzieć występowanie raka stercza z 73% czułością i 59% specyficznością, szczególnie przy poziomach PSA całkowitego 4-10 ng/ml. Podobną kalkulacją jest gęstość PSA w odniesieniu do strefy przejściowej stercza PSA-TZ (Transition Zone=Strefa przejściowa). Stosowanie wartości odcięcia >0.37 ng/ml umożliwia wykrycie raka prostaty przy 75% czułości i 73% specyficzności.²³ Niestety obie kalkulacje są zależne od objętości stercza lub jego strefy przejściowej, co obliczane przy użyciu TRUS, bywa obarczone dużą dozą subiektywizmu badającego.

1.2.6.5. APSA (Age Prostate Specific Antigen)

Objętość stercza rośnie wraz z wiekiem, przez to zwiększa się ilość komórek produkujących PSA i rośnie jego stężenie w surowicy krwi. Tym samym poziom PSA, który uważalibyśmy za podwyższony u 50-lątka może być normą w wieku 70 lat.²⁴ Pojęcie APSA

(wartości referencyjnej PSA należnej dla wieku) zwiększyło swoistość i czułość tego markera. Wprowadził je Oesterling.

PSA swoiste dla wieku według Osterlinga.²⁵

40-49 lat	PSA	0-2,5 ng/ml
50-59 lat	PSA	0-3,5 ng/ml
60-69 lat	PSA	0-4,5 ng/ml
70-79 lat	PSA	0-6,5 ng/ml

1.2.6.6. Leptyna

Leptyna (z gr. leptos - szczupły) została opisana pierwszy raz w 1994 roku. Jest hormonem peptydowym o ciężarze 16 kDa, zbudowanym ze 146 aminokwasów.²⁶ U ludzi gen leptyny- ob znajduje się na chromosomie 7q31.3. Zawiaduje ona przyjmowaniem pokarmu, homeostazą energetyczną w organizmie, metabolizmem i funkcjami neuroendokrynnymi. W prawidłowych komórkach nabłonka prostaty oraz w komórkach nowotworowych wykazano obecność receptora leptyny.²⁷ Stwierdzono go także w liniach komórek stercza DU145 i PC-3. Dotychczasowe prace o roli leptyny w prostacie sugerują, że może ona odpowiadać za regulację proliferacji komórek. W tym obszarze Somasundar i wsp. wykazał pobudzający mitozę wpływ leptyny na komórki nowotworu stercza linii androgeno-opornych DU145 i PC-3.²⁸ Natomiast kolejna praca Onuma i wsp. pokazała, że o ile leptyna ma mitogenny wpływ na komórki androgeno-oporne, to nie oddziałuje w ten sam sposób na komórki androgeno-zależne (np. linii LNCaP-FCG).²⁹ Może to nasuwać związek z powstawaniem opornego na kastrację raka prostaty. W roku 2004 Frankenberry i wsp. badali ludzkie linie komórkowe DU145 i PC-3. Dowiedli, że leptyna stymuluje podziały tych komórek, ich migrację i zwiększa w nich wydzielanie czynników wzrostu.³⁰

Kolejnym punktem uchwytu mogłaby być otyłość mająca bezpośredni związek ze zwiększonym stężeniem leptyny w organizmie. Ponieważ leptyna wydzielana jest niemal wyłącznie przez adipocyty białej tkanki tłuszczowej, koreluje ona z jej masą.³¹ Pomimo, że związek BMI (Body Mass Index) z ryzykiem wystąpienia raka prostaty nie jest do końca udowodniony, liczne badania wskazują, iż otyłość zwiększa ryzyko raka prostaty^{32,33} i powoduje częstsze zgony z jego przyczyny.³⁴ Saglam i wsp. sugerują, że leptyna może w dwojaki sposób odgrywać rolę w rozwoju raka prostaty. Po pierwsze poprzez zmiany w sekrecji testosteronu, po drugie poprzez wpływ na czynniki prowadzące do otyłości.³⁵

Niestety jak wykazał W. Malendowicz w swojej pracy doktorskiej z 2007 roku u chorych z rakiem stercza zakwalifikowanych do radykalnej prostatektomii oraz u chorych z BPH zakwalifikowanych do zabiegu TUR-P (Trans Urethral Resection-Prostate) stężenia leptyny we krwi nie różnią się od poziomów obserwowanych w grupie kontrolnej. Jedynie w przypadku pacjentów z zaawansowanym rakiem stercza poddanych hormonoterapii stężenie leptyny we krwi było statystycznie znacznie niższe. Także wyniki badań pacjentów grupy kontrolnej, z rakiem stercza i z łagodnym przerostem prostaty, nie wykazują związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy stężeniami PSA i leptyny we krwi wszystkich badanych osób.³⁶ Uniemożliwia to wykazanie związku stężenia leptyny z obecnością raka prostaty i dyskwalifikuje ją jako kandydata na markera w przypadkach tego nowotworu.

1.2.6.7. PCA3

Odkryty przez Dr Marion Bussemakers'a, Dr Jacka Schalken'a i Dr Wiliama Isaacs'a gen PCA3 jest nowym biomarkerem wykrywanym w osadzie moczu po trzech seriach masażu prostaty. Jest to specyficzne dla prostaty nie-kodujące mRNA. Ekspresja genu DDR kodującego PCA3 jest charakterystyczna wyłącznie dla komórek stercza, natomiast w raku prostaty udowodniono w 1999r. silną nadekspresję tego genu.³⁷ Jego poziom skonfrontowany z PSA mRNA daje wartość nazwaną PCA3 score. Wynik badania podawany jest jako stosunek mRNA PCA3 do mRNA PSA pomnożony przez 1000. Za wartość odcięcia przyjmuje się 35. Jeśli PCA3 score jest poniżej tej wartości rozpoznanie raka w kolejnej biopsji jest mało prawdopodobne. Parametr ten jest lepszy w rozpoznawaniu raka prostaty niż PSA i stosunek fPSA/tPSA. Charakteryzuje się bardzo wysoką swoistością (na poziomie 76%) i dość wysoką czułością (na poziomie 82%), a jego wartość predykcyjna dodatnia (PPV- Positive Predictive Value) wynosi 67%.³⁸ Podobne wyniki otrzymywano przy okazji badań komercyjnych testów służących oznaczaniu PCA3 w moczu.³⁹ Niestety wartość PCA3 rośnie wraz z rozmiarem prostaty i jego przydatność w monitorowaniu rozpoznanego już raka nie została potwierdzona. Niejasna jest też korelacja tego markera ze stadiem pT nowotworu. Część badań potwierdza tę zależność,^{40,41} gdy inne takiego związku nie wykazują.^{42,43}

Wykazano natomiast zależność stanu genu PCA3 z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. Węzły z obecnością tkanki nowotworowej prezentowały zwiększoną aktywność genu PCA3.⁴⁴ Wydawać by się mogło, że PCA3 ze względu na swoje rozliczne zalety z łatwością zastąpi PSA w codziennej diagnostyce raka prostaty. Jednak bardzo wysoki koszt oznaczenia (np. od 291 € do 400 € w Berlińskich laboratoriach, 1000 zł w Polskich laboratoriach) całkowicie ogranicza jego powszechne zastosowanie w praktyce.⁴⁵

1.2.6.8. TMPRSS2-ERG

Kandydatów na markera raka stercza poszukiwano nie tylko wśród łatwo oznaczalnych w tkankach i płynach ustrojowych związkach biochemicznych, ale także w typowych dla raka prostaty zmianach genomu. Wśród nich najlepiej przebadaną i najbardziej obiecującą jest fuzja genowa białka TMPRSS2 z protoonkogenem ERG1. Na trop tej charakterystycznej dla nowotworu stercza zmiany genetycznej naprowadziło uczonych badanie opublikowane w maju 2005 roku w czasopiśmie *Oncogene*. Odkryto w nim, że związany z rodziną czynników transkrypcyjnych ETS (erythroblast transformation specific) gen ERG1 był protoonkogenem raka prostaty wykazującym najczęstszą nadekspresję w tej chorobie. Autorzy wykazali zwiększoną ilość ERG mRNA w 62% przypadków raka prostaty obecną dystalnie od regionu zajmowanego przez białko TMPRSS2.⁴⁶ Białko TMPRSS2 należy do rodziny przezbłonowych proteaz serynowych typu II, mapuje się na region chromosomu (21q22.3) i jest regulowane przez androgeny.⁴⁷ Jest ono obecne w typowych ilościach w normalnych komórkach prostaty. Tymczasem w raku wykazuje nadekspresję i zawiera w obrębie promotora elementy odpowiedzialne za odpowiedź na androgeny.⁴⁸ Nowe fakty na temat tych dwóch związków w raku stercza połączyły dwie prace Tomlinsa i wsp. Opisały one nowo odkryte fuzje genowe 5'-nietranslacyjnego regionu TMPRSS2 (21q22.3) z rodziną czynników transkrypcyjnych ETS. Zarówno z jej przedstawicielami ERG (21q22.2) i ETV1 (7p21.2)⁴⁹, jak i ETV4(17q21) ETV5 (3q27).^{50,51} Połączenie z dwoma ostatnimi związkami zdarza się rzadko, w około 2-3% przypadków. Uważa się, że wyżej wymienione integracje genomu leżą u podstaw nadekspresji czynników transkrypcyjnych ETS w raku prostaty. Kolejne badania potwierdziły obecność fuzji genowej TMPRSS2:ERG w 40-80% przypadków raka prostaty.^{52,53} Szybko zauważono potrzebę stworzenia nieinwazyjnego testu do wykrywania tej zmiany chromosomowej u ludzi, celem zastosowania go jako markera w diagnostyce raka prostaty.⁵⁴

Jako że fuzja genowa TMPRSS2:ERG może być z łatwością wykrywana w moczu, podobnie jak powyżej opisywany PCA3, naturalne wydaje się łączenie obu markerów. Udowodniono, że włączenie ich do klinicznej praktyki może zredukować liczbę niepotrzebnych biopsji.⁵⁵ W badaniu tym naświetlono również podstawową przewagę fuzji genowej nad nadekspresją genu DDR. Włączenie do oznaczeń TMPRSS2:ERG pozwalało skuteczniej przewidzieć skalę Gleasona i stadium pT⁵⁶ raka prostaty, podczas gdy PCA3 nie prezentowało takich właściwości. Ograniczeniem w rutynowym stosowaniu oznaczenia TMPRSS2:ERG w diagnostyce raka gruczołu krokowego jest sprzeczność wyników badań. Implikacje prognostyczne tej fuzji genowej w nowotworze prostaty pozostają nadal niejasne.

Część prac pokazuje, że istnieje dodatnia korelacja między obecnością tej zmiany w genomie, a gorszą prognozą raka prostaty.^{57,58} Jednocześnie wielu autorów udowodniło brak jakiegokolwiek związku⁵⁹ lub wręcz odwrotnie wskazywali na obecność fuzji genowej TMPRSS2:ERG jako czynnika rokowniczo korzystnego.⁶⁰ Nie stwierdzono również większego stężenia komórek TMPRSS2:ERG dodatnich w obrębie przerzutów raka stercza.⁶¹ Zatem oznaczenie tej zmiany genowej nie pozwala przewidzieć obecności rozsiewu nowotworu do innych narządów. Negatywnie na skuteczność diagnostyczną testu wpływa też fakt stwierdzenia, w niektórych badaniach, korelacji stężenia mRNA TMPRSS2:ERG z wiekiem i objętością gruczołu krokowego (BPH).⁶²

Jednak samo odkrycie fuzji genowej elementu regulowanego hormonalnie (białko TMPRSS2) z rodziną onkogenów ERG-ETS stawia ciekawe pytania wymagające dalszych badań. Czy normalnie niezależne od androgenów onkogeny, po fuzji z elementem androgenozależnym, mogą być regulowane androgenowo? Czy ma to wpływ na rozwój opornego na kastrację raka prostaty?

1.2.6.9. PHI

Jak wiadomo PSA powstaje z prekursorów takich jak Pre-Pro-PSA, a w organizmie stwierdzono także występowanie wielu izoform swoistego antygeny sterczowego (np. iPSA, BPSA). Wśród nich występuje Pro-PSA składające się z 244 aminokwasów oraz jego najbardziej stabilna forma p2PSA. Dowiedziono, że p2PSA ma związek z rakiem gruczołu krokowego.⁶³ To odkrycie umożliwiło wyprowadzenie wzoru na Prostate Health Index (PHI) i stosowanie go jako nowego markera w diagnostyce raka prostaty.

$$PHI = (p2PSA/fPSA) \times \sqrt{tPSA}$$

Stosowanie tego markera może ograniczyć odsetek wykonywanych niepotrzebnie biopsji oraz zwiększyć specyficzność wykrywania zaawansowanego raka (Gleason score ≥ 7 , $\geq pT3$). Jest on skuteczniejszy od wcześniej stosowanych tPSA i fPSA.⁶⁴ W 2011 roku udowodniono, że przy wartościach PSA 2-10 ng/ml oznaczenie PHI pozwala uniknąć wielu niepotrzebnych, powtórnych biopsji stercza. Wartości PHI przy czułości na poziomie 90% korelowały z nowotworem prostaty i ze skalą jego złośliwości w następujący sposób:^{65,66}

- PHI ≥ 55 wskazywało na 52% szans rozpoznania raka w kolejnej biopsji, oraz 42% szans na nowotwór ≥ 7 w skali Gleasona
- PHI < 25 wskazywało na 11% szans rozpoznania raka w kolejnej biopsji, oraz 26% szans na nowotwór ≥ 7 w skali Gleasona
- Wiek oraz rasa nie miały wpływu na wartości PHI w sposób istotny statystycznie.

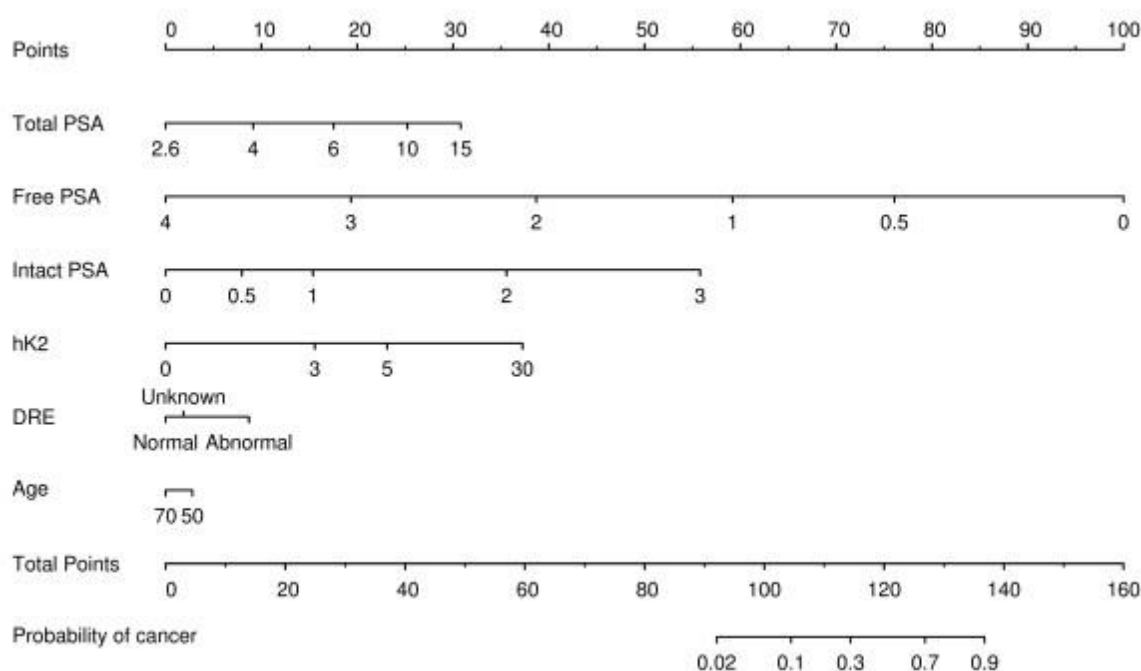
W 2014 roku udowodniono na grupie 267 chorych, że przewlekłe zapalenie prostaty i łagodny przerost prostaty nie podwyższają wartości PHI. Pokazało to, że dwa najczęstsze patologiczne stany w obrębie gruczołu krokowego nie powodują wyników fałszywie dodatnich w diagnostyce raka stercza przy pomocy PHI, w odróżnieniu od PSA.⁶⁷ PHI wraz z PSA korelowały ze stopniem złośliwości raka (skalą Gleasona), podczas gdy PCA3 i TMPRSS2-ERG nie mają jasno udowodnionego z nim związku. W ten sposób PHI może zredukować także liczbę biopsji wykrywających nieistotnego klinicznie raka prostaty (niskiego stopnia złośliwości).⁶⁸ Marker ten, jako skorelowany z ryzykiem nacieku nowotworu na torebkę stercza, może pomóc w określeniu stadium T2/T3 choroby, a co za tym idzie ułatwić decyzję o leczeniu radykalnym.⁶⁹ Rezultaty najnowszego, wieloośrodkowego, europejskiego badania (PROMethuS project), poza potwierdzeniem wcześniejszych wniosków, wykazały także, że %p2PSA and PHI są dokładniejsze niż tPSA, fPSA and %fPSA w przewidywaniu PCa u mężczyzn z dodatnim wywiadem rodzinnym raka prostaty⁷⁰ oraz u młodych mężczyzn <60 roku życia.⁷¹ Niewątpliwą zaletą jest również koszt oznaczenia, który według danych z 2015 roku wynosi około 80 USD.

1.2.6.10. 4Kscore

Jeżeli pojedyncze parametry są niewystarczające do diagnostyki i monitoringu nowotworu, może cały panel badań połączony odpowiednim algorytmem będzie skuteczniejszy? Ta myśl na pewno przyświecała uczonym w trakcie prób nad tzw. 4Kscore-biomarkerem oznaczanym z surowicy, składającym się z pomiaru czterech różnych wywodzących się z prostaty kalikrein: całkowitego PSA (tPSA), wolnego PSA(fPSA), „nietkniętego” PSA (Intact PSA) i ludzkiej kalikreiny 2 (hKLK2). Poziomy tych związków połączone przy pomocy specjalnego, klinicznie zwalidowanego algorytmu z następującymi informacjami: wiekiem chorego, statusem DRE (+/-) oraz historią wcześniejszych ujemnych biopsji (wykonana/nie wykonana) dają wynik biomarkera 4Kscore. Pozwala on określić prawdopodobieństwo znalezienia raka prostaty Gleason score ≥ 7 w kolejnej biopsji. Wartość tPSA i fPSA w diagnostyce raka gruczołu krokowego była znana już wcześniej. Dodanie do nich oznaczeń Intact PSA i hKLK2 celem podniesienia skuteczności screeningu, zwłaszcza poprzez ograniczenie nadrozpoznavania nowotworów nieistotnych klinicznie, sugerowały kolejne badania.^{72,73}

Badania nad wykorzystaniem panelu wszystkich czterech kalikrein sterczowych były prowadzone w wielu krajach europy. Jedne z pierwszych prac przedstawiały dane kohorty mężczyzn z Göteborg (Szwecja), uzyskanych w badaniu ERSPC (European Randomized

study of Screening for Prostate Cancer). Wykazano tam, że panel czterech kalikrein sterczowych jest lepszy, niż łączne stosowanie tPSA, DRE i wieku chorego w przewidywaniu obecności agresywnego raka prostaty (Gleason score ≥ 7) w kolejnej biopsji. Wyniki te dotyczyły zarówno populacji poddanej jak i nie poddanej wcześniejszemu skriningowi. Pobieranie wycinków ze stercza, wyłącznie przy wartości odcięcia 4KScore powyżej 20%, pozwoliło na redukcję niepotrzebnych biopsji o 30-40%.^{74,75} Rezultaty tych badań przekładają się na populację mężczyzn z PSA <10 ng/ml, będącym w tzw. „Szarej strefie”.



Wykres 5. Normogram zaproponowany w celu określenia ryzyka stwierdzenia raka prostaty w biopsji, przy pomocy panelu czterech kalikrein sterczowych oraz wieku i DRE pacjenta. Göteborg (Szwecja).

Źródło: Piśmiennictwo nr 74.

Kohorta mężczyzn z badania ERSPC pochodząca z Rotterdamu potwierdziła powyższe wyniki oraz ekstrapolowała hipotezę o wyższości 4KScore nad tPSA, DRE i wiekiem chorego, na grupę pacjentów poddanych już wcześniejszej biopsji stercza. Panel czterech kalikrein sterczowych pozwalał z większą dokładnością przewidzieć wynik kolejnej biopsji stercza.⁷⁶

Ostatnia metaanaliza, przeprowadzona w 2014 roku przez Voigt’a i wsp., uświadamia, że panel czterech kalikrein został dość dokładnie przebadany w aspekcie diagnostyki raka prostaty. Oceniano go u ponad 8500 pacjentów. Poprawia on w sposób istotny dokładność diagnostyczną o około 8-10% oraz pozwala uniknąć od 48-56% niepotrzebnie wykonanych

biopsji.⁷⁷ Podobne wnioski płyną z wieloośrodkowego badania przeprowadzonego w Stanach Zjednoczonych. Stosując w nim 4KScore, jako marker agresywnego raka prostaty, udało się ograniczyć ilość nieistotnych pobrań wycinków ze stercza o 30-58%, przy przeoczeniu raka Gleason score ≥ 7 jedynie u 1,3-4,7% pacjentów.⁷⁸

Panel czterech kalikrein sterczowych może mieć także wpływ na decyzje terapeutyczne odnośnie rozpoznanego już raka prostaty. Dodanie 4Kscore do podstawowego modelu oceny zaawansowania nowotworu prostaty (wiek, staging, PSA, Gleason score oraz dane o liczbie i powierzchni rdzeni biopsyjnych zajętych przez raka) pozwala dokładniej przewidzieć agresywną histopatologię CaP (naciekanie pozatorebkowe T2/T3, objętość guza $> 5\text{cm}^3$, Gleason score ≥ 7).⁷⁹

Test 4Kscore jest również w stanie przewidzieć ryzyko wystąpienia przerzutów odległych na przestrzeni 20 lat. Jeżeli procentowa szansa na stwierdzenie raka prostaty Gleason score ≥ 7 według panelu kalikrein wynosi $>7,5\%$, u mężczyzny z PSA= $3,0\text{ng/ml}$ w wieku 60 lat, to ma on duże szanse na rozwój przerzutów. Ryzyko rośnie proporcjonalnie wraz z wiekiem, wynosząc około 5% w ciągu 10 lat i około 10% w ciągu 15 lat.⁸⁰

Niestety ten doskonale sprawdzony marker nadal nie ma akceptacji FDA (Food and Drug Administration) w Stanach Zjednoczonych. Jego olbrzymią wadą jest też bardzo wysoki koszt oznaczenia. Wynosił on około 395 USD w 2015 roku. Jeden rodzimy ośrodek znajdujący się w okolicach Warszawy oferuje badanie tego markera za zaporową jak na polskie realia cenę 1600 PLN.

1.2.7. Niedoskonałości dotychczasowo stosowanych markerów

Na chwilę obecną PSA pozostaje najlepiej przebadanym i co za tym idzie najczęściej stosowanym markerem w diagnostyce i leczeniu raka prostaty. Należy jednak zdawać sobie sprawę z jego ograniczeń i niedoskonałości. Swoisty antygen sterczowy nie umożliwia odróżnienia nowotworu prostaty od innych łagodnych chorób gruczołu krokowego, tylko wskazuje jaka jest szansa na obecność procesu neoplazmatycznego w sterczu. PSA jest podwyższone w stanach zapalnych układu moczowego (zapaleniu pęcherza moczowego, zapaleniu cewki moczowej, ostrym i przewlekłym zapaleniu stercza).^{81,82} Z wiekiem obserwujemy fizjologiczny wzrost stężenia swoistego antygeny sterczowego w surowicy, podobnie dzieje się w przypadku łagodnego przerostu prostaty.⁸³ PSA może również podlegać zmienności biologicznej, np. po ejakulacji, manipulacjach na samym gruczole krokowym czy w przypadku różnic w poziomie androgenów w surowicy.⁸⁴ Kolejną wadą PSA jest fakt istnienia znaczącego odsetka nowotworów prostaty rozpoznawanych bez podwyższenia tego

markera.⁸⁵ Wszystkie te cechy sprawiają, że zarówno czułość jak i swoistość swoistego antygenu sterczowego jest niezadawalająca. Według danych pochodzących z różnych ośrodków czułość diagnostyczna wyników oznaczeń PSA u chorych na raka stercza kształtuje się w granicach 75-90%. Niska jest także swoistość markera będąca na poziomie 20-60%.

Tabela 7. Czułość i swoistość PSA w diagnostyce raka prostaty według różnych autorów

Autor	Czułość	Swoistość
Cooner, 1990 ⁸⁶	80%	61%
Collette, 1993	75%	52%
Roth, 1998 ⁸⁷	90%	17%
Brawer, 1998 ⁸⁸	95%	22%

Do tej pory nie udało się znaleźć idealnej substancji mogącej konkurować z PSA w obrębie diagnostyki i monitorowania leczenia raka prostaty. Poniższa tabela podsumowuje najbardziej przydatne cechy oczekiwane od związku mającego znaleźć zastosowanie podczas prowadzenia chorych z nowotworem stercza. Jak widać żaden z ostatnio zaproponowanych markerów nie posiada wszystkich wymienionych korzystnych właściwości.

Tabela 8. Podsumowanie wymienionych wyżej związków, korzystne oraz niepożądane korelacje i cechy poszczególnych markerów.

	Korelacja za Skalą Gleasona	Pomoc w określeniu zaawansowania miejscowego (T2/T3)	Stwierdzenie szans na obecność przerzutów	Redukcja niepotrzebnych biopsji (przy oznaczeniu razem z PSA)	Pozwala odróżnić CaP/BPH	Ma akceptowalny koszt
PSA	+	+	+	Nie dotyczy	-	+
Leptyna	-	-	+	-	-	+
PCA3	-/+	-	+	+	-	-
TMPRSS-ERG	-/+	+	-	+	-	-
PHI	+	+	Nie badano	+	+	+
4KScore	+	+	+(w ciągu 20 lat)	+	+	-

W 2012 roku grupa U.S. Preventive Services Task Force nie udzieliła rekomendacji dla skринingu masowego (populacyjnego) raka prostaty, którego podstawą było oznaczenie PSA.⁸⁹ Argumentami przeciwko takiemu postępowaniu były niekorzystny stosunek zysku do ryzyka oraz brak redukcji śmiertelności u osób poddanych regularnym badaniom. Oświadczenie to, pomimo tego, że było oparte na niewłaściwej interpretacji badania PLCO (Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial),⁹⁰ odbiło się na świecie szerokim echem. Zwrócono uwagę, że wprowadzenie obowiązkowych, regularnych oznaczeń markera tak niedoskonałego jak PSA może nie przynieść korzyści dla jakości i długości życia populacji, a jedynie zwiększyć koszty opieki zdrowotnej. Nadrozpoznanie nieistotnego klinicznie raka prostaty jest częściowo związane z dość niską specyficznością i wartością predykcijną dodatnią dotychczasowo stosowanego skринingu przy pomocy PSA. Obecnie potrzebujemy testów zwiększających szanse na wczesne wykrycie klinicznie istotnego, agresywnego raka prostaty (Gleason ≥ 7), redukujących liczbę biopsji rozpoznających nowotwór nisko złośliwy (Gleason ≤ 6), o powolnym nie mającym wpływu na przeżycie przebiegu. Średnio przy pomocy skринingu PSA wykrywa się od 23-44% nowotworów prostaty, które nigdy nie dają klinicznych objawów.⁹¹ Istnieje kilka dróg poprawy obecnej sytuacji. Po pierwsze można zwiększyć wskazania i poprawić protokoły bacznej obserwacji (AS) już wykrytych przypadków raka niskiego ryzyka. Pozwoli to wyekstrahować spośród nich jedynie te przypadki, których leczenie przyniesie rzeczywistą korzyść dla chorego. Wadami tego postępowania będą: zwiększenie częstości oznaczeń PSA (koszt, ryzyko wyników fałszywie dodatnich, obciążenie laboratoriów), intensyfikacja badań rektalnych (duża częstotliwość wizyt, dyskomfort pacjenta, subiektywizm badania), zwiększenie ilości regularnie wykonywanych biopsji stercza (niepokój pacjenta, ból, powikłania procedury).⁹²

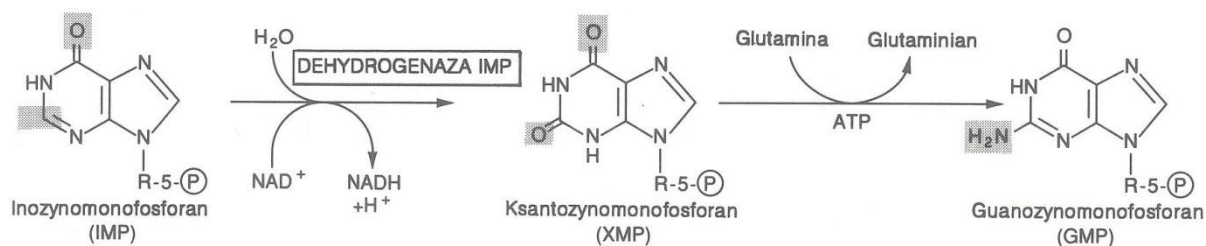
Drugą, w mojej ocenie lepszą drogą, jest wprowadzenie do powszechnego stosowania doskonalszego markera nowotworu prostaty lub wyodrębnienie całego panelu połączonych algorytmem badań. Pozwoli to na wykrycie i skierowanie do dalszego leczenia jedynie tych przypadków, które osiągną rzeczywiste korzyści z wdrożonych terapii (poprawę długości i jakości życia). Postępowanie takie przyniesie również redukcję niepotrzebnie wykonywanych biopsji, zmniejszając liczbę powikłań związanych z tą procedurą. Poprawi jakość życia populacji, zmniejszając niepokój i stres związany z nieprawidłowymi wynikami dotychczas stosowanych badań, które wcale nie muszą oznaczać choroby mającej wpływ na życie i dobrostan pacjentów.

Ponieważ, wszystkie dotychczas stosowane markery raka prostaty mają swoje ograniczenia i niedoskonałości, potrzebujemy nowego związku, który skuteczniej pozwoli

nam rozpoznać i leczyć to schorzenie. Fakt ten zachęcił mnie do rozpoczęcia poszukiwań i przeprowadzenia badań nad nowym związkiem, który mógłby spełnić wyżej wymienione oczekiwania. Substancją przebadaną przeze mnie pod kątem przydatności w diagnostyce i terapii nowotworu prostaty w tej pracy doktorskiej jest Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II (IMPDH 2).

1.2.8. Czym jest Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II (IMPDH 2)?

(IMPDH, E.C.1.1.1.205) Ludzka Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II (IMPDH2) jest enzymem biorącym udział w biosyntezie nukleotydów purynowych, potrzebnych min. do syntezy łańcuchów DNA i RNA. Katalizuje ona przemianę Inozynomonofosforanu (IMP) w Ksantozynomonofosforan (XMP), który jest substratem do wytworzenia Guanozynomonofosforanu (GMP). Reakcja ta zależna jest od koenzymu nukleotydów: dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD- Nicotinamide Adenine Dinucleotide) katalizującego reakcje redoks w przypadku dehydrogenaz. IMPDH2 oraz NAD spełniają rolę regulatorów biosyntezy puryn. Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II ogranicza rozmiar puli GMP na zasadzie mechanizmu sprzężenia zwrotnego ujemnego.^{93,94}



Przekształcenie IMP w GMP.

Rycina 2. Przekształcenie IMP w GMP.

Źródło: Piśmiennictwo nr 93.

Wiedzę na temat roli Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej w rozwoju nowotworów znacząco poszerzono gdy w 1990 roku Natsumeda i wsp. odkryli, że enzym ten występuje w dwóch izoformach. Odmiany nazwano typ I i typ II (IMPDH1, IMPDH2).⁹⁵ Pod względem budowy obie formy są tożsame w 84% i mają taki sam rozmiar. Najważniejszą różnicą jest to, że IMPDH1 wykazuje ekspresję zarówno w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych.⁹⁶ IMPDH2 natomiast, występuje w większych ilościach w liniach komórek nowotworowych i w komórkach białaczek (u pacjentów z białaczką przewlekłą granulocytarną, limfatyczną i ostrą białaczką szpikową).⁹⁷ Powyższe fakty spowodowały, że

to właśnie izoforma II Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej (IMPDH2) jest przedmiotem tego badania.

Dowodzono, że zaburzenie metabolizmu nukleotydów wpływa znacząco na przeżycie komórek. Zmieniony metabolizm enzymu IMPDH2 i jego koenzymu NAD obserwowano w wielu nowotworach. Część analogów NAD miało działanie antywirusowe i hamujące rozwój guza.^{98,99} Liczne prace wskazywały na związek Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II ze wzrostem komórek¹⁰⁰ i ich różnicowaniem.^{101,102} Wykazano również, że w określonych typach guzów litych oraz szeregach niektórych komórek nowotworowych stwierdza się zwiększoną ekspresję genu IMPDH2. Dotyczyło to guzów mózgu, mięsaków, a także linii białaczek B- i T- komórkowych.^{103,104} Najnowsza praca ukazująca korelację Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II z procesami neoplazmatycznymi pochodzi z 2015 roku. Pokazano w niej, przy pomocy immunohistochemii, że tkanki raka nerki oraz raka pęcherza moczowego mają zwiększone stężenie IMPDH2 w stosunku do zdrowych próbek pochodzących z tych narządów.¹⁰⁵

1.2.9. Związek IMPDH 2 z rakiem prostaty.

W 2004 roku wykazano, że inhibitory Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II prowadzą do zatrzymania replikacji androgenowo niezależnych komórek PC-3 raka prostaty. Badano hamujący podziały komórek PC-3 wpływ Kwasu Mykofenolowego, Tiazofuryny i Ribawiryny (związki hamujące działanie IMPDH2). Wszystkie substancje zatrzymały proliferację komórek nowotworowych oraz ukierunkowały ich różnicowanie w linię komórkową posiadającą właściwości podobne do dojrzałych komórek sekrecyjnych prostaty.¹⁰⁶

W kolejnym badaniu z 2006 roku dowiedziono, że Kwas Mykofenolowy ma podobny wpływ również na linię komórek androgenowo niezależnych DU 145 raka stercza. Dodatkowo stwierdzono tu, że terapia Mykofenolanem wyindukowała śmierć 15-20% komórek badanej linii.¹⁰⁷

W 2009 roku grupa badaczy ze Stanów Zjednoczonych sprawdziła przy pomocy metody mikromacierzy zestaw ponad 20,000 genów stwierdzając nadekspresję 4 z nich w komórkach raka prostaty wysokiego stopnia złośliwości (Grade 3 i Grade 4). Genom tkanki nowotworowej stercza porównywano z genomem zdrowego gruczołu krokowego, oraz z genomem tkanki BPH. Jednym ze zidentyfikowanych genów wykazujących znaczną nadekspresję w komórkach raka prostaty była Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II.¹⁰⁸

Najsilniejszą wskazówką do upatrywania w IMPDH2 enzymu pozwalającego rozpoznać, a następnie ocenić przebieg leczenia raka prostaty pozostaje praca Chińskich uczonych z Uniwersytetu Medycznego w Guangzhou. Odnaleźli oni, przy pomocy metody mikromacierzy, 1027 genów różniących się wyraźnie w komórkach raka prostaty i prawidłowych komórkach stercza. Dodatkowo przy pomocy dwu-wymiarowej fluorescencyjnej żelowej elektroforezy stwierdzili w proteomie tkanki nowotworowej prostaty i przyległej zdrowej tkanki stercza 155 różnic. Pomiędzy owymi różnicami znalazło się 60 produktów białkowych. Łącząc obie metody, wśród białek poddanych elektroforezie oraz produktów genowych wykrytych za pomocą mikromacierzy, wybrano 14 potencjalnych kandydatów na markery nowotworu stercza. Następnie skorelowano poziomy tych związków w surowicy krwi przy pomocy testu ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), odnajdując 3, które korespondowały z wynikami elektroforezy. Jednym z nich okazała się Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II.¹⁰⁹

Kolejna praca chińskich uczonych wykazała, że materiał raka prostaty wykazuje zwiększoną ilość mRNA, kodującego Dehydrogenazę Inozynomonofosforanową II oraz zwiększoną ekspresję samego enzymu IMPDH2, w porównaniu ze zdrową tkanką stercza. Próbkę badano wykorzystując reakcję qRT-PCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction) dla mRNA i badania immunohistochemiczne oraz Western Blot dla poziomów jego produktu. Zauważono również, że ilość samej Dehydrogenazy koreluje ze stadium klinicznym nowotworu, obecnością przerzutów i skalą Gleasona.¹¹⁰

Wszystkie te przesłanki skłaniają do dokładniejszego zbadania związku stężenia IMPDH2 w surowicy krwi z obecnością i przebiegiem raka prostaty w organizmie chorego. Niniejsza praca ma na celu ocenę przydatności Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II jako markera głównego lub pomocniczego w wykrywaniu nowotworów stercza. Enzym ten, mając niewątpliwy udział w proliferacji oraz różnicowaniu komórek nowotworowych, mógłby także być wykorzystany w monitorowaniu przebiegu terapii, określeniu etapu remisji, bądź momentu wznowy choroby.

2. Cel pracy

Choroby prostaty są jednymi z najczęstszych schorzeń występujących u mężczyzn. Spośród nich najgroźniejszą, niosącą ze sobą duże ryzyko zgonu, jest rak gruczołu krokowego. Pomimo wielu lat badań sprawia on nadal wiele trudności w profilaktyce, rozpoznaniu i wyborze odpowiedniego leczenia. Mając na uwadze powyższe rozważania postawiono następujące cele pracy:

1. Ocena przydatności IMPDH2 jako nowego biomarkera w diagnostyce i monitorowaniu raka prostaty, na podstawie oznaczenia poziomów stężeń w surowicy krwi
2. Oznaczenie poziomów IMPDH2 w chwili rozpoznania raka stercza i 6 miesięcy po wdrożeniu leczenia
3. Określenie korelacji stężenia IMPDH2 do stopnia złośliwości raka, poziomu PSA, objętości prostaty, BMI, wieku, DRE.
4. Ocena zależności poziomu IMPDH2 od najczęściej występujących chorób podstawowych (cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, chorób serca itp.).
5. Wpływ przewlekłego stosowania najpopularniejszych używek (alkoholu oraz palenia tytoniu) na stężenie IMPDH2.

3. Materiał i metody

Badaniu, w pierwszej fazie, poddano chorych z rozpoznany rakiem stercza na oddziale Urologii Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze w latach 2013-2014. Na podstawie obowiązujących wytycznych EAU pacjenci zostali zakwalifikowani do następujących form leczenia i kontroli:

- prostatectomia radykalna
- prostatectomia radykalna z hormonoterapią adjuwantową
- RTG-terapia
- RTG-terapia z hormonoterapią adjuwantową
- hormonoterapia w monoterapii
- aktywny nadzór (AS)
- baczna obserwacja (WW)

Następnie spośród tych chorych wyłączono, z drugiej fazy badania, pacjentów z rozpoznany rakiem prostaty którzy:

- zostali poddani:
 - aktywnemu nadzorowi
 - prostatectomii radykalnej z adjuwantową RTG-terapią
 - prostatectomii radykalnej z hormonoterapią adjuwantową
- nie otrzymali żadnej formy leczenia lub kontroli
- nie zgłosili się na wizytę kontrolną po 6-ciu miesiącach od wdrożenia leczenia
- nie wyrazili zgody na udział w badaniu

Pacjentów którzy zostali poddani bacznej obserwacji (WW), włączono tylko do pierwszej fazy badania. W tej podgrupie niemożliwe było przeprowadzenie drugiej fazy badania (oznaczenie stężenia IMPDH2 po 6-ciu miesiącach od wdrożenia leczenia), ponieważ nie otrzymali oni żadnej formy terapii.

3.1. Charakterystyka grupy badanej.

Do badania trafili mężczyźni z rozpoznany przy pomocy biopsji prostaty rakiem stercza. Do pobrania bioptatów kwalifikowano chorych na podstawie wymienionych we wstępie kryteriów EAU. Każdy z nich otrzymywał krótki opis celu i formy prowadzonego doświadczenia z formularzem świadomej zgody na udział w nim do podpisania: „Formularz zgody pacjenta- grupa badana” (Sup-1). Pacjenci byli również informowani, że mogą wycofać udzieloną zgodę, na każdym etapie testu. W dalszej kolejności z chorymi przeprowadzano

wywiad lekarski pytając ich szczególnie o wiek, choroby współistniejące, wcześniejsze zabiegi urologiczne, liczbę biopsji, nałogi (palenie tytoniu i alkohol). Następnie w trakcie badania fizykalnego mierzono wagę i wzrost obliczając BMI na podstawie tych parametrów, przy pomocy wzoru:

$$\text{BMI} = \text{masa ciała (kg)} / \text{wzrost (m)}^2$$

Powyższe informacje wraz z datą przeprowadzenia badania trafiały do uprzednio przygotowanej ankiety zatytułowanej: „Arkusz oceny pacjenta do biopsji gruczołu krokowego” (Sup-2).

Następnie chorym pobierano krew do badań laboratoryjnych. Próbkówki trafiały natychmiast do Centralnego Laboratorium SP ZOZ Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze celem oznaczenia wyjściowego poziomu IMPDH2 (przed leczeniem). Poziomy IMPDH2 w surowicy oznaczano metodą ELISA przy pomocy testu Cusabio® Human Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2) Elisa Kit. Zestaw pozwalał na oznaczenie substancji w surowicy, osoczu, kulturach komórkowych i homogenatach tkankowych z czułością do 5.8 pg/ml.

Ponieważ pacjenci trafiający na oddział posiadali ze sobą wyniki PSA wykonane w różnych laboratoriach na terenie województwa lubuskiego, pobierano im również krew celem oznaczenia PSA w Centralnym Laboratorium SP ZOZ Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze. Miało to na celu zwiększenie dokładności badania poprzez ujednolicenie oznaczeń, wykonywanych w ciągu 2 lat przez to samo certyfikowane laboratorium.

Na kolejnym etapie wykonywano biopsję stercza. Wycinki pobierano pod kontrolą TRUS przy pomocy aparatu 2101 Falcon firmy B-K Medical. Używano transrektalnej głowicy dwupłaszczyznowej pozwalającej na jednoczesowe obrazowanie stercza w przekroju czołowym i strzałkowym w trakcie badania. Pozwalało to na bardzo dokładne zmapowanie strefy obwodowej gruczołu krokowego ze szczególnym uwzględnieniem miejsc ultrasonograficznie „podejrzanych” o obecność ogniska Ca Prostatae. Pobierano minimum po 5 bioptatów z każdego płata prostaty. Badanie rozszerzano o wycinki pobrane pod kontrolą palpacji z miejsc nieprawidłowych wyczuwalnych w trakcie oceny palcem przez odbytnicę (DRE). U niewielkiej części pacjentów z ewidentnie klinicznie stwierdzanym nowotworem stercza (3-cyfrowy wynik badania PSA, wyczuwalnie cały obszar prostaty zmieniony w DRE) wykonywano jedynie biopsję formalną. Polegała ona na pobraniu jedynie 4 bioptatów z powierzchni stercza bez różnicowania stron gruczołu. Wycinki trafiały do kasetek uprzednio przygotowanych przez Zakład Patomorfologii SP ZOZ Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze z oznaczeniem stron prostaty (z wyjątkiem biopsji formalnej). Układ materiału

w kasetkach pozwalał także na określenie końców rdzenia (bliższy przy wierzchołku stercza lub dalszy przypęcherzowo). Biopsaty pobierano przy pomocy igły TrueCut Promag™ 2.2, Bard® Biopty® 18G x 200mm.



Rycina 3. Aparat 2101 Falcon firmy B-K Medical z transrektalną głowicą dwupłaszczyznową używany do badań.

Biopsję stercza wykonywano w standardowej osłonie antybiotykowej zgodnie z zaleceniem EAU. Pacjenta układano w pozycji na boku z kolanami podciągniętymi do brzucha. Na początku wykonywano badanie DRE poszukując wyczuwalnych zmian patologicznych w obrębie gruczołu. Następnie po przygotowaniu odbytnicy środkiem poślizgowym i znieczuleniu przy pomocy Lignocainy wykonywano badanie TRUS. Oceniano obecność echogennych nieprawidłowości w obrębie stercza i pęcherzyków nasiennych. W trakcie ultrasonografii przezodbytnicznej wyliczano objętość stercza przy pomocy 3 pomiarów: wysokości, szerokości i długości prostaty. Metoda ta jest uważana za najdokładniejszą w ocenie wymiarów gruczołu krokowego. Następnie pod kontrolą TRUS i palpacji pobierano biopaty z powierzchni stercza. Materiał umieszczano w kasetkach, zalewano roztworem Formaliny i natychmiast przesyłano do Zakładu Patomorfologii SP ZOZ Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze celem dalszej obróbki i oceny.

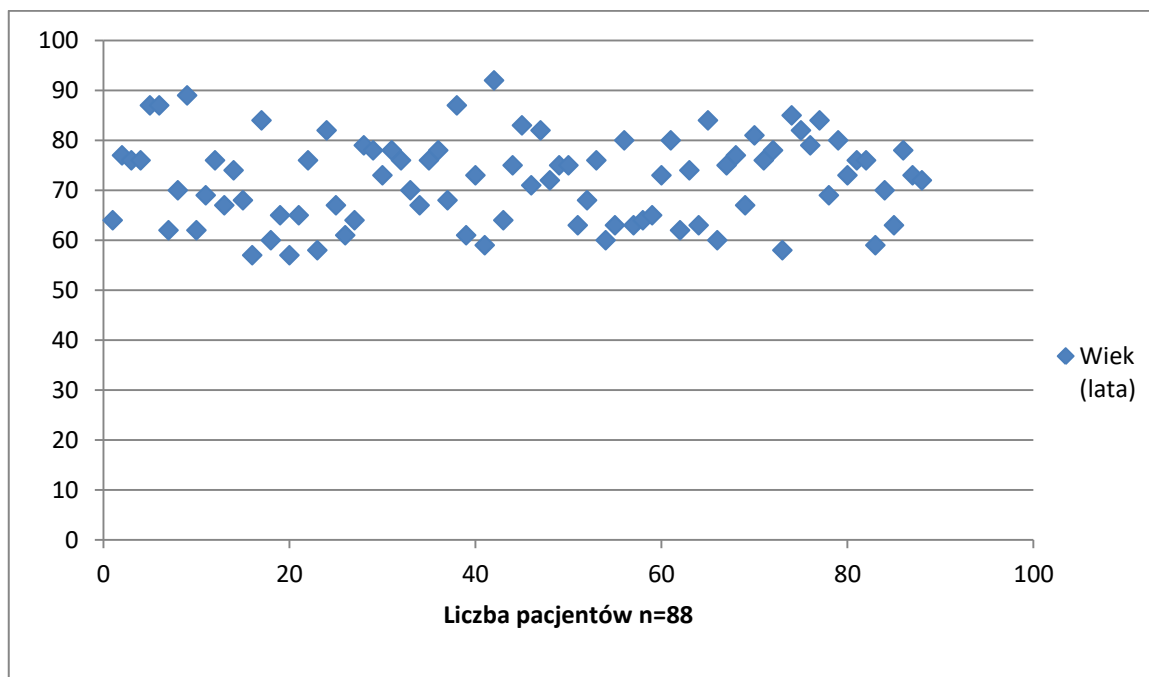


Rycina 4. Stolik zabiegowy przygotowany do wykonania biopsji stercza.

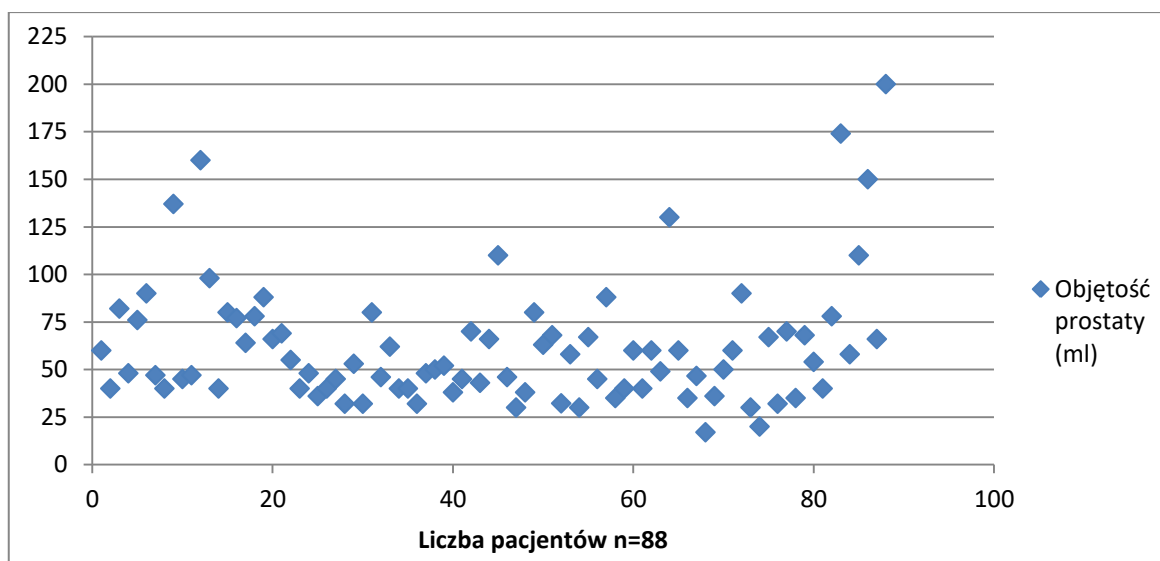
Następnie pacjentów wzywano na wizytę kontrolną po 6-ciu miesiącach od rozpoczęcia leczenia raka prostaty. Zbierano od nich wywiad dotyczący działań niepożądanych, które

pojawiły się w przebiegu terapii, oraz pobierano krew celem ponownego oznaczenia stężeń IMPDH2 i PSA. Dane zbierano w formularzu: "Arkusz oceny pacjenta po leczeniu" (Sup-3).

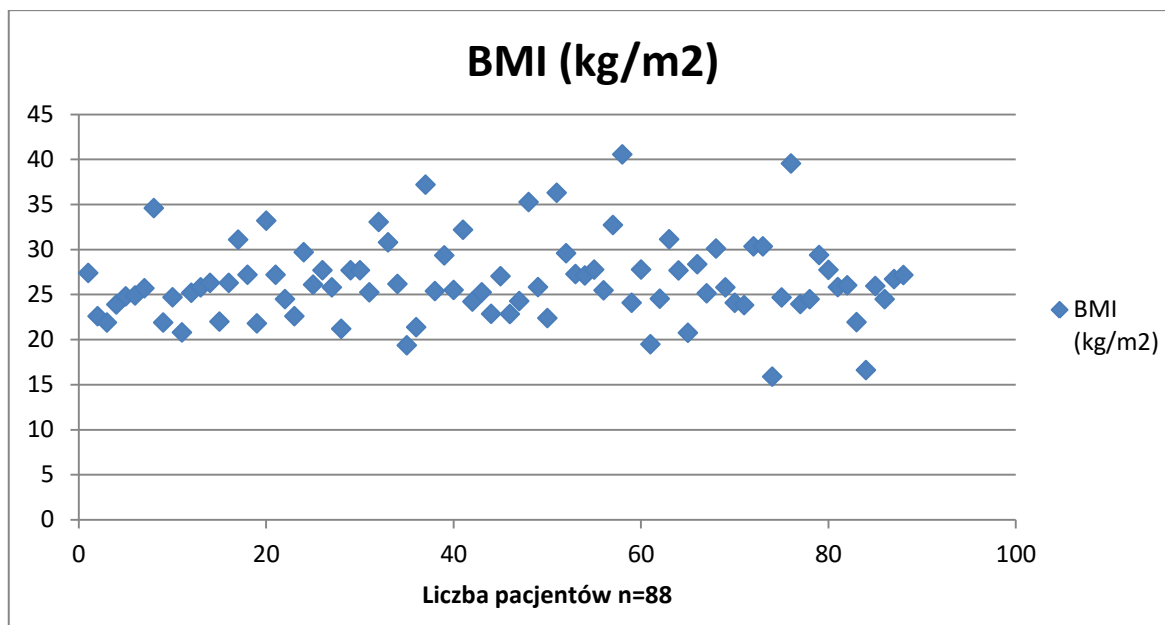
W ten sposób do grupy badanej zakwalifikowano i opisano 88 pacjentów. Zbiorowość tą charakteryzowały następujące parametry:



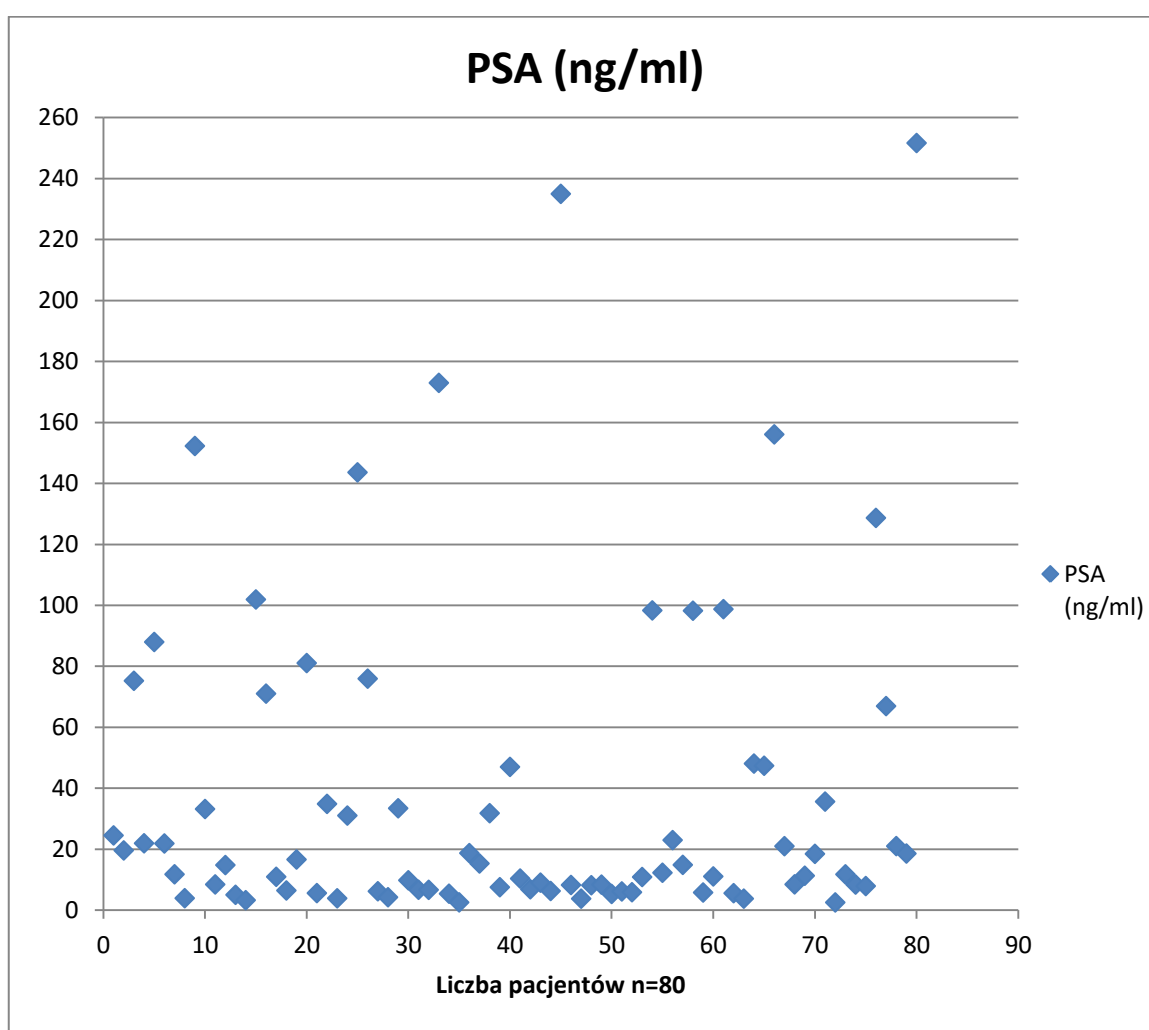
Wykres 6. Wiek pacjentów w grupie badanej (lata).



Wykres 7. Objętość prostaty w grupie badanej Width x Height x Depth (ml).

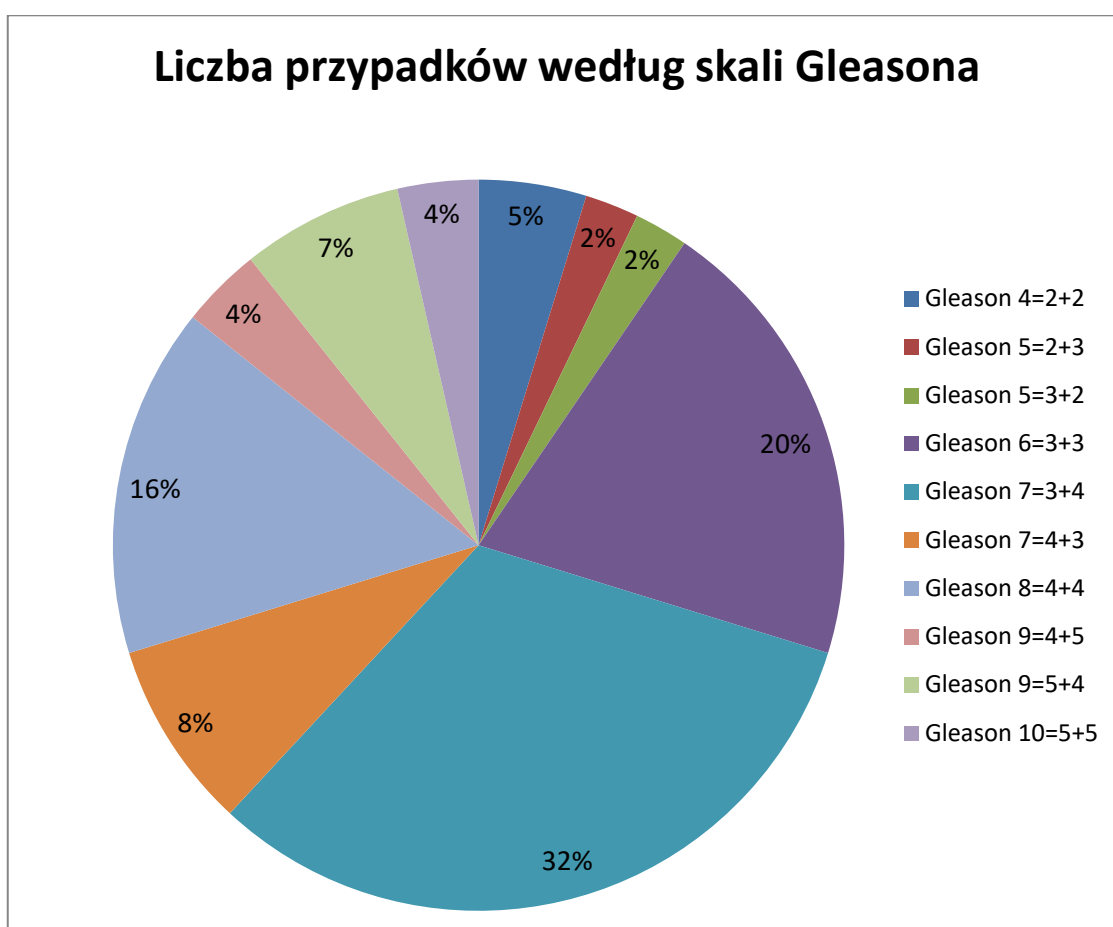


Wykres 8. Body Mass Index pacjentów w grupie badanej (kg/m²).

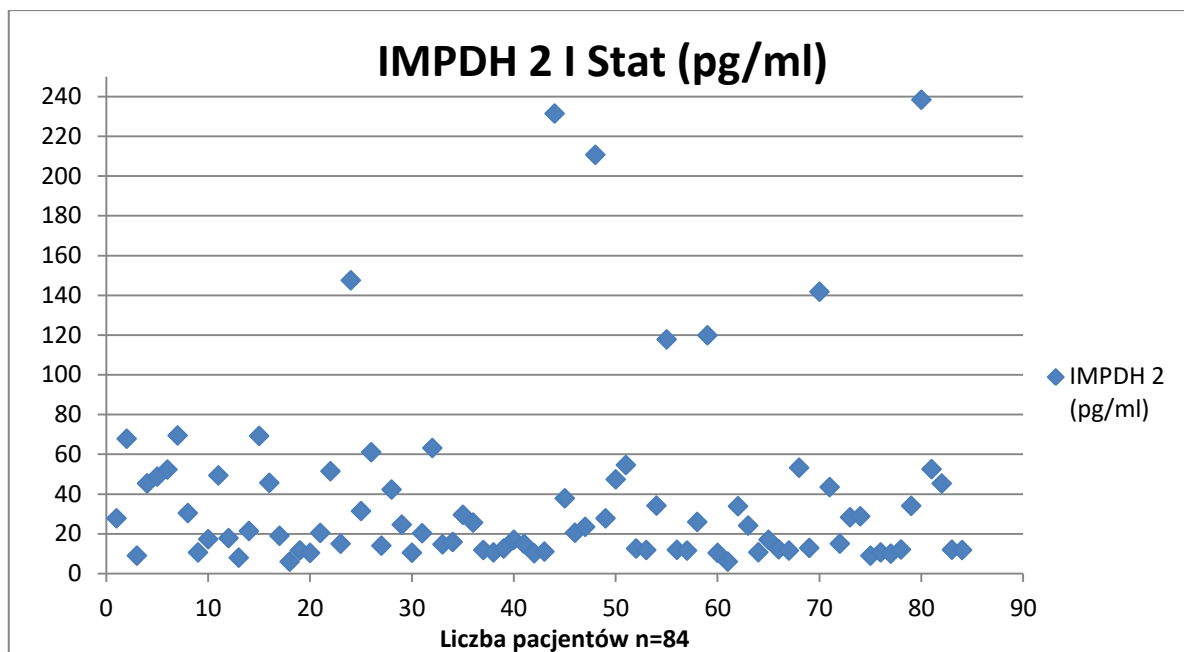


Wykres 9. PSA pacjentów w grupie badanej (ng/ml).

Z wykresu usunięto 8 wartości powyżej 260 ng/ml. celem poprawy jego czytelności (wartości pozostawiono w obliczeniach). Każdy chory w badanej grupie legitymował się dwoma wynikami PSA. Pierwszym wykonanym w ościennym, przypadkowym laboratorium, czasem na długo przed przyjęciem do szpitala. Drugi wynik wykonywano w laboratorium szpitalnym bezpośrednio przed badaniem. Do celów statystycznych brano pod uwagę wynik szpitalny celem ujednolicenia wartości PSA i zwiększenia dokładności oznaczeń. Wyjątek stanowiły 3 sytuacje w których wynik pierwszy podawał dokładną wartość liczbową, natomiast wynik drugi okazywał się wartością nieoznaczalną. W tych przypadkach do obliczeń używano wyniku podającego konkretny poziom.



Wykres 10. Skala Gleasona nowotworów prostaty w grupie badanej.



Wykres 11. Poziom IMPDH 2 w grupie badanej (pg/ml).

Średnia wartość w tej grupie wynosiła 55,89 pg/ml. Z wykresu odrzucono 4 skrajne wartości powyżej 400 pg/ml.

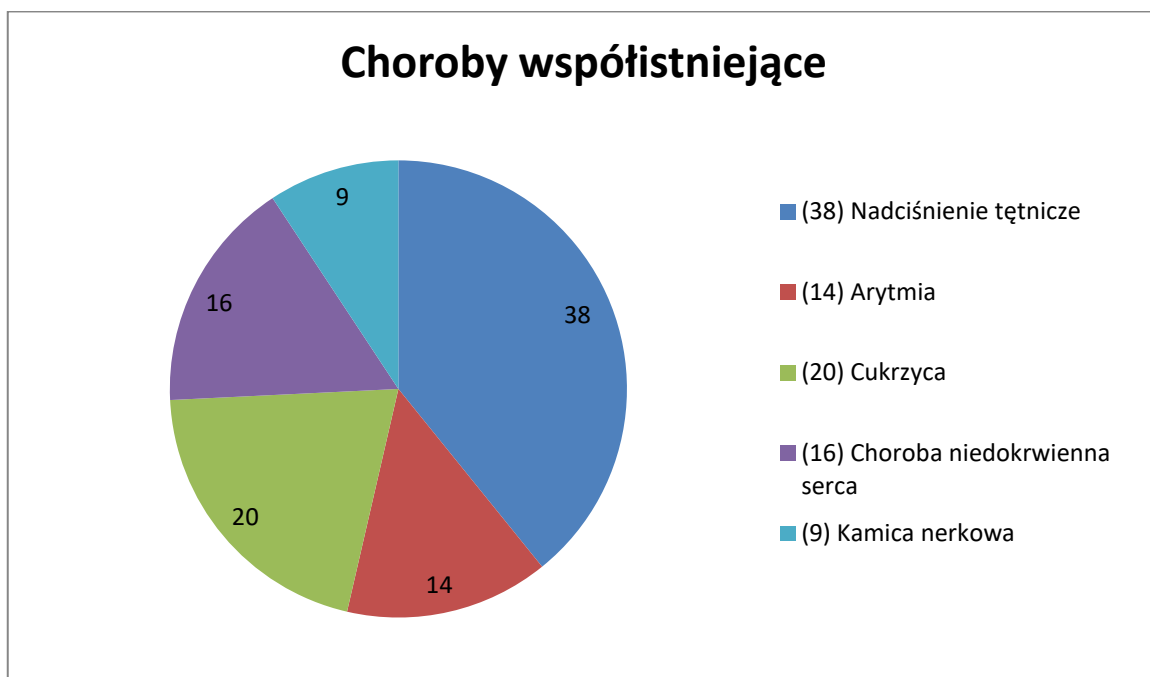
Tabela ilości biopsji wykonanych poszczególnym pacjentom pokazuje, że u zdecydowanej większości (83%) wystarczyło wykonanie jednego, lub dwóch (14%) badań do rozpoznania nowotworu prostaty.

Tabela 9. Liczba biopsji wykonana przed rozpoznaniem nowotworu prostaty.

Ilość biopsji:	Liczba pacjentów:
1	71 (83%)
2	12 (14%)
3	2 (1%)
4	1 (1%)
5	2 (1%)

Choroby współistniejące

Spośród schorzeń współistniejących w zbiorze pacjentów z nowotworem prostaty, najczęstszymi były choroby układu krążenia: nadciśnienie tętnicze, ChNS (choroba niedokrwienna serca), arytmia. Cukrzyca, metaboliczna choroba cywilizacyjna, uplasowała się na drugim miejscu w badanej grupie. Dość często trafiały się również przypadki kamicy nerkowej.



Wykres 12. Choroby współistniejące w badanej grupie.

Używki

Spośród dostępnych używek w ankiecie pytano o dwie najczęściej stosowane: nikotynizm oraz nadużywanie alkoholu. Wśród pacjentów grupy badanej regularne palenie tytoniu deklarowało 30 osób. Za nadużywających alkoholu uważano badanych uprawiających tzw. „picie ryzykowne” (ang. hazardous drinking), czyli spożywających powyżej 6 standardowych porcji alkoholu dziennie.¹¹¹ Nadmienić należy iż, standardowa dawka alkoholu = standardowa porcja alkoholu = standardowa jednostka alkoholu (SJA) to 10 g (lub 12,5 ml) czystego alkoholu etylowego. Przeliczając na popularne napoje alkoholowe to:

500 ml piwa (duże piwo) 4,5% to 22,5 ml/18 g alkoholu (1,8 SJA),

175 ml wina (kieliszek) 12% to 21 ml/16,8 g alkoholu (1,68 SJA),

50 ml wódki 40% to 20 ml/16 g alkoholu (1,6 SJA).

Zatem na potrzeby tego badania, za nadużywającego alkoholu uznawano badanego spożywającego powyżej 2 piw, 3 kieliszków wina lub 3 kieliszków wódki, częściej niż 4x w tygodniu. Taki stan zadeklarowało 15 osób.

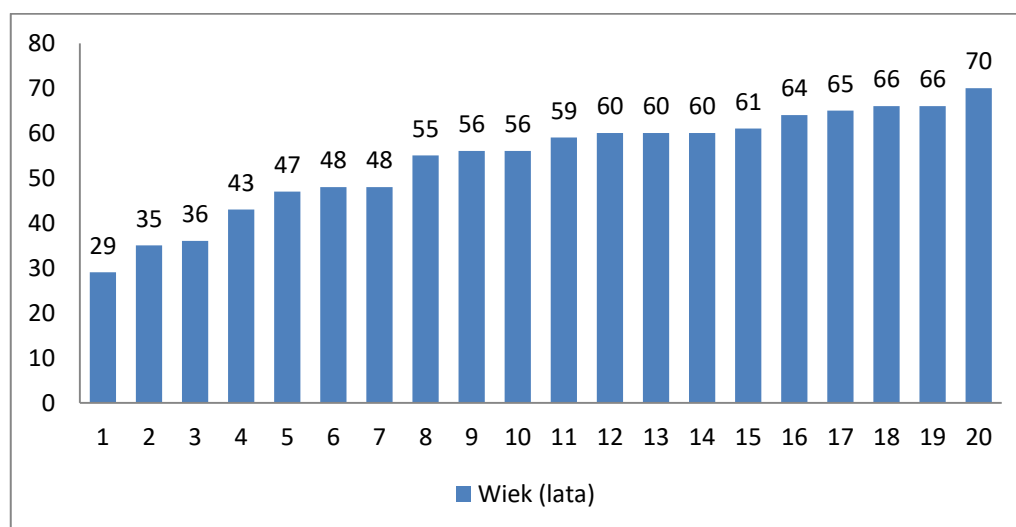
3.2. Charakterystyka grupy kontrolnej.

Grupę kontrolną stanowili losowo wybrani pacjenci oddziału Urologii Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze trafiający celem leczenia nienowotworowych, niezapalnych chorób układu moczowego w latach 2013-2014. Typowe łagodne dolegliwości chorych z tej grupy stanowiły np.: krótkie wędzidełko prącia, stulejka, torbiel najądrza, wodniak jądra lub kaszak moszny. Każdy z członków grupy kontrolnej otrzymywał krótki opis celu i formy prowadzonego doświadczenia z formularzem świadomej zgody na udział w nim do podpisania: „Formularz zgody pacjenta- grupa kontrolna” (Sup-4). Pacjenci byli również informowani, że mogą wycofać udzieloną zgodę, na każdym etapie testu. Z chorymi przeprowadzano wywiad lekarski pytając ich szczególnie o wiek, choroby współistniejące, wcześniejsze zabiegi urologiczne, nałogi (palenie tytoniu i alkohol). Schorzenia przewlekłe, wywiad leczenia urologicznego, oraz używki dyskwalifikowały badanego z grupy kontrolnej. Następnie w trakcie badania fizykalnego mierzono wagę i wzrost obliczając BMI. Powyższe informacje wraz z datą przeprowadzenia badania odnotowywano.

Następnie chorym, przed jakimkolwiek dalszym postępowaniem, pobierano krew do badań laboratoryjnych. Próbkówki trafiały natychmiastowo do Centralnego Laboratorium SP ZOZ Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze celem oznaczenia poziomu IMPDH2 w grupie kontrolnej.

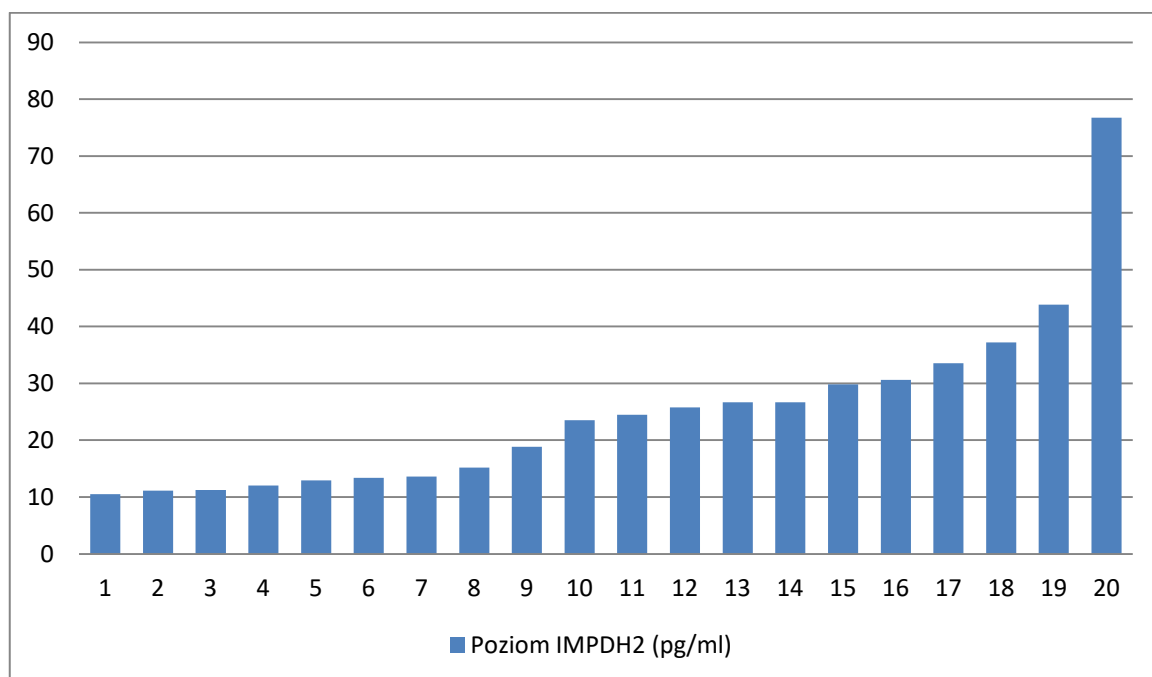
Po pobraniu krwi wykonywano badanie DRE odnotowując jego wynik. Następnie w trakcie ultrasonografii przezodbytniczej wyznaczano objętość stercza, oraz poszukiwano w nim echogennych nieprawidłowości dyskwalifikujących badanego z grupy kontrolnej.

W ten sposób do grupy kontrolnej zakwalifikowano 20 chorych. Charakteryzowała się ona następującymi parametrami:



Wykres 13. Wiek pacjentów w grupie kontrolnej.

Spośród 20 pacjentów kontroli najmłodszy miał 29 lat, a najstarszy 70 lat. Średnia wieku w tym zbiorze chorych wynosiła 54,2 lata.



Wykres 14. IMPDH2 w grupie kontrolnej

Średni poziom IMPDH2 w grupie kontrolnej wynosił 24,879 pg/ml. Najmniejszą odnotowaną wartością było 10,48 pg/ml. Pacjent z najwyższym stężeniem IMPDH2 wykazywał 76,71 pg/ml tego związku w surowicy.

Tabela 10. Pozostałe parametry w grupie kontrolnej.

	PSA (ng/ml)	Objętość prostaty (ml.)	BMI (kg/m ²)
Średnia wartość	2,085	43	31,45
Odchylenie	± 1,885	± 27	± 8,25
Najwyższa wartość	3,97	70	39,7
Najniższa wartość	0,2	16	23,2

3.3. Analiza statystyczna.

Do analiz statystycznych wykorzystano oprogramowanie MS Excel 2013, IBM SPSS Statistics (wersja 24) i Statistica (wersja 12). Dla wszystkich obliczeń przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$. Do opisu zebranego materiału wykorzystano standardowe miary statystyczne: odchylenie standardowe, wartości maksymalne i minimalne, średnia, mediana, kwartyle, percentyle, błąd standardowy. Do porównań odpowiadających na założone cele pracy wykorzystano następujące testy i analizy statystyczne:

1. Test Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lillieforsa w celu sprawdzenia normalności rozkładów zmiennych wiek, BMI, V prostaty, IMPDH2 I, IMPDH2 II, PSA Stat., PSA (po leczeniu)
2. Test U Manna-Whitneya dla prób niezależnych w celu określenia:
 - a) wpływu obecności raka prostaty na poziom IMPDH2, w porównaniu do osób zdrowych?
 - b) korelacji pomiędzy poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II a wynikiem badania DRE?
 - c) występowania wyższych wartości PSA i skali Glesona u osób DRE (+), w zebranej przez mnie grupie pacjentów?
 - d) związku pomiędzy poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II a występującymi często chorobami podstawowymi?
 - e) wpływu stosowania popularnych używek (tytoń, alkohol) na poziom IMPDH2?
3. Test znakowanych rang Wilcoxona dla prób zależnych w celu stwierdzenia:
 - a) odpowiedzi na leczenie, pod postacią obniżenia PSA po 6 miesiącach od początku wdrożenia terapii raka prostaty, w stosunku do początkowego poziomu PSA?
 - b) obniżenia stężenia IMPDH2 po 6 miesiącach od włączenia leczenia raka stercza, w stosunku do początkowego poziomu IMPDH2?
4. Test Kruskala-Wallisa dla prób niezależnych aby sprawdzić czy istnieje związek pomiędzy zmianą poziomu IMPDH2 po 6 miesiącach od włączenia leczenia a zastosowaną terapią?
5. Analizę korelacji monotonicznej Tau Kendalla w celu określenia czy stopień złośliwości nowotworu wyrażony w skali Gleasona koreluje z poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II u ludzi z rakiem prostaty?
6. Analizę korelacji monotonicznej Rho-Spearmana w celu sprawdzenia:
 - a) związku pomiędzy poziomem IMPDH2 a wartością PSA?
 - b) korelacji pomiędzy poziomem PSA a rozmiarem prostaty w mojej grupie badanej?
 - c) wpływu rozmiaru prostaty na poziom IMPDH2?

- d) oddziaływania otyłości wyrażonej przy pomocy wskaźnika BMI na poziom IMPDH2?
- e) tendencji do występowania większych objętości stercza u starszych pacjentów?
- f) związku poziomów PSA z wiekiem pacjentów w mojej grupie badanej?
- g) korelacji pomiędzy poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II a wiekiem badanych?

4. Wyniki

4.1. Informacje o zmiennych

W celu sprawdzenia normalności rozkładów zmiennych: wiek, BMI, V prostaty, IMPDH2 I, IMPDH2 II, PSA Stat. i PSA (po leczeniu) wykorzystano test Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

Na jego podstawie stwierdzono, że jedynie w przypadku zmiennej "wiek" empiryczny rozkład parametru nie różni się w istotnym stopniu od rozkładu normalnego. Dla pozostałych zmiennych właściwe jest stosowanie testów nieparametrycznych.

Tabela 11. Test normalności rozkładu zmiennych: wiek, BMI, V prostaty, IMPDH2 I, IMPDH2 II, PSA Stat. i PSA (po leczeniu).

Podsumowanie testu hipotezy				
	Hipoteza zerowa	Test	Istotność	Decyzja
1	Rozkład zmiennej Wiek jest normalny ze średnią 69 i odchyleniem standardowym 11,455.	Test Kołmogorowa-Smirnowa dla jednej próby	87,000 ¹	Przyjmij hipotezę zerową.
2	Rozkład zmiennej BMI jest normalny ze średnią 26 i odchyleniem standardowym 4,586.	Test Kołmogorowa-Smirnowa dla jednej próby	,000 ¹	Odrzuć hipotezę zerową.
3	Rozkład zmiennej V prostaty jest normalny ze średnią 56 i odchyleniem standardowym 32,626.	Test Kołmogorowa-Smirnowa dla jednej próby	,000 ¹	Odrzuć hipotezę zerową.
4	Rozkład zmiennej IMPDH2 I jest normalny ze średnią 50 i odchyleniem standardowym 85,845.	Test Kołmogorowa-Smirnowa dla jednej próby	,000 ¹	Odrzuć hipotezę zerową.
5	Rozkład zmiennej IMPDH2 II jest normalny ze średnią 42 i odchyleniem standardowym 86,871.	Test Kołmogorowa-Smirnowa dla jednej próby	,000 ¹	Odrzuć hipotezę zerową.
6	Rozkład zmiennej PSA Stat. jest normalny ze średnią 134 i odchyleniem standardowym 526,251.	Test Kołmogorowa-Smirnowa dla jednej próby	,000 ¹	Odrzuć hipotezę zerową.
7	Rozkład zmiennej PSA (po leczeniu) jest normalny ze średnią 7 i odchyleniem standardowym 20,700.	Test Kołmogorowa-Smirnowa dla jednej próby	,000 ¹	Odrzuć hipotezę zerową.

Przedstawiono asymptotyczne istotności. Poziom istotności wynosi ,05.

¹Poprawka Lillieforsa

Tabela 12. Statystyki opisowe badanych zmiennych

Zmienna	Statystyki opisowe (dla wszystkich badanych)						
	N ważnych	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny Kwarty I	Górny Kwarty I	Skośność
Wiek	108	69,50	29,00	92,00	62,00	76,00	-0,77
BMI	108	25,50	15,00	40,00	24,00	29,00	0,65
V prostaty	108	47,50	16,00	200,00	36,00	67,50	1,99
Gl.score_rec	84	5,00	1,00	10,00	4,00	7,00	0,19
IMPDH2 I	108	23,83	6,00	483,89	12,08	45,34	3,61
PSA Stat	108	10,00	0,20	4000,00	3,99	47,00	6,05
IMPDH2 II	56	13,56	3,00	421,58	11,54	29,08	3,75
PSA (po leczeniu)	61	0,60	0,00	113,77	0,06	3,67	4,10
IMPDH2 I Stat	84	20,50	6,00	238,00	11,00	45,00	2,90

4.2 Wyniki dodatkowe

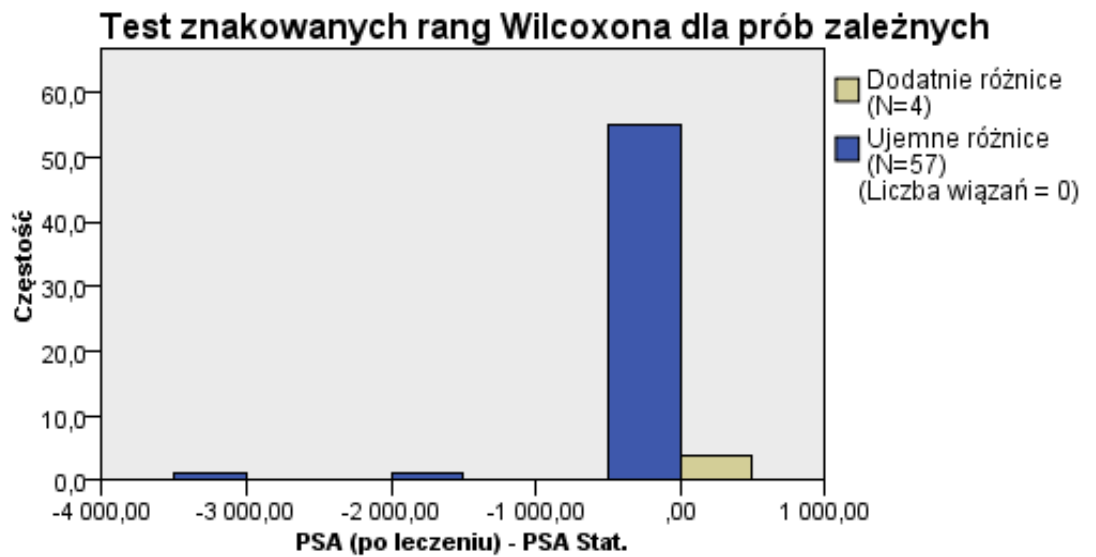
Kilka znanych ogólnie założeń przetestowano na materiale zebrany do celów tej pracy. Sprawdzone je aby uwiarygodnić zebrane grupy pacjentów, jako nie odbiegające od standardów populacyjnych. W moich zbiorowościach chorych sprawdzałem następujące zależności:

Analiza 1. Odpowiedź na leczenie, pod postacią obniżenia PSA po 6 miesiącach od początku wdrożenia terapii raka prostaty, w stosunku do początkowego poziomu PSA.

Tabela 13. Statystyki opisowe poziomów PSA (ng/ml)

Zmienna	N ważnych	Mediana	Minimum	Maksimum	25 Percentyl	75 Percentyl
PSA_stat	61	14,00	2,00	3182,00	6,00	66,00
PSA (po leczeniu)	61	0,60	0,00	113,77	0,06	3,67

Do porównania wartości PSA przed i po włączeniu leczenia nowotworu prostaty wykorzystano test Wilcoxona. Uzyskany wynik ($W = 64$, $p < 0,001$) wskazuje na statystycznie istotne różnice między dwoma pomiarami. Poziom PSA u niemal wszystkich pacjentów uległ obniżeniu, na co wskazuje przewaga ujemnych różnic, przy czym u czterech pacjentów odnotowano nieznaczny wzrost poziomu PSA w drugim badaniu.



N ogółem	61
Statystyka testu	64,000
Błąd standardowy	139,221
Standaryzowana statystyka testu	-6,332
Istotność asymptotyczna (test dwustronny)	,000

Wykres 15. Porównanie wartości PSA (ng/ml) przed i po włączeniu leczenia raka prostaty.

Odpowiedź na leczenie, pod postacią spadku PSA, zaobserwowano u prawie wszystkich pacjentów.

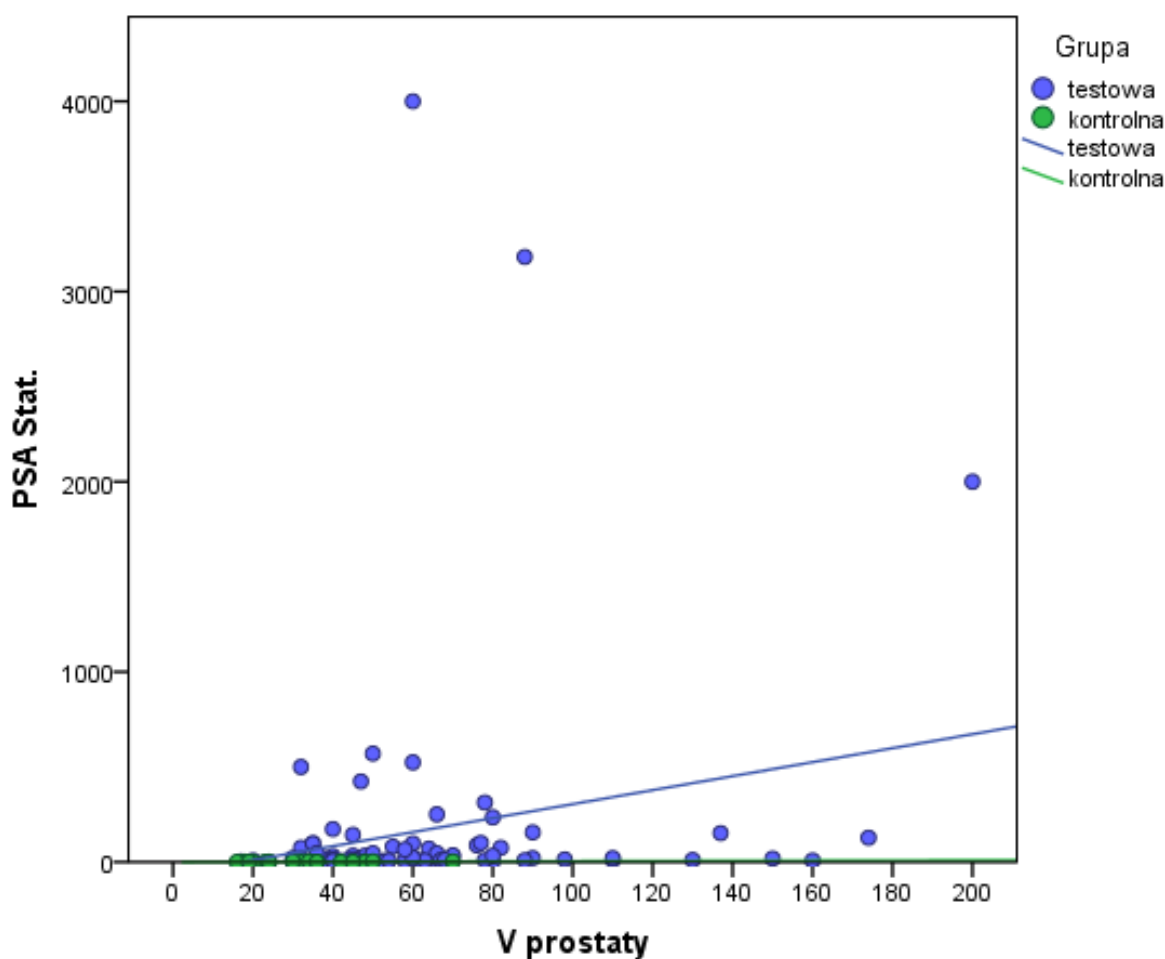
Analiza 2. Związek pomiędzy poziomem PSA a rozmiarem prostaty w mojej grupie badanej.

Wykonano analizę korelacji rhoSpearmana, u wszystkich badanych, w wyniku której stwierdzono wysoką dodatnią korelację pomiędzy poziomem PSA a rozmiarem prostaty ($r = 0,502$, $p < 0,0001$). Wskazuje to na wyraźną tendencję do współzmienności, w której wyższym wartościom PSA towarzyszy większy rozmiar prostaty.

Korelacje

			V prostaty	PSA Stat.
rhoSpearmana	V prostaty	Współczynnik korelacji	1,000	,502**
		Istotność (dwustronna)	.	,000
		N	108	108
	PSA Stat.	Współczynnik korelacji	,502**	1,000
		Istotność (dwustronna)	,000	.
		N	108	108

**. Korelacja istotna na poziomie 0.01 (dwustronnie).



Wykres 16. Wykres zależności poziomu PSA (ng/ml) od objętości prostaty (ml) w obu grupach chorych

Tą samą analizę wykonano odrębnie dla grupy testowej i grupy kontrolnej. Ponownie wykazano istnienie istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem PSA a rozmiarem prostaty, przy czym jest on silniejszy u badanych z grupy kontrolnej ($r = 0,481$, $p < 0,05$) niż u badanych z grupy testowej ($r = 0,292$, $p < 0,01$).

Tabela 14. Tabela zależności poziomu PSA (ng/ml) od objętości prostaty (ml) w grupie badanej.

Korelacje^a

			PSA Stat.	V prostaty
rhoSpearmana	PSA Stat.	Współczynnik korelacji	1,000	,292**
		Istotność (dwustronna)	.	,006
		N	88	88
	V prostaty	Współczynnik korelacji	,292**	1,000
		Istotność (dwustronna)	,006	.
		N	88	88

**. Korelacja istotna na poziomie 0.01 (dwustronnie).

a. Grupa testowa

Tabela 15. Tabela zależności poziomu PSA (ng/ml) od objętości prostaty (ml) w grupie kontrolnej.

Korelacje^a

			PSA Stat.	V prostaty
rhoSpearmana	PSA Stat.	Współczynnik korelacji	1,000	,481*
		Istotność (dwustronna)	.	,032
		N	20	20
	V prostaty	Współczynnik korelacji	,481*	1,000
		Istotność (dwustronna)	,032	.
		N	20	20

*, Korelacja istotna na poziomie 0.05 (dwustronnie).

a. Grupa kontrolna

Analiza 3. Tendencja do występowania większych objętości stercza u starszych pacjentów.

Wykonano analizę korelacji rhoSpearmana, u wszystkich badanych, w wyniku której stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy wiekiem chorego a rozmiarem prostaty ($r = 0,320$, $p < 0,05$). Wskazuje to na wyraźną tendencję do współzmienności, w której starszym pacjentom towarzyszy większy rozmiar prostaty.

Tabela 16. Tabela zależności objętości prostaty (ml) od wieku (lata) w obu grupach chorych

Korelacje

rhoSpearmana	Wiek	Współczynnik korelacji	Wiek	V prostaty
			1,000	,320**
			Istotność (dwustronna)	.
			N	108
	V prostaty	Współczynnik korelacji	,320**	1,000
			Istotność (dwustronna)	.
			N	108

**. Korelacja istotna na poziomie 0.01 (dwustronnie).

Analiza 4. Związek poziomów PSA z wiekiem pacjentów w mojej grupie badanej.

Wykonano analizę korelacji rhoSpearmana, u wszystkich badanych, która wykazała istnienie istotnego statystycznie związku pomiędzy wiekiem a poziomami PSA ($r = 0,473$, $p < 0,05$).

Tabela 17. Tabela zależności poziomu PSA (ng/ml) od wieku w obu grupach chorych.

Korelacje

rhoSpearmana	Wiek	Współczynnik korelacji	Wiek	PSA Stat.
			1,000	,473**
			Istotność (dwustronna)	,000
			N	108
	PSA Stat.	Współczynnik korelacji	,473**	1,000
			Istotność (dwustronna)	.
			N	108

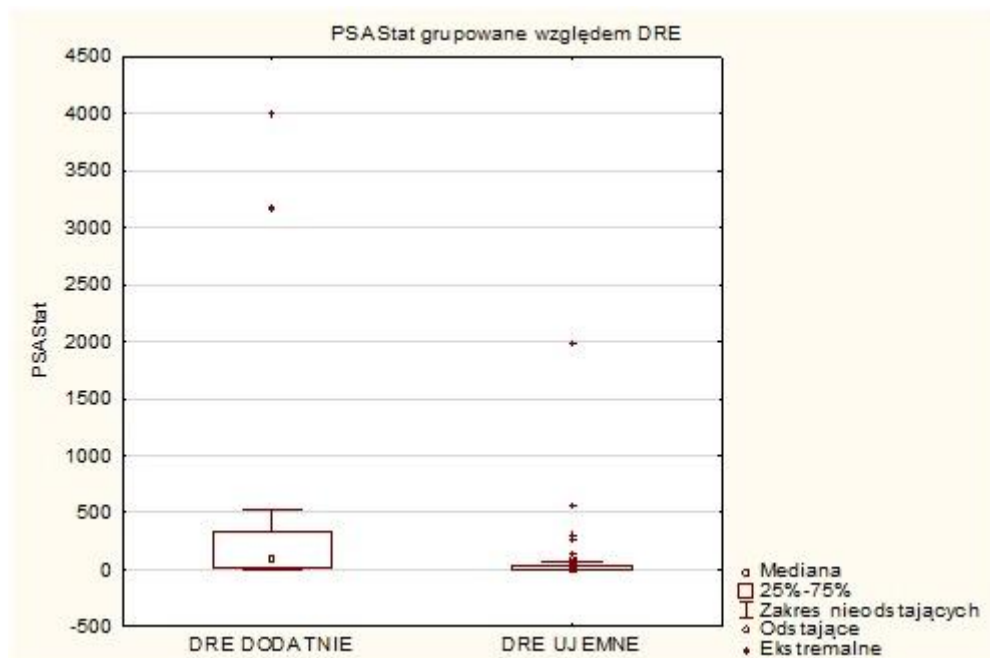
**. Korelacja istotna na poziomie 0.01 (dwustronnie).

Poziomy PSA wzrastają wraz z wiekiem zarówno w populacji ogólnej, jak i u badanych przeze mnie chorych.

Analiza 5. Występowanie wyższych wartości PSA i skali Glesona u osób DRE (+), w zebranej przeze mnie grupie pacjentów.

Do porównania poziomu PSA w grupie osób z dodatnim i ujemnym wynikiem badania DRE wykorzystano test U Manna-Whitneya. Uzyskany wynik ($U = 309,5$, $p < 0,001$) potwierdza istnienie statystycznie istotnej różnicy poziomu PSA pomiędzy dwoma grupami pacjentów. Wartości PSA w grupie pacjentów z dodatnim DRE są wyższe.

N ogółem	88
Statystyka testu	309,500
Błąd standardowy	100,341
Standaryzowana statystyka testu	-3,692
Istotność asymptotyczna (test dwustronny)	,000

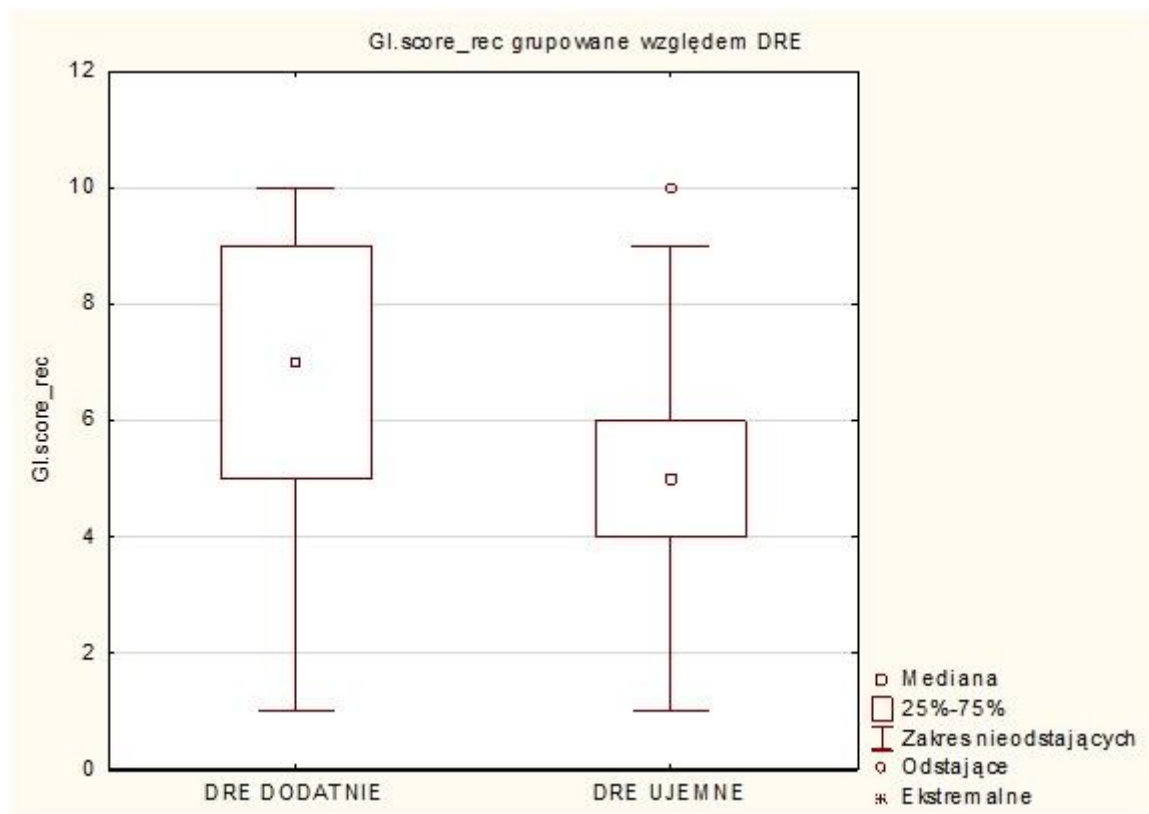


Wykres 17. Porównanie poziomu PSA (mg/ml) z wynikiem testu DRE w grupie badanej.

Do porównania poziomu skali Gleasona w grupie osób z dodatnim i ujemnym wynikiem badania DRE wykorzystano test U Manna-Whitneya. Uzyskany wynik ($U = 409,5$, $p < 0,05$)

potwierdza istnienie statystycznie istotnej różnicy poziomu złośliwości histopatologicznej nowotworu prostaty pomiędzy dwoma grupami pacjentów. Wartości skali Gleasona w grupie pacjentów z dodatnim DRE są wyższe.

N ogółem	84
Statystyka testu	409,500
Błąd standardowy	92,992
Standaryzowana statystyka testu	-2,479
Istotność asymptotyczna (test dwustronny)	,013



Wykres 18. Porównanie wartości skali Gleasona z wynikiem testu DRE w grupie badanej.

Osoby z rakiem prostaty mające wyczuwalne ognisko nowotworu w badaniu DRE przejawiają tendencję do wyższych wartości PSA oraz skali Gleasona.

4.3 Wyniki główne

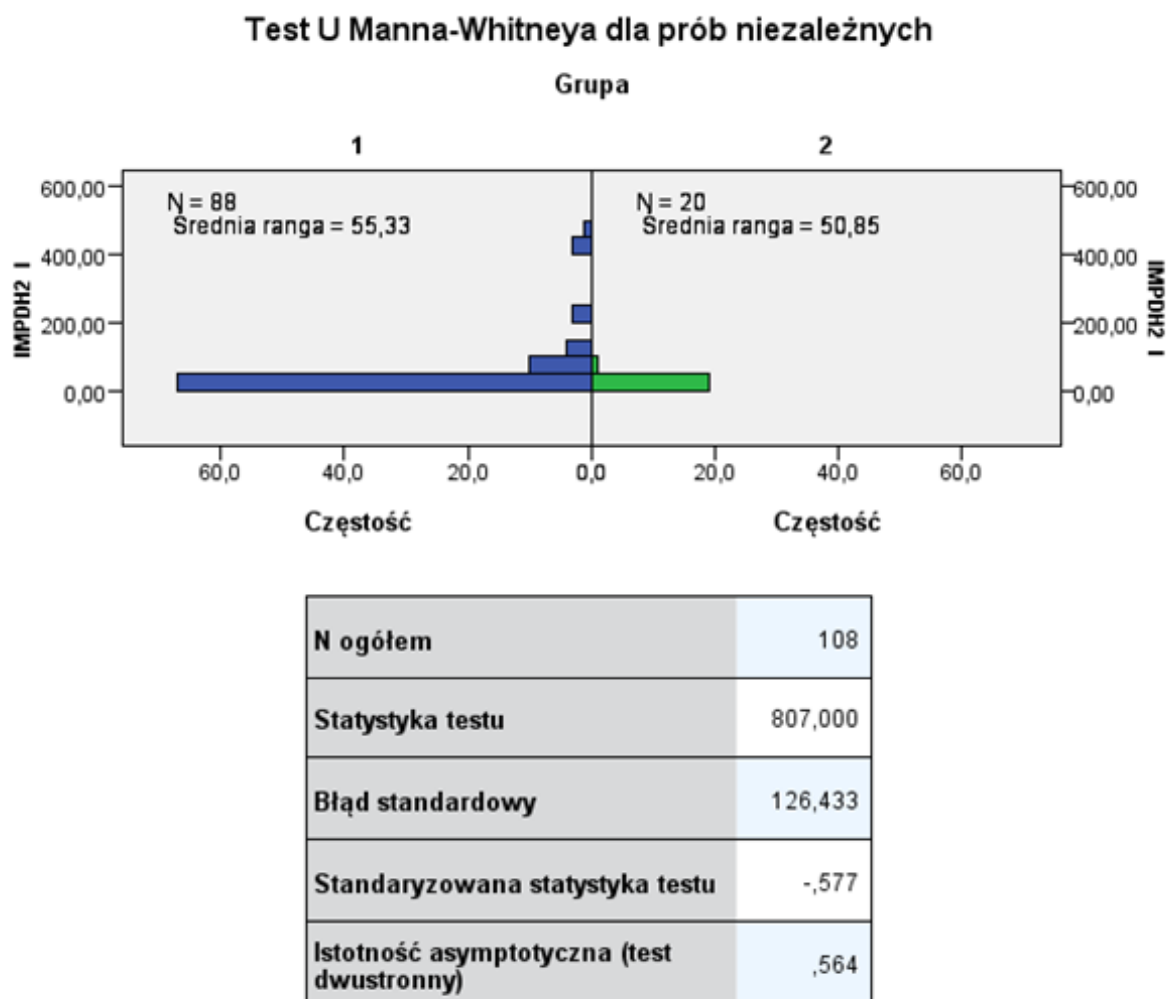
Wyniki umieszczone dalej stanowią odpowiedzi na główne pytania postawione w celach mojej pracy doktorskiej. Niektóre z nich opatrzone krótkim komentarzem, ale właściwe wnioski zostaną sformułowane w kolejnym rozdziale.

Hipoteza 1. Osoby ze zdiagnozowanym rakiem uzyskują wyższe wartości IMPDH2 od osób, u których nie zdiagnozowano raka.

Tabela 18. Statystyki opisowe poziomów IMPDH2 (pg/ml) w obu grupach.

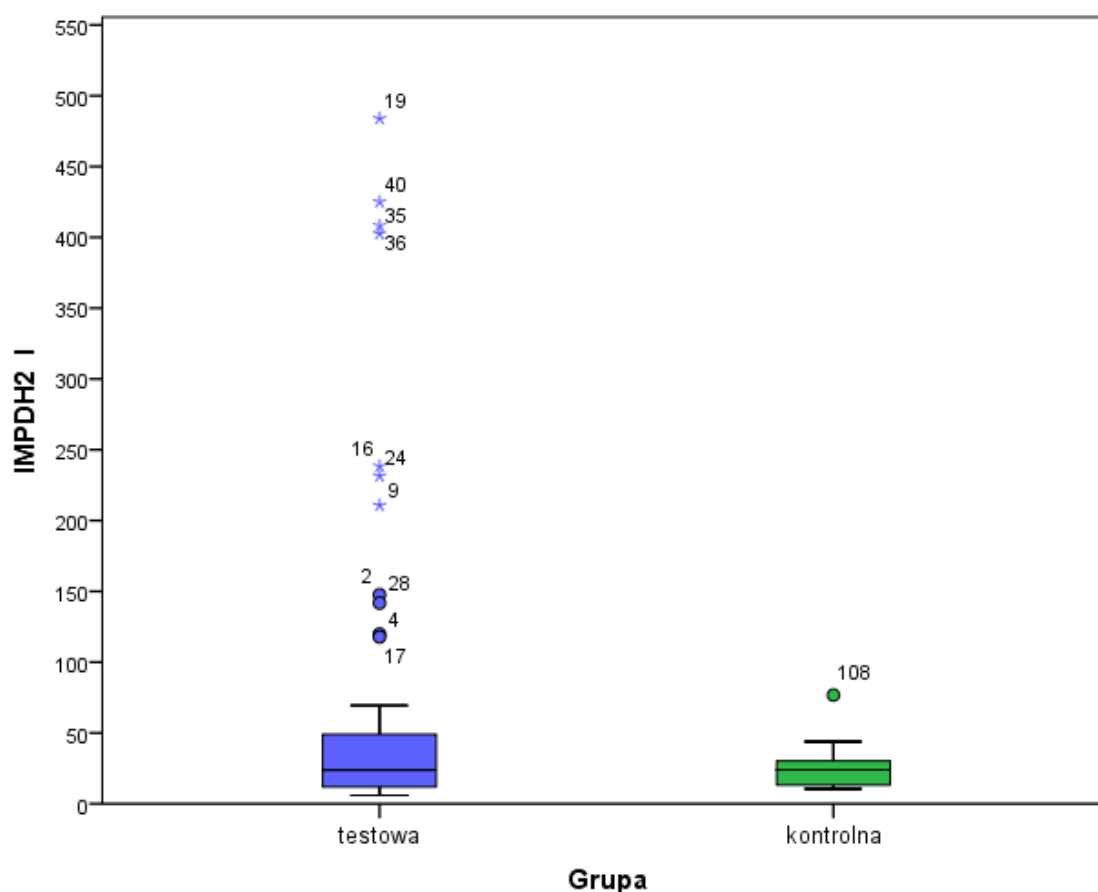
Zmienna IMPDH2 I						
Grupa	N ważnych	Mediana	Minimum	Maksimum	25 Percentyl	75 Percentyl
testowa	88	23,83	6,00	483,89	11,97	49,09
kontrolna	20	24,00	10,48	76,71	13,16	30,21

Do porównania wartości IMPDH2 w grupie testowej i kontrolnej wykorzystano test U Manna-Whitneya. Uzyskany wynik ($U = 807$, $p \geq 0,05$) nie pozwala na potwierdzenie istnienia statystycznie istotnej różnicy poziomu IMPDH2 pomiędzy grupą testową i kontrolną.



Wykres 19. Porównanie wartości IMPDH2 (pg/ml). Grupa badana vs. Grupa kontrolna.

Wynik ten nie potwierdza hipotezy o istnieniu istotnej statystycznie różnicy rozkładów zmiennej IMPDH2 w grupie testowej i kontrolnej, pomimo występowania wysokich wartości u niektórych pacjentów z grupy testowej (11 obserwacji odstających lub ekstremalnych w grupie testowej wobec 1 obserwacji w grupie kontrolnej).



Wykres 20. Porównanie wartości IMPDH2 (pg/ml). Grupa badana (testowa) vs. Grupa kontrolna z uwzględnieniem 11 obserwacji odstających lub ekstremalnych w Grupie badanej (testowej).

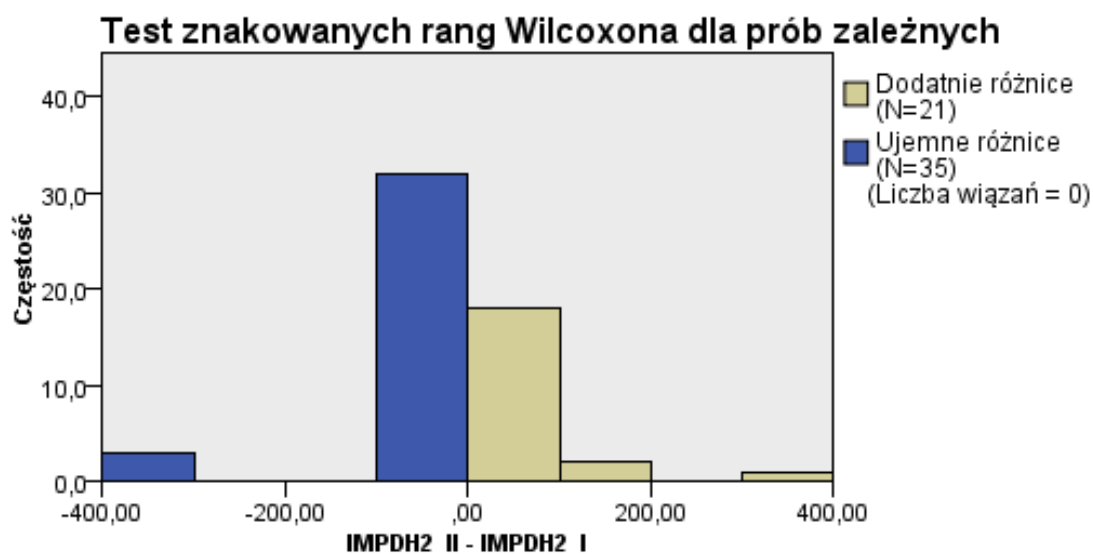
Hipoteza 2. Po 6 miesiącach od rozpoczęcia leczenia raka prostaty poziom Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II u pacjentów ulega obniżeniu, w stosunku do poziomu przed leczeniem.

Tabela 19. Statystyki opisowe poziomów IMPDH2 (pg/ml) w grupie badanej przed (IMPDH2 I) i po (IMPDH2 II) leczeniu

Zmienna	N ważnych	Mediana	Minimum	Maksimum	25 Percentyl	75 Percentyl
IMPDH2I	88	23,83	6	483,89	11,97	49,09
IMPDH2II	56	13,56	3	421,58	11,54	29,08

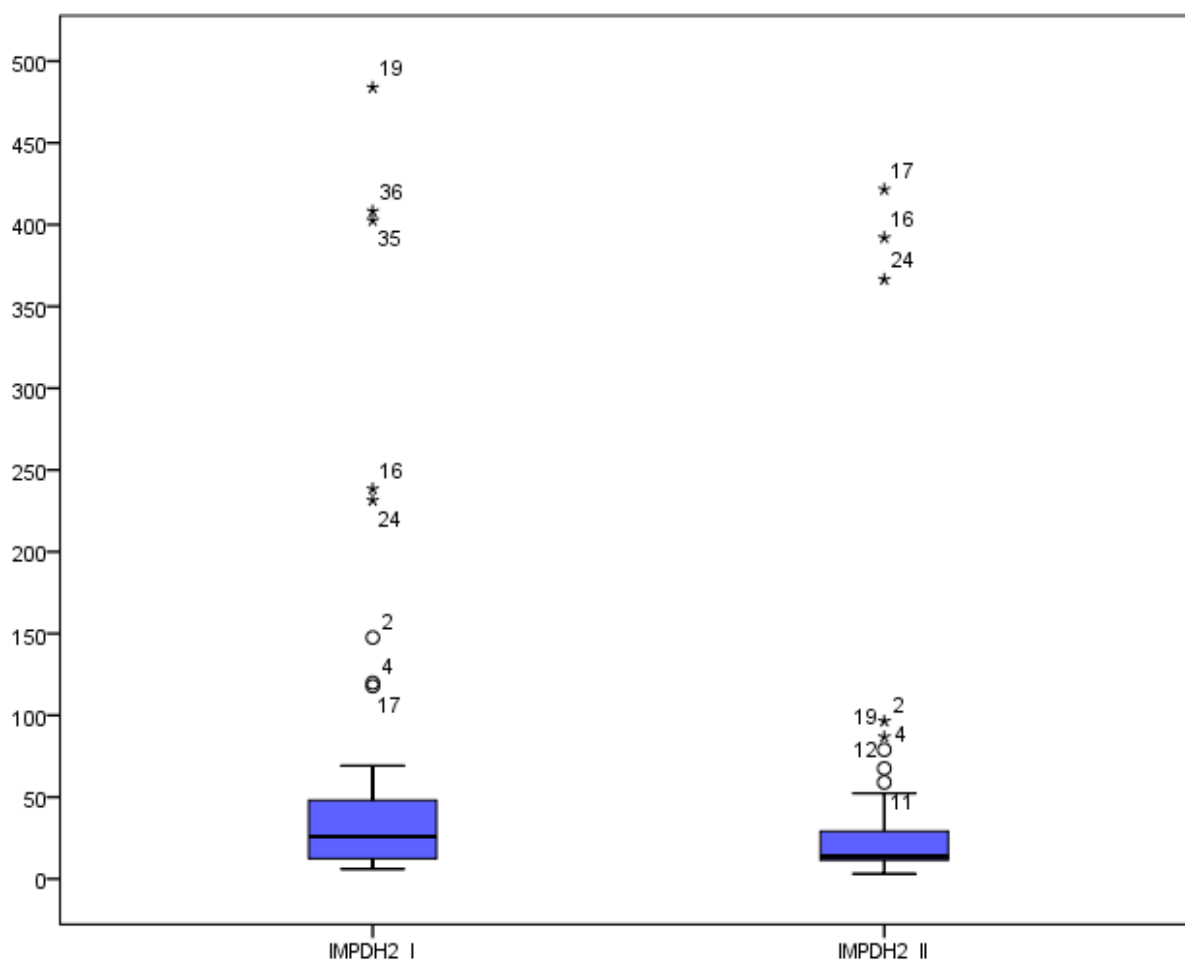
Do porównania wartości IMPDH2 przed i po włączeniu leczenia raka wykorzystano test Wilcozona. Uzyskany wynik ($W = 496$, $p < 0,05$) wskazuje na statystycznie istotne różnice między dwoma pomiarami. Poziom dehydrogenazy u większości pacjentów po 6 miesiącach

leczenia raka uległ obniżeniu, na co wskazuje przewaga ujemnych różnic, przy czym u trzech pacjentów odnotowano znaczący wzrost poziomu IMPDH2 w drugim badaniu.



N ogółem	56
Statystyka testu	496,000
Błąd standardowy	122,588
Standaryzowana statystyka testu	-2,464
Istotność asymptotyczna (test dwustronny)	,014

Wykres 21. Porównanie wartości IMPDH2 (pg/ml) przed i po włączeniu leczenia raka prostaty.



Wykres 22. Porównanie wartości IMPDH2 (pg/ml) przed i po włączeniu leczenia raka prostaty z uwzględnieniem wartości ekstremalnych.

Hipoteza 3. Rodzaj zastosowanego leczenia ma związek ze zmianą poziomu Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II po 6 miesiącach od jego włączenia.

Tabela 20. Statystyki opisowe zmiany poziomów IMPDH2 (pg/ml) w grupie badanej w zależności od wdrożonego leczenia.

Zmienna: IMPDH2_zmiana						
Leczenie	Nważnych	Mediana	Minimum	Maksimum	25 Percentyl	75 Percentyl
RTG + Hormonoterapia	20	-14,31	-397,12	7,00	-39,49	-2,43
Hormonoterapia	17	-1,42	-40,99	303,77	-5,70	14,96
Prostatectomia	8	0,24	-22,31	8,31	-9,87	4,21
RTG	7	-1,40	-13,00	11,06	-8,82	5,00
WW	4	-15,86	-50,86	15,66	-42,79	9,33

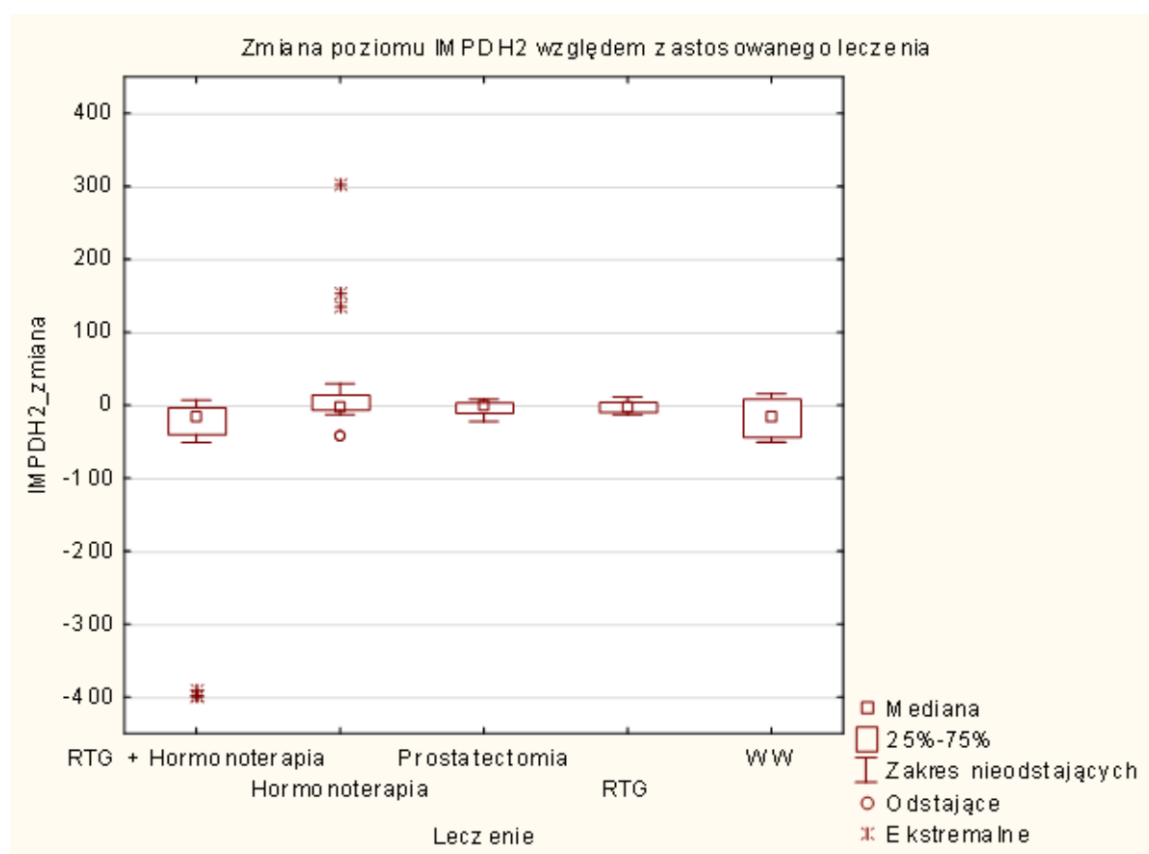
Podsumowanie testu hipotezy

	Hipoteza zerowa	Test	Istotność	Decyzja
1	Rozkład IMPDH2_zmiana jest taki sam dla kategorii zmiennej Leczenie_KAT.	Test Kruskala-Wallisa dla prób niezależnych	39,000	Odrzuć hipotezę zerową.

Przedstawiono asymptotyczne istotności. Poziom istotności wynosi ,05.

Do porównania zmiany wartości IMPDH2 w okresie 6 miesięcy (różnicy pomiędzy pierwszym i drugim badaniem) u pacjentów poddanych różnym metodom leczenia raka wykorzystano test Kruskala-Wallisa. Uzyskany wynik ($H = 10,063$, $p < 0,05$) wskazuje na istnienie statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami.

Test porównań wielokrotnych wykazuje, że różnice te dotyczą w głównej mierze wyników leczenia z wykorzystaniem hormonoterapii oraz hormonoterapii połączonej z RTG. Analiza rozkładów wartości wskazuje, że u pacjentów poddanych hormonoterapii IMPDH2 wzrastało częściej niż w pozostałych grupach.



N ogółem	56
Statystyka testu	10,063
Stopnie swobody	4
Istotność asymptotyczna (test dwustronny)	,039

Wykres 23. Wpływ rodzaju zastosowanego leczenia na zmianę poziomów IMPDH2 (pg/ml) w grupie badanej.

Hipoteza 4. Stopień złośliwości nowotworu wyrażony w skali Gleasona koreluje z poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II u ludzi z rakiem prostaty.

Tabela 21. Uporządkowanie skali Gleasona pod względem złośliwości histopatologicznej."

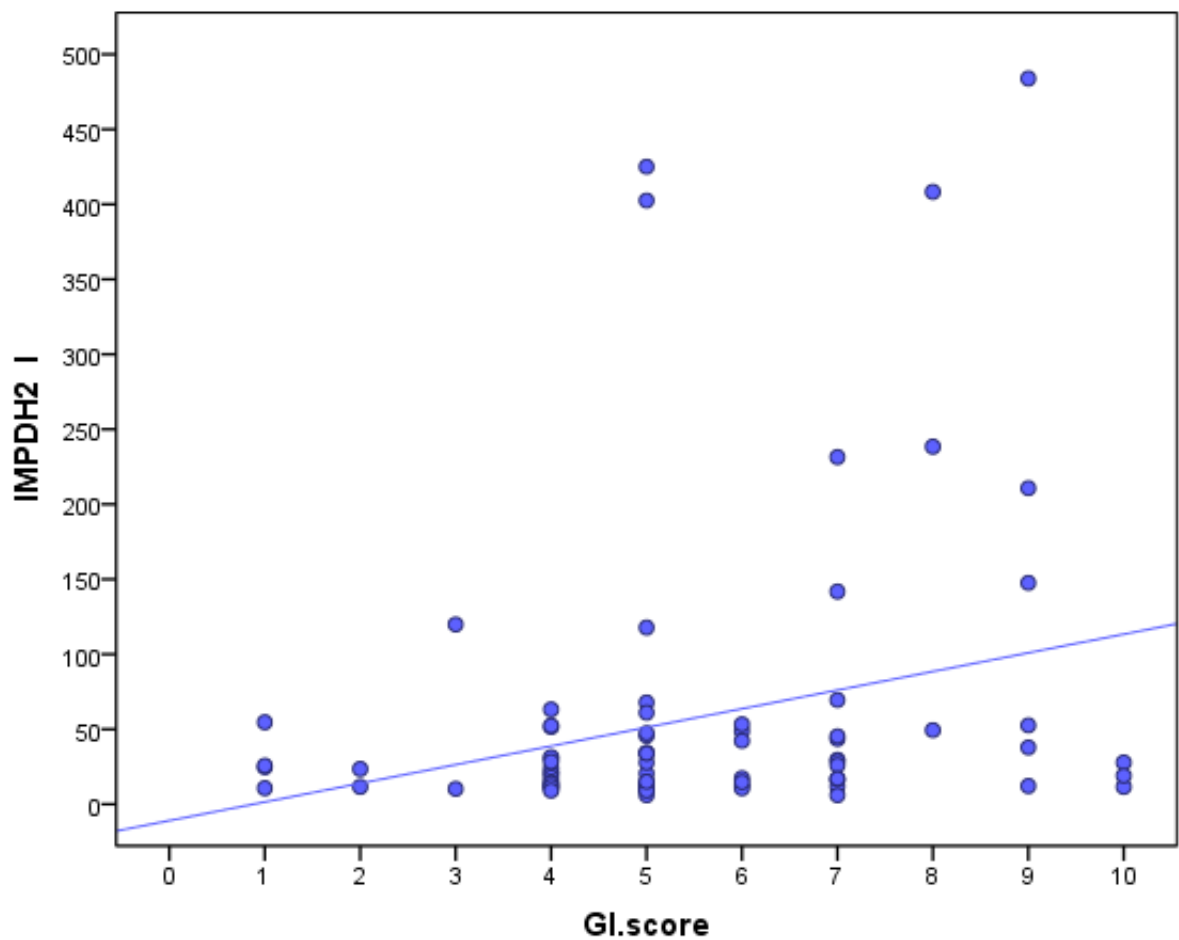
Gleason Score	Gl.score_rec
Gleason 4=3+3	1
Gleason 5=2+3	2
Gleason 5=3+2	3
Gleason 6=3+3	4
Gleason 7=3+4	5
Gleason 7=4+3	6
Gleason 8=4+4	7
Gleason 9=4+5	8
Gleason 9=5+4	9
Gleason 10=5+5	10

Wartości skali Gleasona zostały uszeregowane wg stopnia złośliwości nowotworu. Wykorzystując nowo utworzoną zmienną (Gl. score_rec) wykonano analizę korelacji monotonicznej tau Kendalla dla zmiennych nieparametrycznych. W jej wyniku stwierdzono u badanych słabą dodatnią korelację pomiędzy złośliwością nowotworu wyrażoną w skali Gleasona a poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II ($\bar{\tau}=0,175$, $p < 0,05$). Wskazuje to na niewielką (nieznaczną) tendencję do współzmienności, w której wyższym wartościom IMPDH2 towarzyszą wyższe poziomy skali Gleasona.

Korelacje

			IMPDH2 I	Gl.score_rec
Tau b Kendalla	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	1,000	,175*
		Istotność (dwustronna)	.	,028
		N	108	84
	Gl.score_rec	Współczynnik korelacji	,175*	1,000
		Istotność (dwustronna)	,028	.
		N	84	84

*. Korelacja istotna na poziomie 0.05 (dwustronnie).



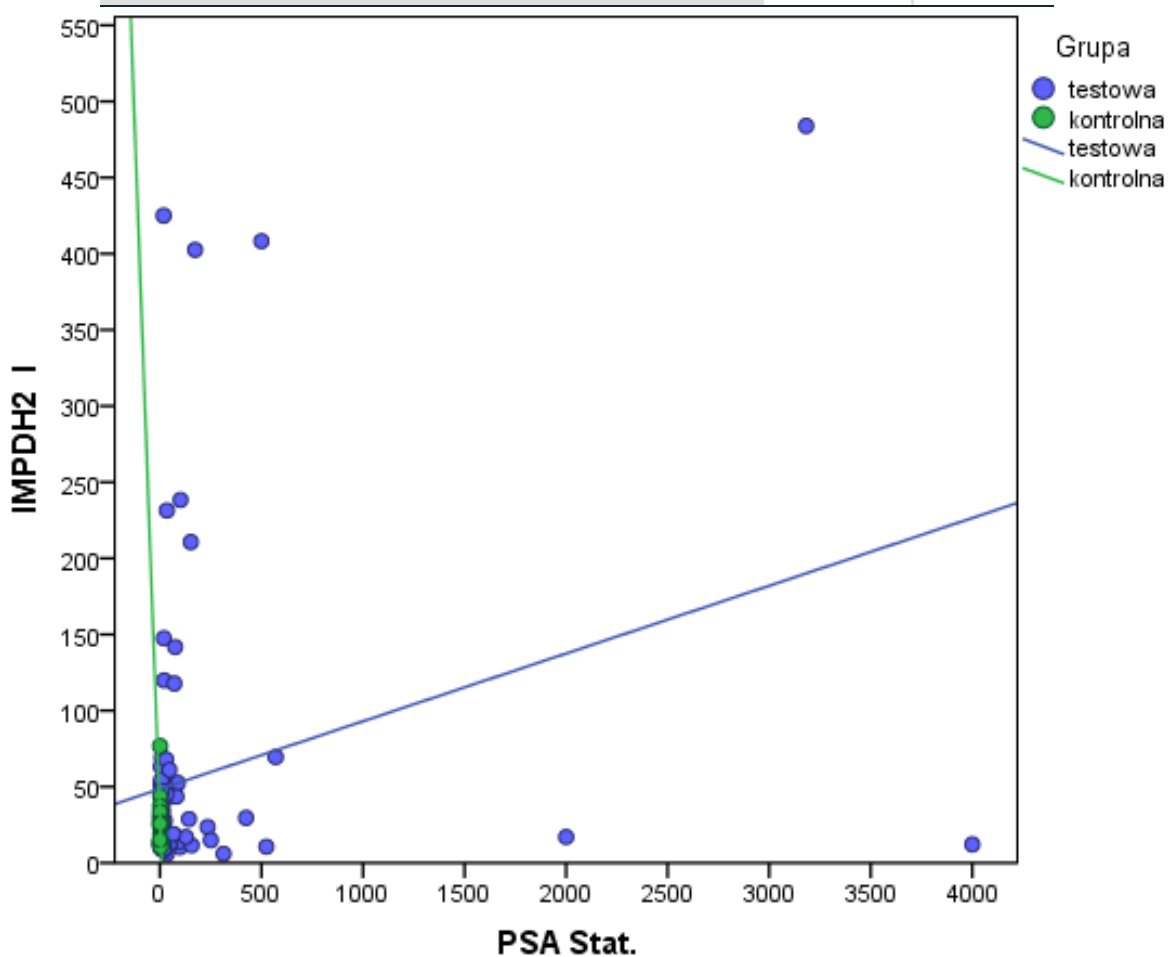
Wykres 24. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od skali Gleasona w grupie badanej.

Hipoteza 5. Obecność związku pomiędzy poziomem IMPDH2 a poziomem PSA.

Wykonano analizę korelacji rhoSpearmana, u wszystkich badanych, która nie wykazała istnienia istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II a poziomem PSA ($r = 0,175$, $p > 0,05$).

Korelacje

			IMPDH2 I	PSA Stat.
rhoSpearmana	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	1,000	,135
		Istotność (dwustronna)	.	,165
		N	108	108
	PSA Stat.	Współczynnik korelacji	,135	1,000
		Istotność (dwustronna)	,165	.
		N	108	108



Wykres 25. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od wartości PSA (ng/ml) w obu grupach.

Tą samą analizę wykonano odrębnie dla grupy testowej i grupy kontrolnej. Ponownie nie wykazano istnienia istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II a poziomem PSA, ani u badanych z grupy testowej ($r = 0,166$, $p > 0,05$), ani u badanych z grupy kontrolnej ($r = -0,315$, $p > 0,05$). Istnieją przesłanki by przewidywać możliwość wystąpienia ujemnego związku między zmiennymi w grupie kontrolnej, jednak liczebność grupy jest zbyt mała, by potwierdzić jego istnienie.

Tabela 22. Zależności poziomu IMPDH2 (pg/ml) od wartości PSA (ng/ml) w grupie badanej.

Korelacje^a

			IMPDH2 I	PSA Stat.
rhoSpearmana	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	1,000	,166
		Istotność (dwustronna)	.	,121
		N	88	88
	PSA Stat.	Współczynnik korelacji	,166	1,000
		Istotność (dwustronna)	,121	.
		N	88	88

a. Grupa testowa

Tabela 23. Tabela zależności poziomu IMPDH2 (pg/ml) od wartości PSA (ng/ml) w grupie kontrolnej.

Korelacje^a

			IMPDH2 I	PSA Stat.
rhoSpearmana	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	1,000	-,315
		Istotność (dwustronna)	.	,176
		N	20	20
	PSA Stat.	Współczynnik korelacji	-,315	1,000
		Istotność (dwustronna)	,176	.
		N	20	20

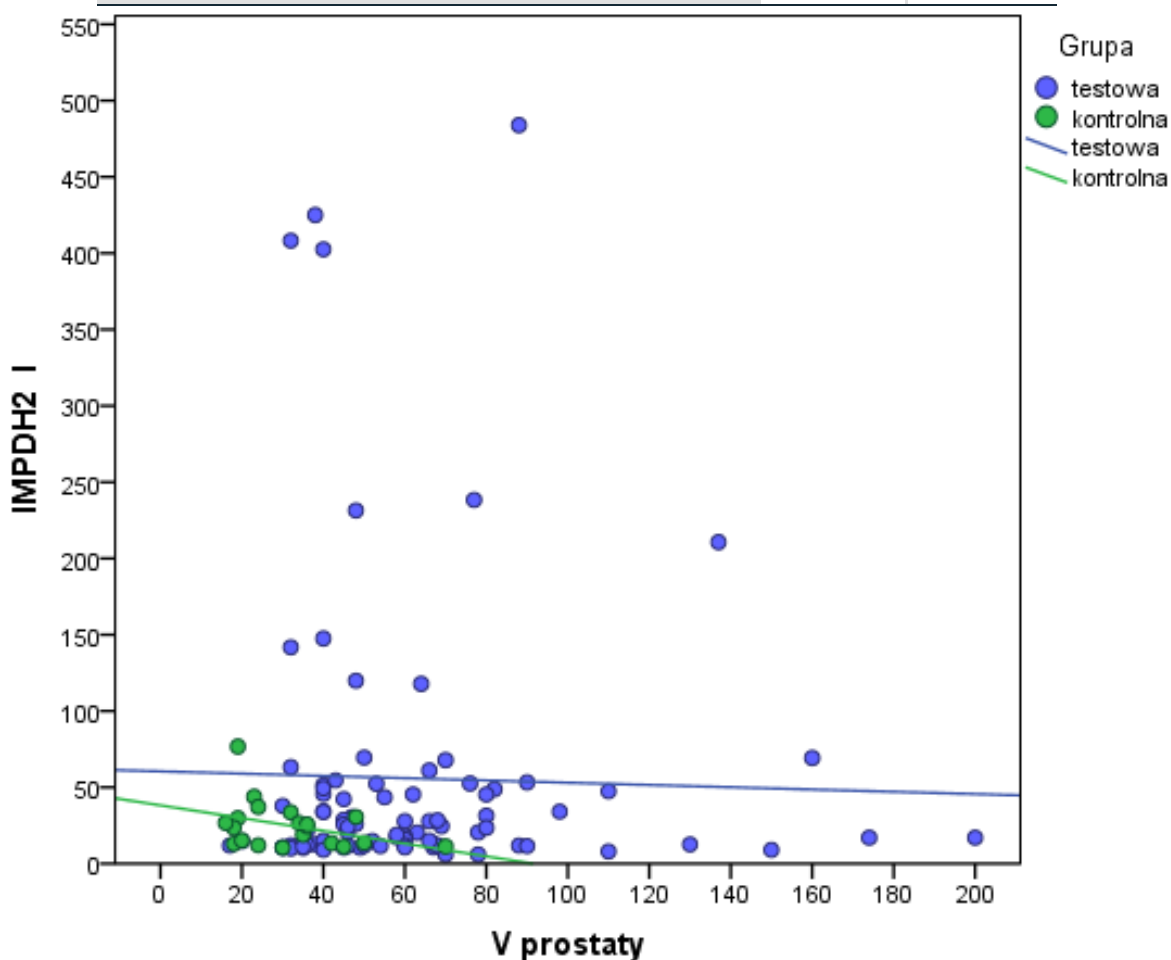
Grupa kontrolna

Hipoteza 6. Rozmiar prostaty koreluje z poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II.

Wykonano analizę korelacji rhoSpearmana, u wszystkich badanych, która nie wykazała istnienia istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem IMPDH2 a rozmiarem prostaty ($r = 0,040$, $p > 0,05$).

Korelacje

			V prostaty	IMPDH2 I
rho Spearmana	V prostaty	Współczynnik korelacji	1,000	,040
		Istotność (dwustronna)	.	,682
		N	108	108
	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	,040	1,000
		Istotność (dwustronna)	,682	.
		N	108	108



Wykres 26. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od objętości prostaty (ml) w obu grupach.

Tą samą analizę wykonano odrębnie dla grupy testowej i grupy kontrolnej. Ponownie nie wykazano istnienia istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II a rozmiarem prostaty, ani u badanych z grupy testowej ($r = 0,056$, $p > 0,05$), ani u badanych z grupy kontrolnej ($r = -0,313$, $p > 0,05$). Istnieją przesłanki by przewidywać możliwość wystąpienia ujemnego związku między zmiennymi w grupie kontrolnej, jednak liczebność grupy jest zbyt mała, by potwierdzić jego istnienie.

Tabela 24. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od objętości prostaty (ml) w grupie badanej.

Korelacje^a

			V prostaty	IMPDH2 I
rhoSpearmana	V prostaty	Współczynnik korelacji	1,000	,056
		Istotność (dwustronna)	.	,602
		N	88	88
	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	,056	1,000
		Istotność (dwustronna)	,602	.
		N	88	88

a. Grupa testowa

Tabela 25. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od objętości prostaty (ml) w grupie kontrolnej.

Korelacje^a

			V prostaty	IMPDH2 I
rhoSpearmana	V prostaty	Współczynnik korelacji	1,000	-,313
		Istotność (dwustronna)	.	,179
		N	20	20
	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	-,313	1,000
		Istotność (dwustronna)	,179	.
		N	20	20

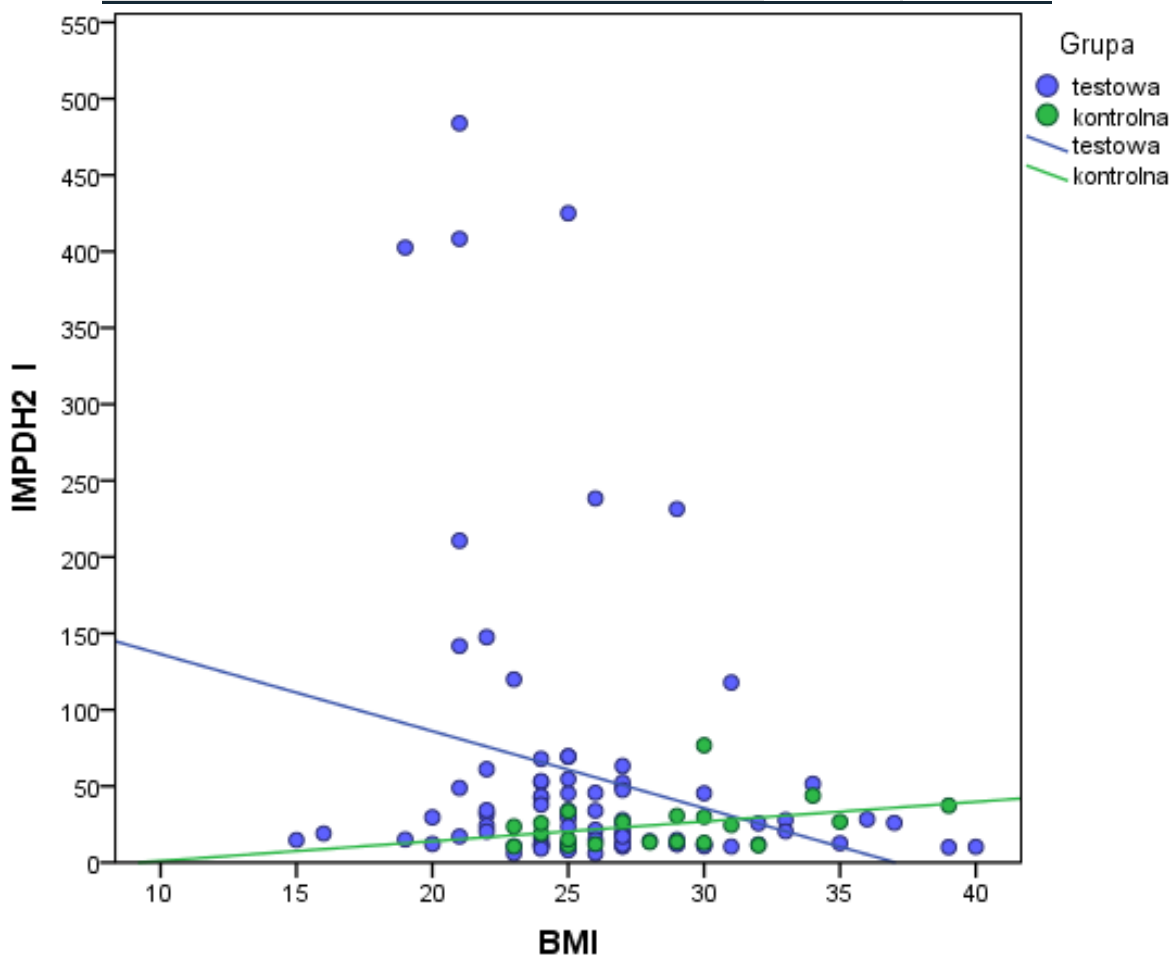
a. Grupa kontrolna

Hipoteza 7. Poziom IMPDH2 ma związek z rozmiarem otyłości, wyrażonym przy pomocy wskaźnika Body Mass Index (BMI).

Wykonano analizę korelacji rhoSpearmana, u wszystkich badanych, która nie wykazała istnienia istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II a poziomem BMI ($r = -0,172$, $p > 0,05$).

Korelacje

			BMI	IMPDH2 I
rhoSpearmana	BMI	Współczynnik korelacji	1,000	-,172
		Istotność (dwustronna)	.	,075
		N	108	108
	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	-,172	1,000
		Istotność (dwustronna)	,075	.
		N	108	108



Wykres 27. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od wartości BMI (kg/m²) w obu grupach.

Tą samą analizę wykonano odrębnie dla grupy testowej i grupy kontrolnej. W grupie kontrolnej ponownie nie wykazano istnienia istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II a poziomem BMI ($r = 0,409$, $p > 0,05$). W grupie testowej stwierdzono słabą ujemną korelację pomiędzy poziomem IMPDH2 a poziomem BMI ($r = -0,243$, $p < 0,05$).

Tabela 26. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od BMI (kg/m²) w grupie badanej.

Korelacje^a

			BMI	IMPDH2 I
rhoSpearmana	BMI	Współczynnik korelacji	1,000	-,243*
		Istotność (dwustronna)	.	,023
		N	88	88
	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	-,243*	1,000
		Istotność (dwustronna)	,023	.
		N	88	88

*. Korelacja istotna na poziomie 0.05 (dwustronnie).

a. Grupa testowa

Tabela 27. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od BMI (kg/m²) w grupie kontrolnej.

Korelacje^a

			BMI	IMPDH2 I
rhoSpearmana	BMI	Współczynnik korelacji	1,000	,409
		Istotność (dwustronna)	.	,074
		N	20	20
	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	,409	1,000
		Istotność (dwustronna)	,074	.
		N	20	20

a. Grupa kontrolna

Słabą ujemną korelację pomiędzy poziomem IMPDH2 a poziomem BMI w grupie testowej można tłumaczyć faktem stanowiącym, że ludzie z chorobą nowotworową ulegają kacheksji. Osiągają wtedy znacznie niższe poziomy BMI niż populacja ogólna. Tymczasem wartości Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II korelują ze skalą Gleasona, są tym wyższe im bardziej złośliwy histopatologicznie nowotwór stwierdzamy (wykazano powyżej). Łącząc oba stwierdzenia można przyjąć tezę, że chorzy z bardziej złośliwym nowotworem (wysoki Gl. score, wysokie IMPDH2), mają większe ryzyko wystąpienia kacheksji (niskie BMI).

Aby umocnić przyjęte założenie w moich grupach badanych postanowiłem sprawdzić bezpośrednio związek skali Gleasona z BMI.

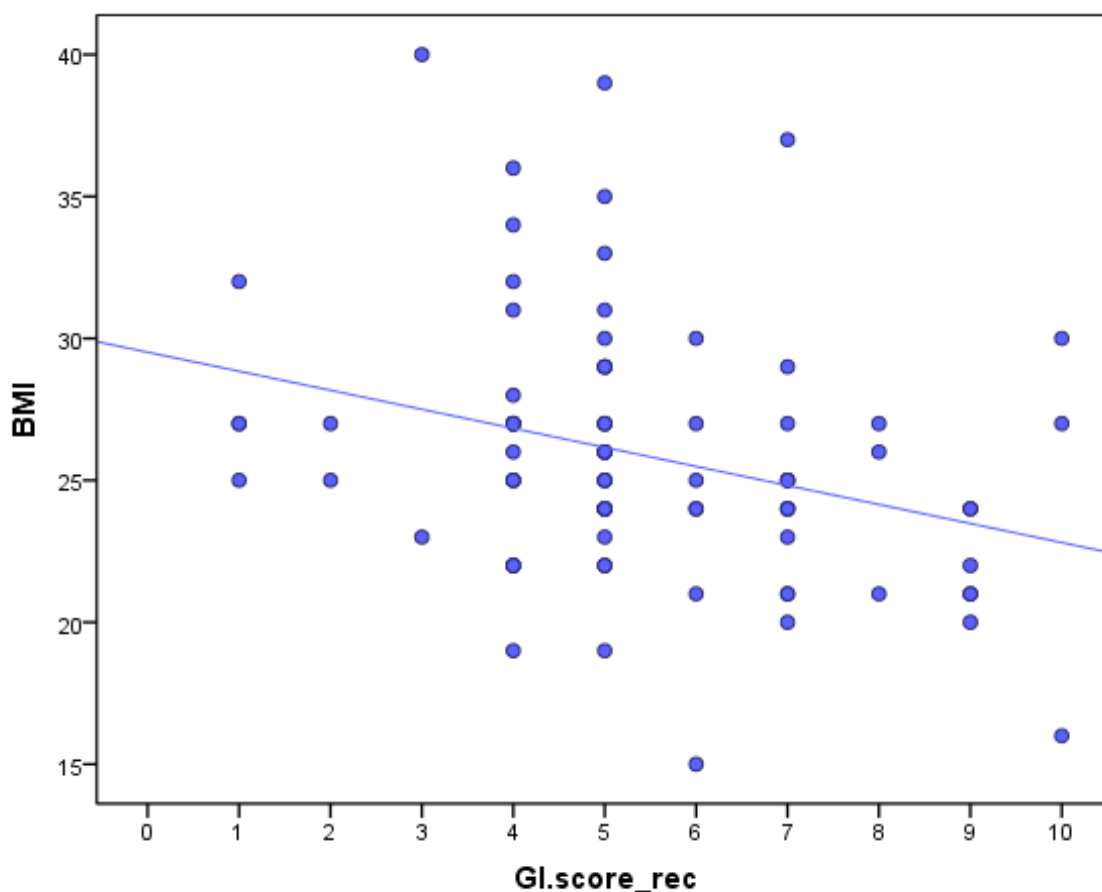
Wartości skali Gleasona zostały uszeregowane wg stopnia złośliwości nowotworu. Wykorzystując nowo utworzoną zmienną (Gl. score_rec) wykonano analizę korelacji monotonicznej tau Kendalla dla zmiennych nieparametrycznych. W jej wyniku stwierdzono u badanych słaby ujemny związek pomiędzy złośliwością nowotworu w skali Gleasona

a poziomem BMI ($\bar{r}=-0,254$, $p < 0,01$). Wskazuje to na niewielką (nieznaczną) tendencję do współzmienności, w której wyższym wartościom skali Gleasona towarzyszą niższe poziomy BMI.

Korelacje

		Gl.score_rec	BMI
Tau b Kendalla	Gl.score_rec	Współczynnik korelacji	1,000
		Istotność (dwustronna)	.
		N	84
	BMI	Współczynnik korelacji	-,254**
		Istotność (dwustronna)	,002
		N	108

**, Korelacja istotna na poziomie 0.01 (dwustronnie).



Wykres 28. Zależność poziomu BMI (kg/m^2) od wartości skali Gleasona w obu grupach.

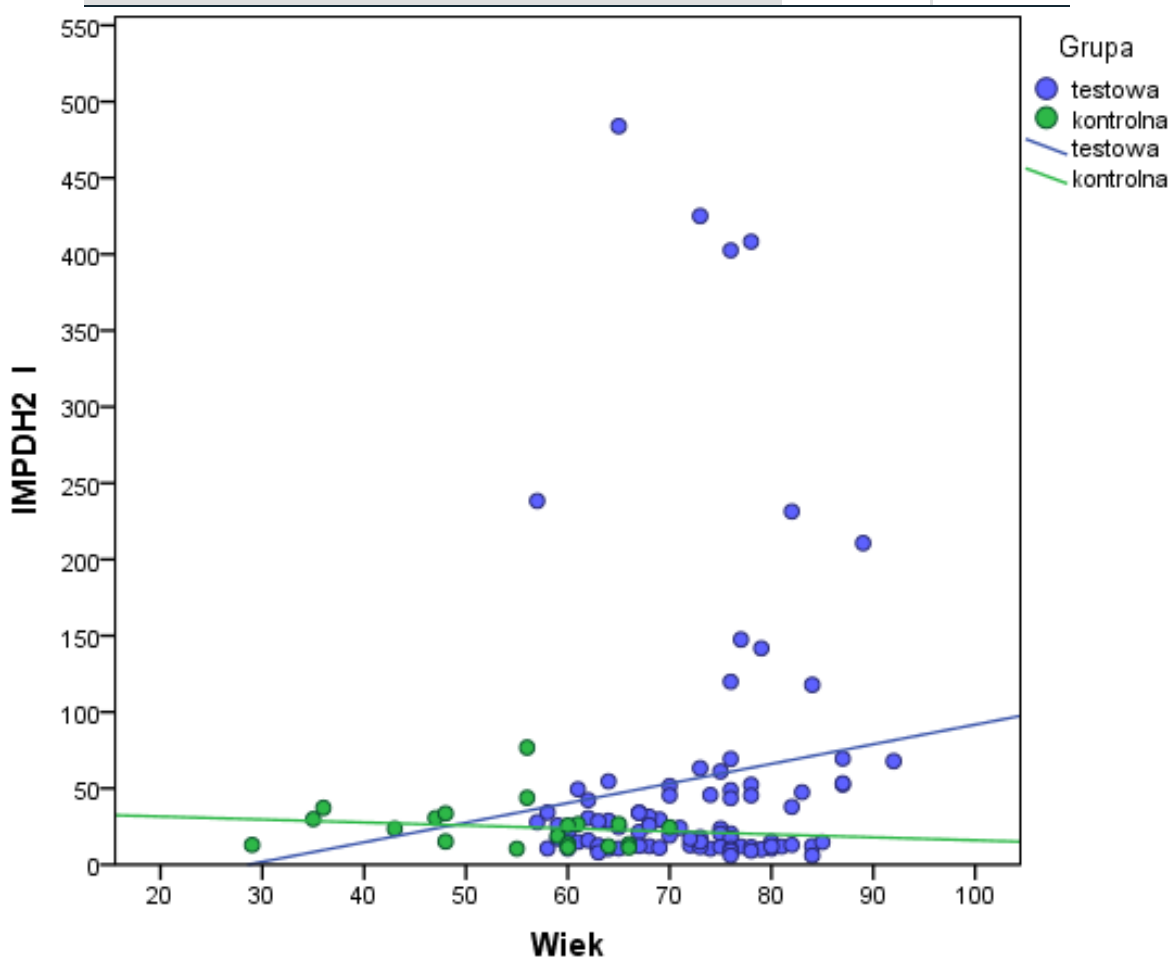
Wynika z tego, że przyjęte założenie jest słuszne. Wpływ Body Mass Index na poziom IMPDH2 może pogarszać jego swoistość jako biomarkera. Na szczęście zachodzi on jedynie w grupie testowej i daje się wytłumaczyć powyższymi rozważaniami.

Hipoteza 8. Wiek pacjenta ma wpływ na poziom Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II.

Wykonano analizę korelacji rhoSpearmana, która nie wykazała istnienia istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem IMPDH2 a wiekiem u wszystkich badanych ($r = 0,104$, $p > 0,05$).

Korelacje

			IMPDH2 I	Wiek
rhoSpearmana	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	1,000	,104
		Istotność (dwustronna)	.	,286
		N	108	108
	Wiek	Współczynnik korelacji	,104	1,000
		Istotność (dwustronna)	,286	.
		N	108	108



Wykres 29. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od wieku chorych (lata) w obu grupach.

Tą samą analizę wykonano odrębnie dla grupy testowej i grupy kontrolnej. Ponownie nie wykazano istnienia istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II a wiekiem, ani w grupie testowej ($r = 0,133$, $p > 0,05$), ani w grupie kontrolnej ($r = -0,311$, $p > 0,05$).

Tabela 28. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od wieku (lata) chorych w grupie badanej.

Korelacje^a

			IMPDH2 I	Wiek
rhoSpearmana	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	1,000	,133
		Istotność (dwustronna)	.	,218
		N	88	88
	Wiek	Współczynnik korelacji	,133	1,000
		Istotność (dwustronna)	,218	.
		N	88	88

a. Grupa testowa

Tabela 29. Zależność poziomu IMPDH2 (pg/ml) od wieku chorych (lata) w grupie kontrolnej.

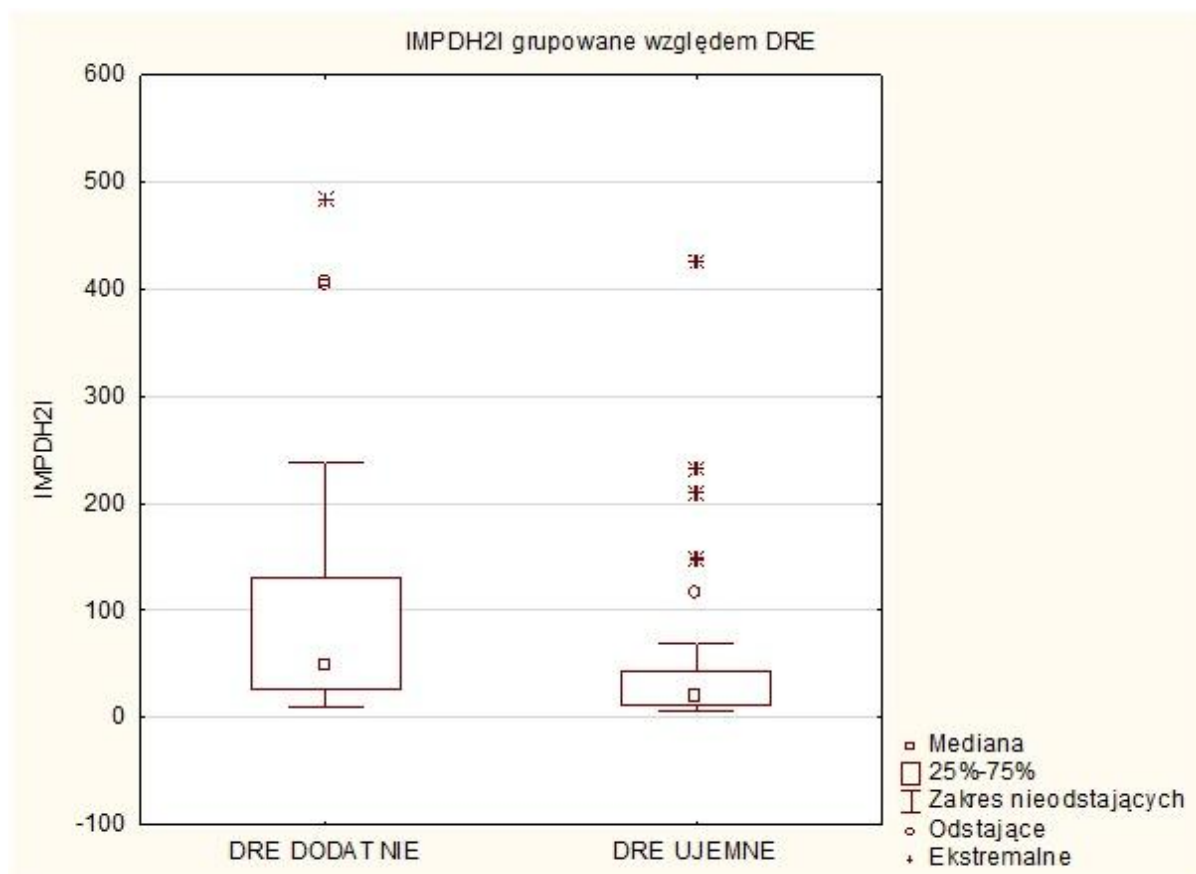
Korelacje^a

			IMPDH2 I	Wiek
rhoSpearmana	IMPDH2 I	Współczynnik korelacji	1,000	-,311
		Istotność (dwustronna)	.	,182
		N	20	20
	Wiek	Współczynnik korelacji	-,311	1,000
		Istotność (dwustronna)	,182	.
		N	20	20

a. Grupa kontrolna

Hipoteza 9. Poziom IMPDH2 koreluje z wynikiem badania DRE.

Do porównania wartości IMPDH2 w grupie osób z dodatnim i ujemnym wynikiem badania DRE wykorzystano test U Manna-Whitneya. Uzyskany wynik ($U = 371,5$, $p < 0,01$) potwierdza istnienie statystycznie istotnej różnicy poziomu Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II pomiędzy dwoma grupami pacjentów. Wartości IMPDH2 w grupie pacjentów z dodatnim DRE są wyższe.



N ogółem	88
Statystyka testu	371,500
Błąd standardowy	100,426
Standaryzowana statystyka testu	-3,072
Istotność asymptotyczna (test dwustronny)	,002

Wykres 30. Związek poziomów IMPDH2 (pg/ml) z wynikiem badania DRE w grupie badanej.

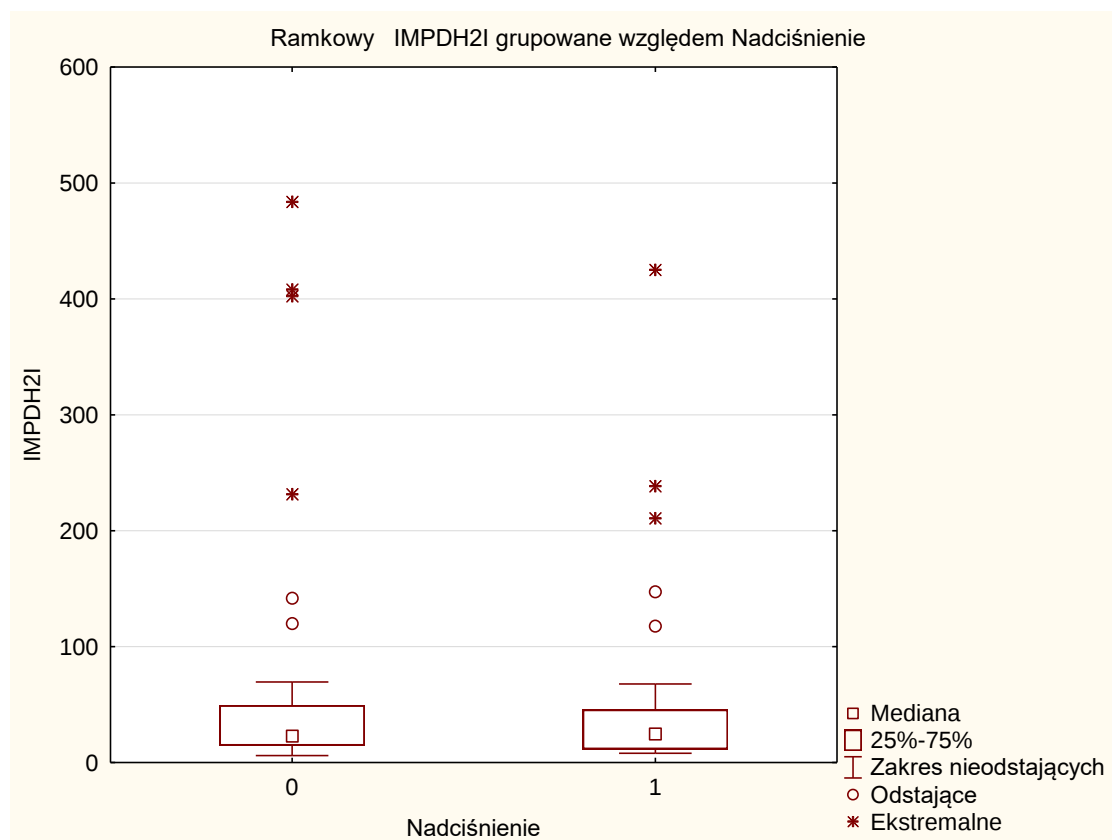
Hipoteza 10. Występujące często choroby podstawowe wywierają wpływ na poziom Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II.

Tabela 30. Wpływ najczęściej występujących schorzeń na poziomy IMPDH2 (pg/ml) w grupie badanej.

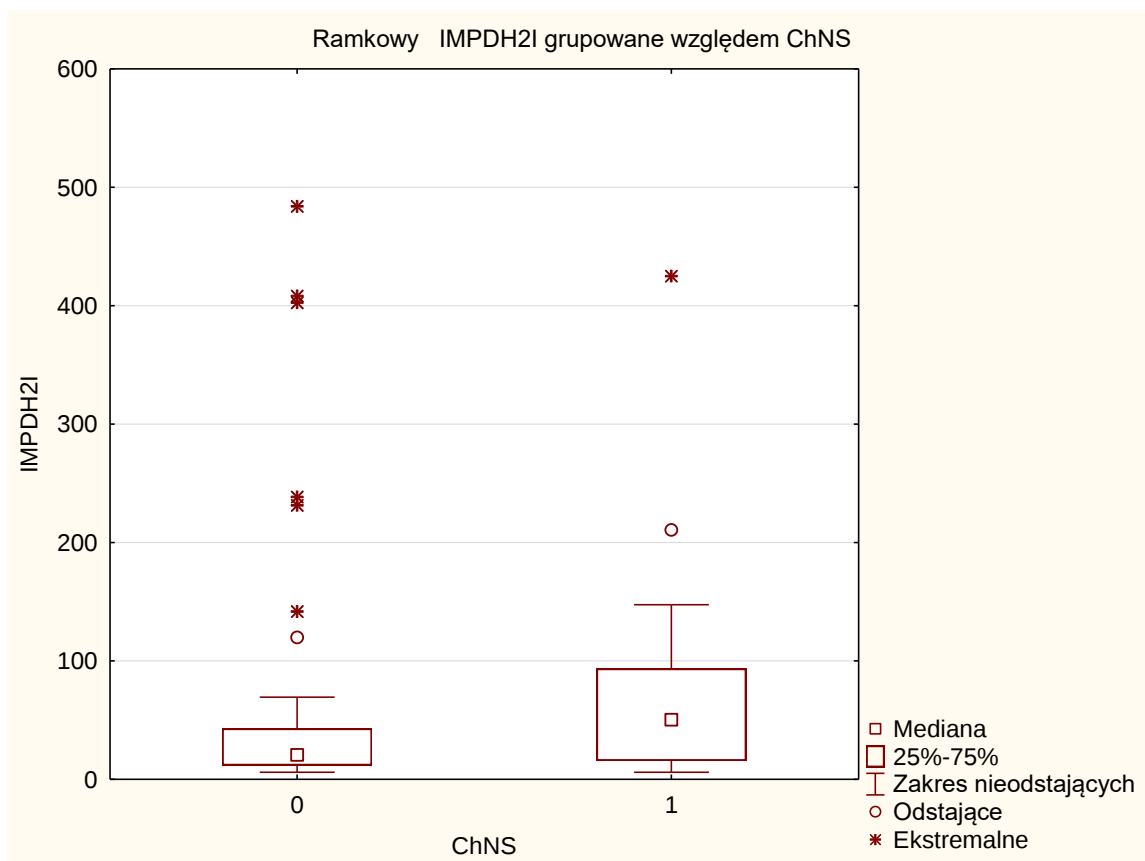
Choroba	Statystyka testu	Błąd standardowy	Standaryzowana statystyka testu	Istotność asymptotyczna (test dwustronny)	Wynik	Wniosek
Nadciśnienie tętnicze	U = 852	118,700	z = -0,826	0,409	P > 0,05	Brak istotnych statystycznie różnic między grupami
Choroba niedokrwienna serca	U = 373,5	92,428	z = -2,191	0,028	P < 0,05	Istnieje istotna statystycznie różnica między grupami
Cukrzyca	U = 434,5	100,426	z = -2,445	0,015	P < 0,05	Istnieje istotna statystycznie różnica między grupami
Arytmia	U = 433,5	87,651	z = -0,964	0,335	P > 0,05	Brak istotnych statystycznie różnic między grupami
Kamica układu moczowego	U = 261	72,612	z = -1,301	0,193	P > 0,05	Brak istotnych statystycznie różnic między grupami

Do porównania poziomu IMPDH2 u badanych, u których zdiagnozowano występowanie innych chorób wykorzystano serię testów U Manna-Whitney'a. Wykazano istnienie istotnych statystycznie różnic poziomów IMPDH2 pomiędzy pacjentami chorującymi na cukrzycę i wolnymi od niej (U = 434,5, p < 0,05) oraz pomiędzy pacjentami cierpiącymi na chorobę niedokrwienną serca (ChNS) a, nie mającymi problemów w obrębie krążenia wieńcowego (U = 373,5, p < 0,05). Nie wykazano takich różnic pomiędzy pacjentami chorującymi i niechorującymi na nadciśnienie tętnicze (U = 853, p > 0,05), pomiędzy pacjentami normo-

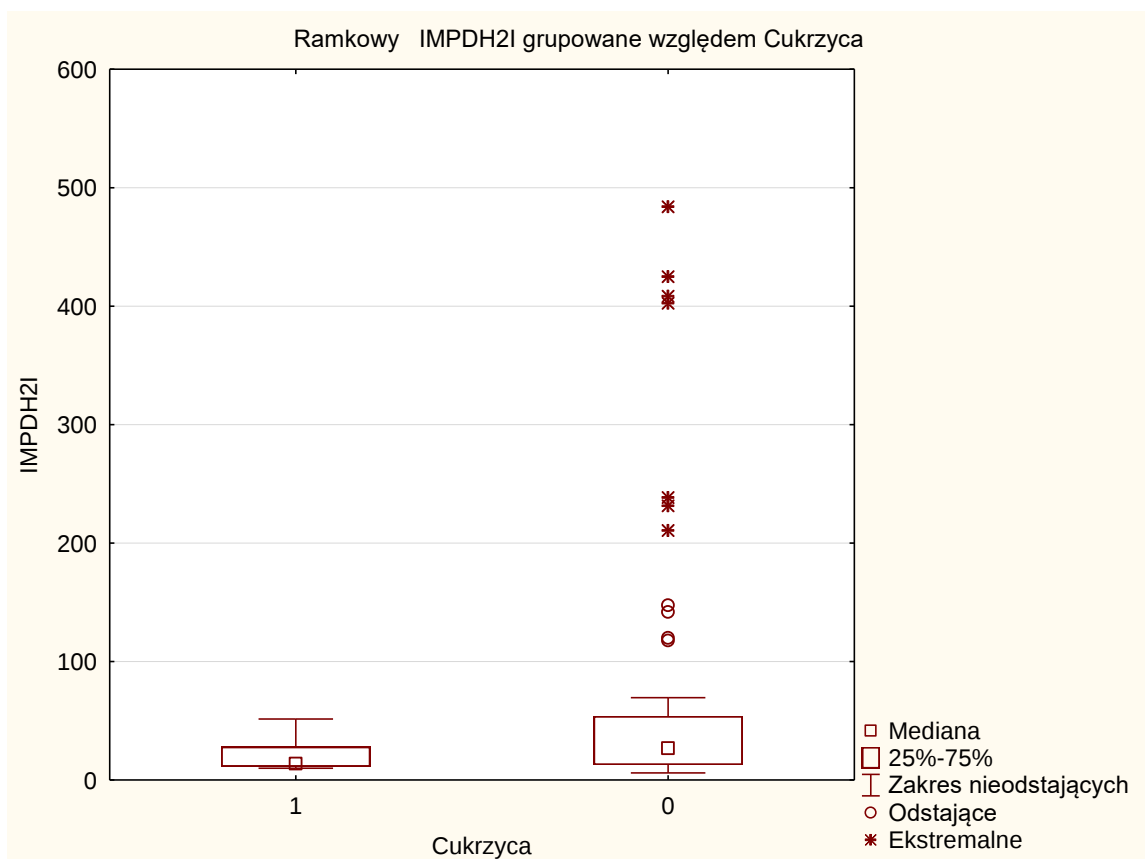
i arytmicznymi ($U = 433,5$, $p > 0,05$), ani pomiędzy pacjentami z kamica, a chorymi bez złogów w układzie moczowym ($U = 261$, $p > 0,05$).



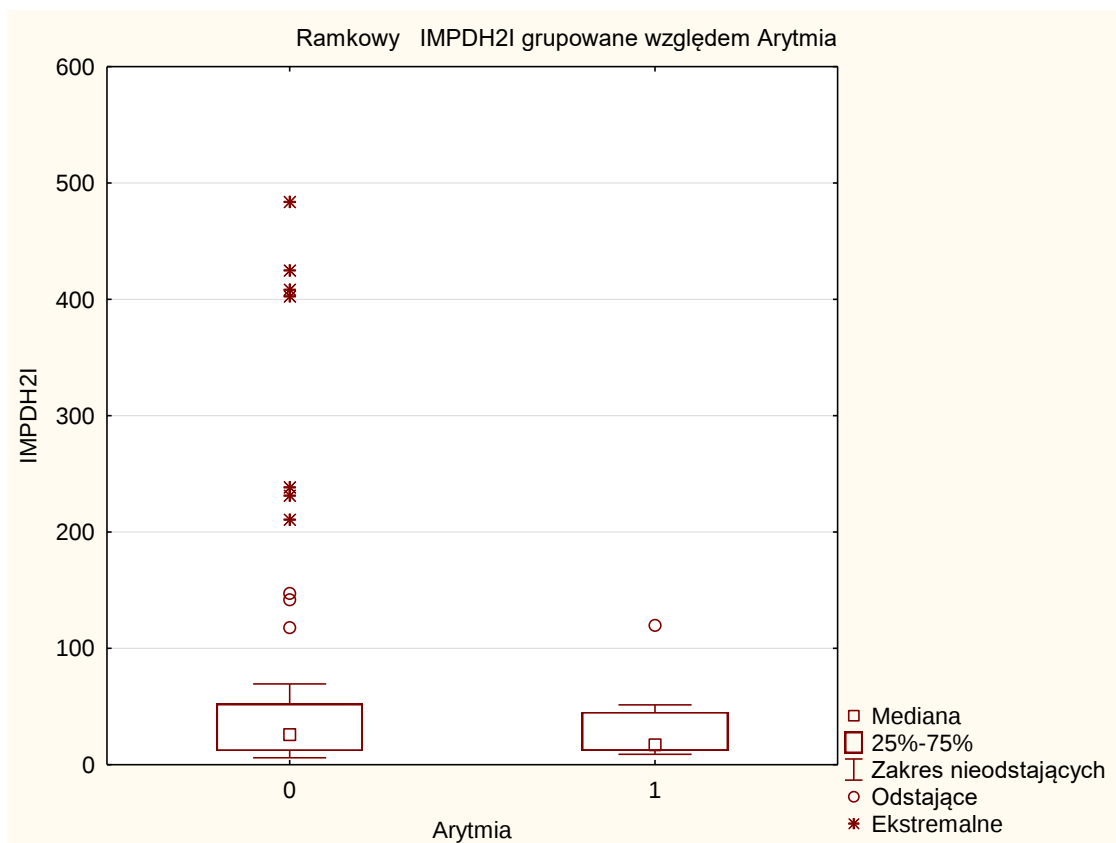
Wykres 31. Poziomy IMPDH2 (pg/ml) w grupie badanej u osób z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych.



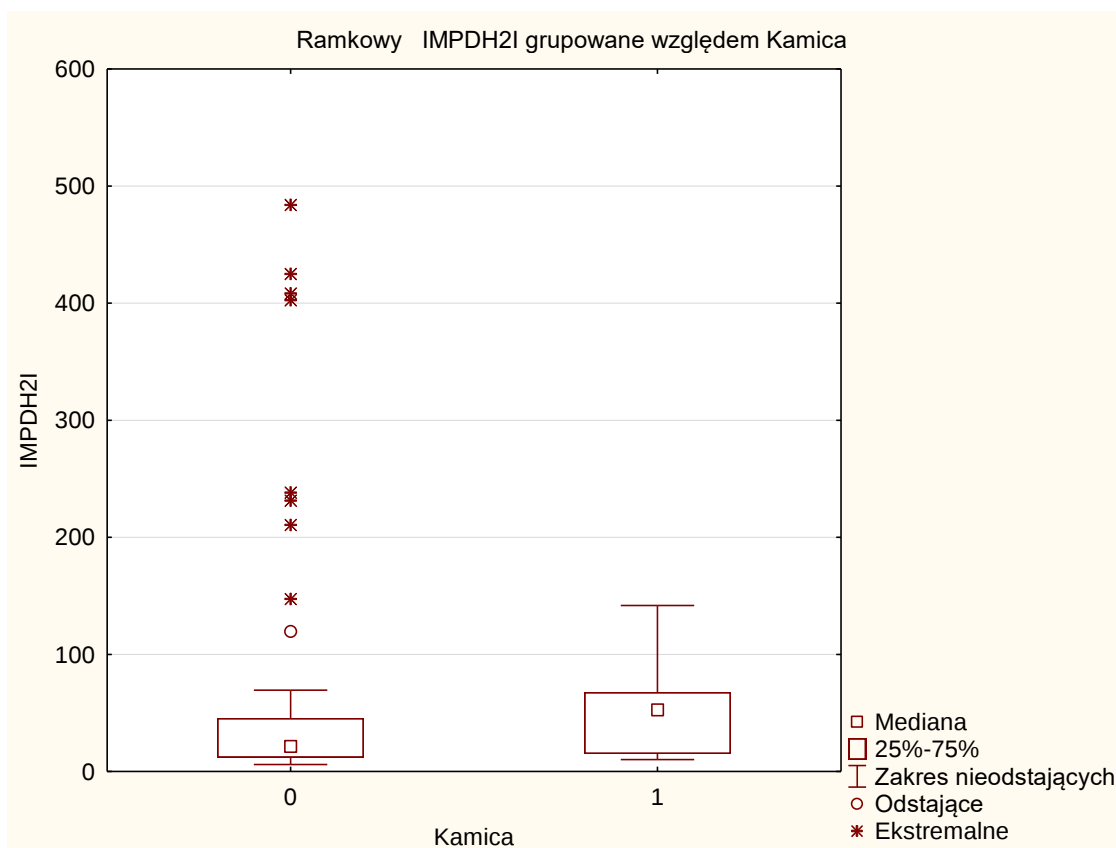
Wykres 32. Poziomy IMPDH2 w grupie badanej u osób z chorobą niedokrwienną serca i zdrowych.



Wykres 33. Poziomy IMPDH2 (pg/ml) w grupie badanej u osób z cukrzycą i zdrowych.



Wykres 34. Poziomy IMPDH2 (pg/ml) w grupie badanej u osób cierpiących na arytmie i zdrowych.

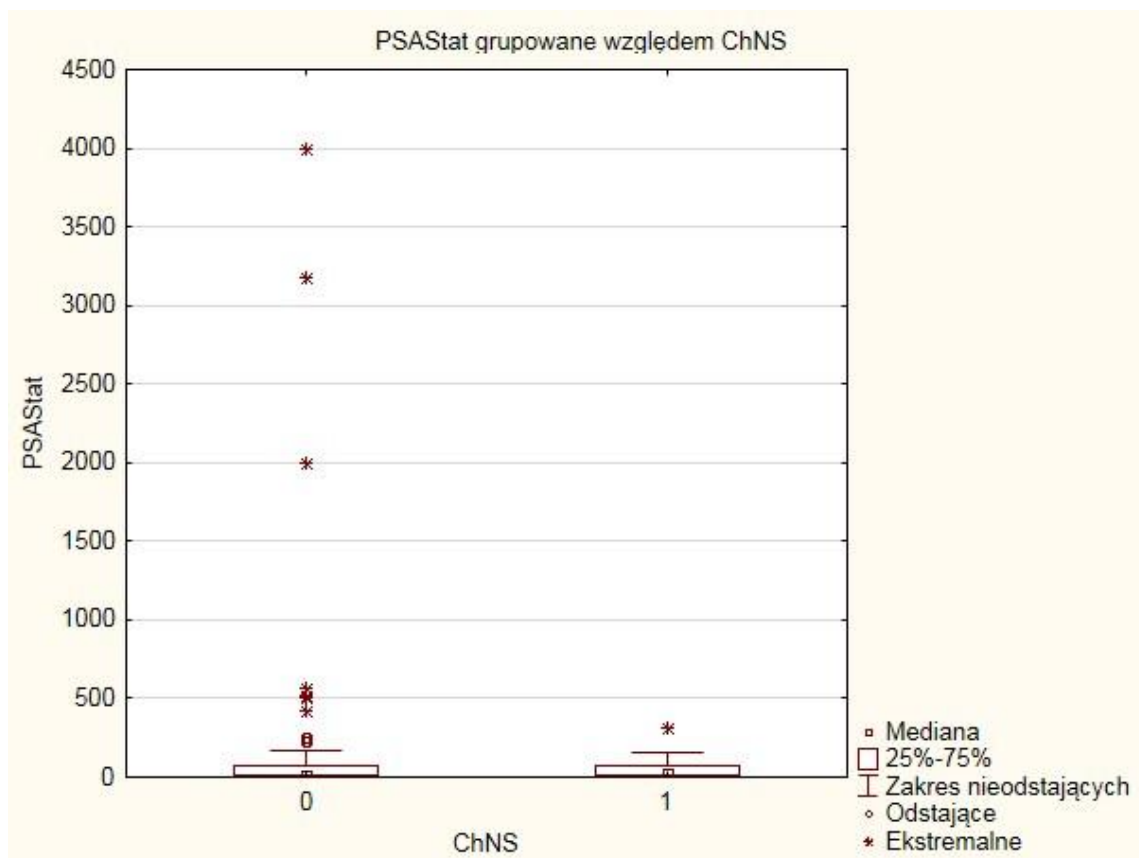


Wykres 35. Poziomy IMPDH2 (pg/ml) w grupie badanej u osób z kamicą układu moczowego oraz zdrowych.

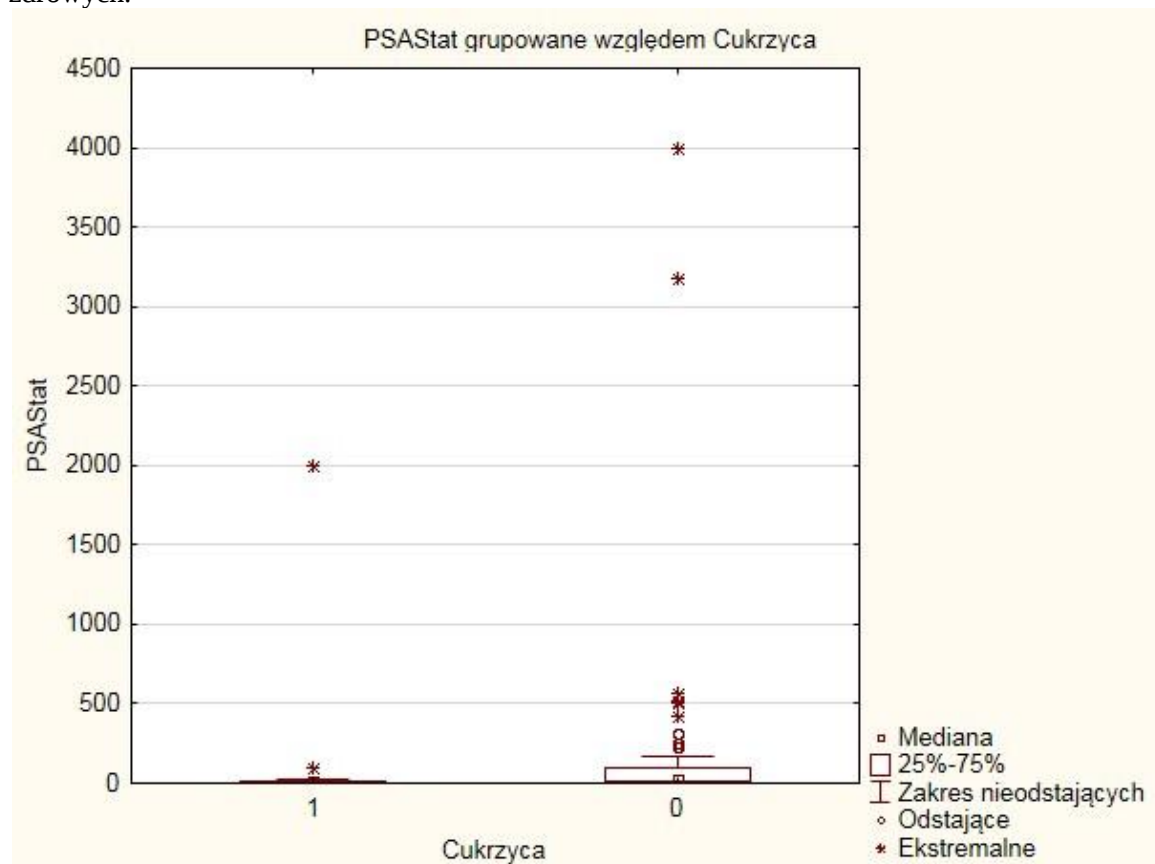
Ze względu na wykazany wpływ cukrzycy i choroby niedokrwiennej serca na poziomy IMPDH2 postanowiono sprawdzić tą zależność także dla wzorcowego markera raka prostaty - PSA.

Tabela 31. Wpływ cukrzycy oraz choroby niedokrwiennej serca na poziom PSA (ng/ml) w grupie badanej.

Choroba	Statystyka testu	Błąd standardowy	Standaryzowana statystyka testu	Istotność asymptotyczna (test dwustronny)	Wynik	Wniosek
Choroba niedokrwienna serca	U = 547,5	92,349	z = -0,309	0,758	P > 0,05	Brak istotnych statystycznie różnic między grupami
Cukrzyca	U = 369	100,341	z = -3,099	0,02	P < 0,05	Istnieje istotna statystycznie różnica między grupami



Wykres 36. Poziomy PSA (ng/ml) w grupie badanej u osób z chorobą niedokrwienną serca oraz osób zdrowych.



Wykres 37. Poziomy PSA (ng/ml) w grupie badanej u osób chorych na cukrzycę oraz osób zdrowych.

Hipoteza 11. Stosowanie popularnych używek ma wpływ na poziom IMPDH2.

Do porównania poziomu Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II u badanych korzystających przewlekłe, bądź nie nadużywających żadnych z najpopularniejszych używek, wykorzystano serię testów U Manna-Whitneya. Nie wykazano istnienia istotnych statystycznie różnic poziomów IMPDH2 pomiędzy pacjentami spożywającymi i niespożywającymi alkoholu ($U = 714,5$, $p > 0,05$), ani pomiędzy palaczami i niepalącymi ($U = 533,5$, $p > 0,05$).

Wartość testowana^a

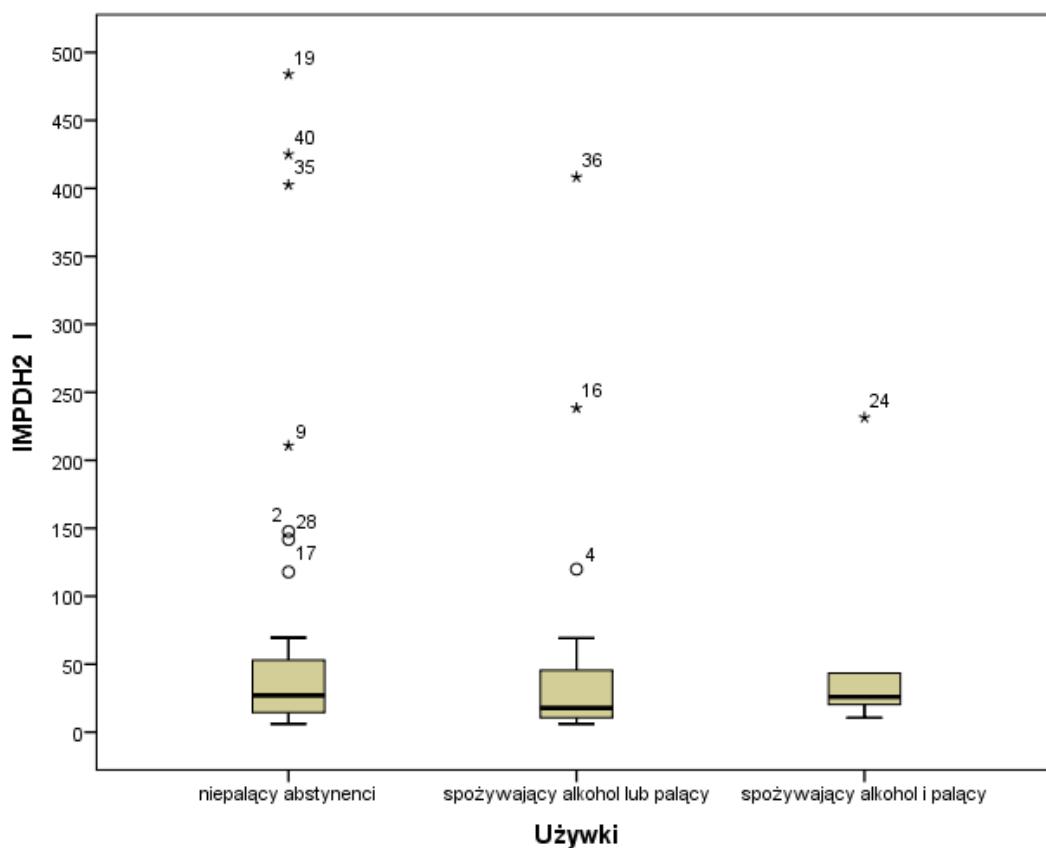
	IMPDH2 I
N ogółem	88
Statystyka testu	714,500
U Manna-Whitneya	
Standaryzowana statystyka testu	-1,369
Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,171

a. Zmienna grupująca: Palenie

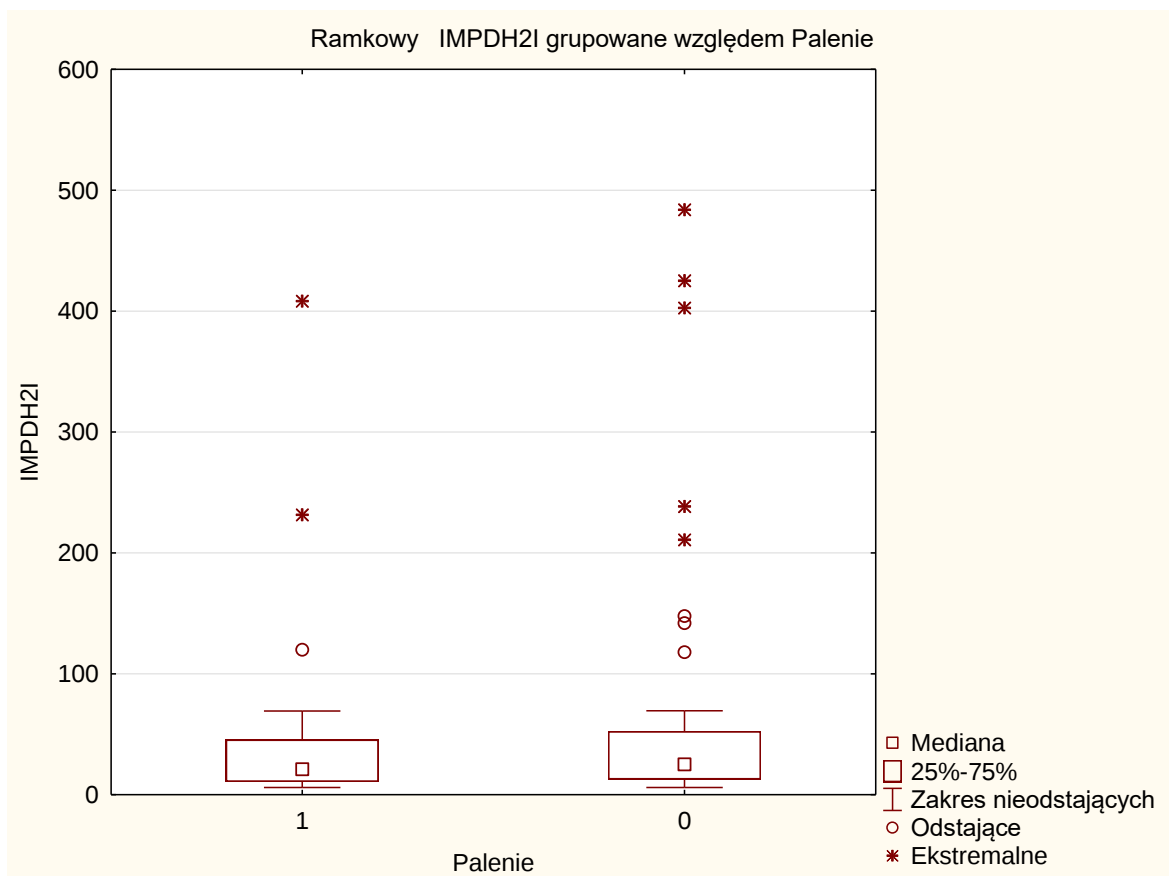
Wartość testowana^a

	IMPDH2 I
N ogółem	88
Statystyka testu	533,500
U Manna-Whitneya	
Standaryzowana statystyka testu	-,155
Istotność asymptotyczna (dwustronna)	,877

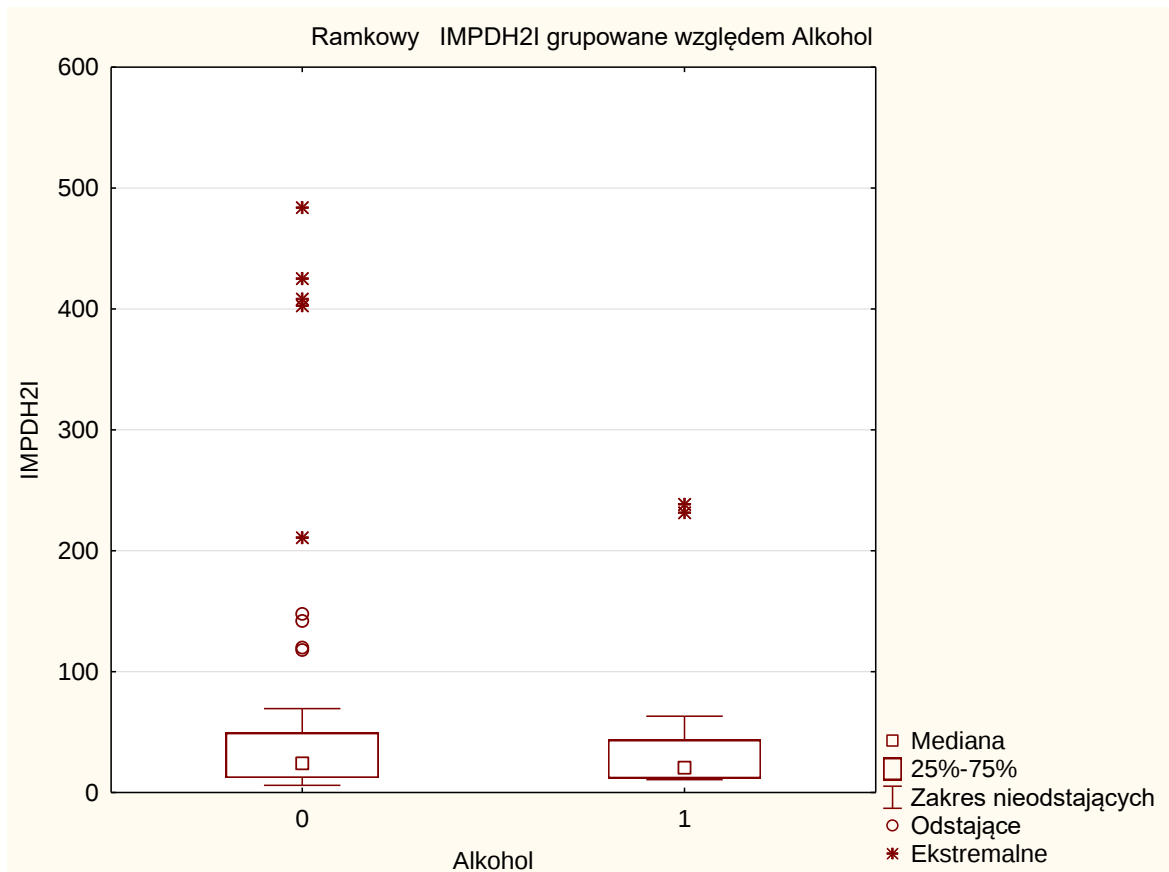
a. Zmienna grupująca: Alkohol



Wykres 38. Wpływ popularnie stosowanych używek na stężenie IMPDH2 (pg/ml) w grupie badanej.



Wykres 39. Poziomy IMPDH2 pg/ml w grupie badanej u osób palących i niepalących tytoniu.



Wykres 40. Poziomy IMPDH2 pg/ml w grupie badanej u osób pijących i nie spożywających alkoholu.

5. Dyskusja

Od blisko 30 lat PSA spoczywa na tronie głównego markera w diagnostyce raka prostaty. Będąc badaniem nisko specyficznym w wykrywaniu nowotworu, swoją pozycję osiągnęło prezentując wysoką czułość, łatwość oznaczenia, powszechną dostępność i niski koszt wykonania. Jednakże to właśnie jego tendencja do prezentowania nadmiaru wyników fałszywie dodatnich każe nam kontynuować poszukiwania nowych związków mogących mieć zastosowanie w diagnostyce raka stercza. W swojej pracy zaproponowałem taki związek i mając na uwadze jego nieuniknione porównanie z PSA pod kątem specyficzności postanowiłem wyodrębnić stany, które mogą osłabiać jego przydatność jako markera. Na podstawie dostępnej literatury wybrałem następujące zmienne, celem zbadania ich wpływu na wartość IMPDH2:

1. wiek
2. objętość prostaty
3. BMI
4. PSA
5. skalę Gleasona
6. popularne choroby współistniejące (nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca, arytmia, cukrzyca, kamica dróg moczowych)
7. używki (alkohol i nikotynizm)

Rozkład wieku w grupie badanej doskonale obrazuje twierdzenie, że jest on podstawowym czynnikiem ryzyka raka prostaty. CaP jest chorobą ludzi starszych. Spośród wszystkich pacjentów skierowanych do Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze na biopsję gruczołu krokowego, w latach 2013-2014, to pacjenci z przedziału wiekowego 57-92 lat zapadali na nowotwór gruczołu krokowego. Według danych pochodzących ze Stanów Zjednoczonych więcej niż 65 lat, w momencie rozpoznania raka prostaty, ma ponad 70% pacjentów. Natomiast średni wiek mężczyzny u którego rozpoznaje się tą chorobę wynosi 68 lat.¹¹² Ponadto według krajowych danych Centrum Onkologii Instytutu Marii Skłodowskiej Curie szczyt zachorowalności na CaP przypada na przedział wiekowy 65-74 lat.¹ Średni wiek pacjenta z rakiem prostaty w tym badaniu to 72 lata co wpasowuje się idealnie w wyżej podane wartości.

Zmiany histologiczne typowe dla BPH pojawiają się z wiekiem u prawie każdego mężczyzny. Berry w badaniach autopsyjnych zauważył, że częstość tych zmian rośnie w miarę upływu lat od około 10% u 35-latków do ponad 85% u 85-latków.¹¹³ Nie u każdego mężczyzny z widocznymi pod mikroskopem wykładnikami łagodnego przerostu prostaty (BPH) dojdzie do jej rzeczywistego powiększenia (BPE- Benign Prostate Enlargement). Isaacs i Coffey wykazali, że do stwierdzonego w badaniu USG lub DRE zwiększenia objętości prostaty dojdzie u 50% badanych wykazujących histologiczne zmiany o typie BPH.¹¹⁴ Kolejni autorzy udowadniali większą częstotliwość występowania BPE wraz z wiekiem.¹¹⁵ Pacjenci z tego badania potwierdzają te założenia. Jako że, do grupy badanej w mojej pracy zakwalifikowali się chorzy w przedziale wiekowym 57-92 lata ma ona większe ryzyko obecności BPE. Zgadza się to z wymiarami gruczołów krokowych. Wynosiły one od 17 do 200 cm³ ze średnią wartością 62 cm³ w grupie badanej. Jak wspomniano we wstępie rozmiar prostaty ma udowodniony wpływ na poziom PSA co oczywiście pogarsza jego swoistość jako markera nowotworu prostaty.²⁰

Średnie BMI wynosiło 26 kg/m². Wskazuje to na nadwagę w grupie badanej. Należy jednak pamiętać, że BMI, choć proste w obliczeniach, nie może być stosowane dla każdego. Ponieważ mięśnie ważą więcej niż tkanka tłuszczowa osoba ponadprzeciętnie umięśniona o średniej wysokości ciała, może wykazywać nieprawdziwie niewielką nadwagę. Na szczęście wśród badanych nie zaobserwowano nikogo o atletycznej budowie ciała. Stwierdzenie nadwagi w grupie badanych osób, potwierdza udowadniany w licznych pracach związek raka prostaty z otyłością.^{32,33,34}

Średnie PSA wyniosło 164,9 ng/ml. Niewątpliwy wpływ na tą wartość miał fakt, że 20% (n=16) pacjentów prezentowało poziomy swoistego antygenu sterczowego powyżej 100 ng/ml. Wśród nich wystąpiły także 3 wyniki kilkutyśne. Oznacza to, że uśrednienie wartości PSA w tej grupie należy traktować z należytą rezerwą. Uderzającym pozostaje fakt, iż 1/5 pacjentów ma w momencie rozpoznania nowotwór wysoko zaawansowany, nie kwalifikujący się do leczenia radykalnego, z praktycznie 100% szansą na obecność przerzutów. Pokazuje to jak wiele pozostało do zrobienia w zakresie profilaktyki chorób gruczołu krokowego. Niewątpliwie należy wciąż zachęcać chorych do regularnych wizyt w gabinecie urologicznym. Pomoże także edukacja lekarzy rodzinnych będących często pierwszym ogniwem inicjującym wizytę pacjenta w poradni urologicznej.

Najczęściej stwierdzaną wartością złośliwości raka prostaty w skali Gleasona było 7. Do obliczeń nie zakwalifikowało się 4 chorych, u których nie udało się określić skali Gleasona, pomimo rozpoznania histopatologicznego nowotworu. Porównując ten rozkład z danymi z publikacji National Collaborating Centre for Cancer (UK) z 2009 roku oraz Connecticut Tumor Registry ocenionymi w latach 2002-2004, można wysunąć kilka spostrzeżeń. Pacjenci z mojej grupy badanej, zebranej w 2013-2014 roku, mają zdecydowanie niższy odsetek rozpoznań nowotworu niskiego ryzyka (Gleason score 3+3=6) w stosunku do wyżej wymienionych grup. Gleason score 6=3+3 wynosił: 20% (w tym opracowaniu) vs. 35% (NCCC) vs. 43% (Connecticut Tumor Registry). Przesunięcie to wyrównuje większą liczbę diagnoz raka średniego (Gleason score 7) i wysokiego ryzyka (Gleason score ≥ 8) w mojej grupie badanej. Odpowiednio Gleason score ≥ 7 wynosił: 71% (w tym opracowaniu) vs. 63% (NCCC) vs. 51% (Connecticut Tumor Registry). Natomiast odsetek rozpoznań nowotworów bardzo dobrze zróżnicowanych Gleason score ≤ 5 pozostawał niewielki i podobny we wszystkich zbiorach danych (około 4%).^{116,117} Zestawiając ze sobą wykres PSA z wykresem skali Gleasona u badanych pacjentów można dojść do ciekawych wniosków. Pomimo tego, że 36,4% badanych legitymowało się wynikiem swoistego antygenu sterczowego poniżej 10 ng/ml. co sugerowałoby u nich obecność nowotworu niskiego ryzyka, to rak pośredniego i wysokiego ryzyka, dominował w rozpoznaniach histopatologicznych (40% chorych ze skalą Gleasona = 7 i 31% chorych ze skalą Gleasona ≥ 8). Pokazuje to po raz kolejny, że PSA nie jest markerem doskonałym i może nie korelować ze stopniem złośliwości choroby prostaty. Daje się również zauważyć dużą rozpiętość wyników swoistego antygenu sterczowego. Wynika to z podstawowej zalety w konstrukcji tego badania. Do pierwszego etapu pracy kwalifikowali się wszyscy chorzy z rozpoznaniem na oddziale urologii w latach 2013-2014 rakiem prostaty. Zgody na udział w pierwszej fazie testu nie wyraził jedynie znikomy odsetek pacjentów. Pozwoliło to zbudować grupę badaną oddającą niemal idealnie charakterystykę populacji z nowotworem stercza występującą naturalnie w środowisku (pacjenci w różnych stadiach zaawansowania, z skrajnie różnymi wartościami PSA, skali Gleasona, objętości stercza itd.). Skala Gleasona jest podstawowym parametrem pozwalającym na określenie stadium zaawansowania choroby. Stanowi tym samym jeden z głównych wykładników pozwalających na kwalifikację chorych do leczenia radykalnego. Potrzebujemy markerów dokładnych, pozwalających przewidzieć złośliwość histopatologiczną. W związku z tym skala Gleasona musiała się znaleźć w obrębie moich badań nad Dehydrogenazą Inozynomonofosforanową II.

Obecność nadciśnienia tętniczego na pierwszym miejscu wśród chorób współistniejących z rakiem prostaty nie jest niespodzianką, ponieważ spośród komponentów syndromu metabolicznego jedynie nadciśnienie i obwód pasa >102cm może korelować ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworu stercza.¹¹⁸

Istnieje zwiększone ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia u pacjentów z zaawansowanym rakiem stercza poddanych hormonoterapii.¹¹⁹ Prostatectomia radykalna oraz radioterapia^{120,121}, w leczeniu raka stercza, są również powiązane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych. Te punkty uchwytu nie przystają jednak do pacjentów w mojej pracy, ponieważ grupa badana była oceniana pod kątem chorób współistniejących przed rozpoczęciem jakiegokolwiek leczenia. Przewlekły proces zapalny i jego mediatory są powiązane z ryzykiem wystąpienia zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych.¹²² Chroniczne zapalenie pojawia się także w przypadku chorób nowotworowych.¹²³ Połączenie tych informacji pozwala zrozumieć próby wykazania związku raka prostaty z obecnością chorób sercowo-naczyniowych.¹²⁴

W ostatnim czasie ukazują się prace udowadniające zmniejszenie ryzyka zapadalności na nowotwór stercza u chorych na cukrzycę.^{125,126} Pomimo to pogarsza ona prognozę u mężczyzn z już stwierdzonym rakiem prostaty.¹²⁷ Cukrzyca może mieć także wpływ na wartości PSA osiąmane przez chorych i postuluje się jej włączenie do schematów skринingu nowotworu gruczołu krokowego. Niższe wartości PSA osiąmane przez chorych z cukrzycą mogą wyjaśniać mniejszą częstotliwość stwierdzania Ca Prostatae u diabetyków.¹²⁸ Zbiór chorych zebranych przeze mnie w latach 2013-2014 nie pozawala potwierdzić wyżej wymienionych wniosków. W grupie badanych pacjentów z nowotworem stercza cukrzyca była jedną z częściej występujących chorób współistniejących.

Podjmowano także próby wykazania korelacji między rakiem prostaty, a kamicą dróg moczowych. Pierwotnie próbowano tłumaczyć to zjawisko obecnością współistniejącej z nowotworem stercza retencji moczu, sprzyjającej infekcjom i kamicy. Współistnienie tych jednostek chorobowych odkryto w kilku badaniach traktując to znalezisko jako mało znaczące.^{129,130} Nowsze tłumaczenie częstszego występowania kamicy moczowej wśród przypadków raka stercza opiera się na badaniach genetycznych. W obu jednostkach chorobowych wykazano polimorfizm genu receptora witaminy D (VDR), który wpływa na jej aktywność i może zaburzać procesy absorpcji i wydalania wapnia.^{131,132}

Jak wspomniano we wstępie najważniejszymi czynnikami ryzyka raka prostaty są: wiek, dziedziczenie i rasa. Poza nimi czynniki środowiskowe takie jak miejsce zamieszkania, nawyki żywieniowe czy stosowane używki muszą mieć również wpływ na jego rozwój. Na mężczyznach rasy azjatyckiej udowodniono wpływ środowiska na występowanie raka prostaty. **Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.** W kilku aktualnych badaniach wykazywano, że spożycie alkoholu odgrywa niewielką, ale widoczną rolę w zapadalności na to schorzenie.^{133,134} Podstawy biochemiczne tego zjawiska nie są do końca poznane. Przewlekłe picie jest silnym czynnikiem ryzyka nowotworów: jamy ustnej, gardła, krtani i przełyku, a więc obszarów narażonych na bezpośredni kontakt z szkodliwym związkiem. Sam etanol nie ma jednak działania mutagennego, ani karcynogennego w obrębie komórek.¹³⁵ Takie efekty wywierają jego metabolity, które powstają w dalszym odcinku przewodu pokarmowego (zwłaszcza aldehyd octowy produkt wątrobowy rozkładu alkoholu etylowego).¹³⁶ Skąd więc wywodzi się jego miejscowe pronowotworowe działanie? Etanol w stężeniach spożywanych w popularnych napojach prowadzi do śmierci komórek mających z nim kontakt. Niemniej jednak to co uległo rozpadowi nie może dać początku tkance nowotworowej. Jedną z teorii głosi, że alkohol poprzez likwidowanie powierzchniowej warstwy nabłonka, może doprowadzać do nadmiernych podziałów komórek pnia, leżących w głębszych warstwach śluzówki, w celu regeneracji komórek utraconych w warstwie zewnętrznej. Zwiększona proliferacja prowadzi do wzrostu ryzyka mutacji i karcynogenezy, ponieważ DNA znajdujące się w trakcie podziału jest najbardziej „odsłonięte” i narażone na działanie szkodliwych czynników.¹³⁷ Takie zjawisko może zachodzić również w przypadku raka stercza. Nadmiar alkoholu jest wydalany w około 10% z moczem w postaci niezmienionej, a więc ma bezpośredni kontakt z powierzchnią nabłonka narządów układu moczowego.¹³⁸

Zarówno alkohol jak i palenie papierosów są klasyfikowane jako używki zwiększające ryzyko chorób nowotworowych. 17 lat temu uważano, że dym tytoniowy zawiera około 4000 związków chemicznych z czego blisko 40 ma udowodnione działanie rakotwórcze.¹³⁹ Obecnie dane prezentowane przez American Cancer Society mówią o 7000 substancji chemicznych i 70 karcynogenach.¹⁴⁰ Nowotwory prezentujące silny związek z paleniem tytoniu to rak: płuca, gardła, jamy ustnej, krtani, przełyku, trzustki, nerki, moczowodu, pęcherza moczowego, szyjki macicy, żołądka oraz ostra białaczka mieloblastyczna. Słabiej z tym nałogiem korelują rak jelita grubego i wątroby.¹⁴¹ Nikotynizm nie jest uważany za czynnik ryzyka wystąpienia raka prostaty, pomimo tego, że w niektórych badaniach ujawnia się taki związek.¹⁴² Duża ilość prac wskazuje natomiast na znacznie gorsze rokowania pacjentów

z rozpoznaniem już rakiem prostaty. Osoby palące mają niewątpliwie większą śmiertelność w przebiegu nowotworu stercza.^{143,144} Mogą także prezentować więcej niekorzystnych cech biochemicznych i histopatologicznych tej choroby, już w trakcie podjętego leczenia.¹⁴⁵

Na podstawie powyższej pracy można wyodrębnić kilka ciekawych spostrzeżeń. Wspominana już wcześniej niska specyficzność PSA znalazła potwierdzenie także w obrębie moich badań nad Dehydrogenazą Inozynomonofosforanową II. Przykładowo w wynikach dodatkowych stwierdzono, że rozmiar prostaty ma zdecydowany wpływ na poziom PSA, co nie pozostaje bez znaczenia na jego przydatność jako biomarkera. Łagodny rozrost stercza, wraz z przyrostem objętości prostaty, pogarsza specyficzność swoistego antygenu sterczowego w diagnostyce Ca Prostatæ. Tymczasem IMPDH2 okazało się być wolne od takiego wpływu i jego wzrost powinien być bardziej charakterystyczny dla nowotworu gruczołu krokowego. Podobne spostrzeżenie poczyniono odnośnie oddziaływania wieku chorych na oba badane markery. Im starszy chory tym większa prostata, a im większa prostata tym bardziej znaczący jej wpływ na poziom PSA. Jako, że rak prostaty dotyka najczęściej mężczyzn w podeszłym wieku, to właśnie u nich potrzebujemy najbardziej skutecznej diagnostyki biochemicznej. Tymczasem właśnie w tej grupie chorych PSA będzie miało najbardziej obniżoną swoistość, ze względu na częstsze występowanie BPH i większe rozmiary stwierdzonych gruczolaków stercza. Poziomy PSA wzrasta wraz z wiekiem zarówno w populacji ogólnej, jak i u badanych przeze mnie chorych. Szkodliwy wpływ tego zjawiska na swoistość diagnostyczną PSA skomentowano już wielokrotnie. Sformułowano nawet termin normy wiekowej swoistego antygenu sterczowego APSA. Jak już wspomniano na wstępie tej pracy pojęcie to intensywnie badał Oesterling. Tu także IMPDH2 pokazało swoją przewagę nad PSA w temacie bycia markerem bardziej specyficznym. Zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej wiek nie wykazywał żadnego związku z poziomami Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II co stanowi jej niezaprzeczalny atut.

Trzy powyższe fakty przemawiają zdecydowanie na korzyść badanego przeze mnie związku. Tymczasem w obrębie chorób współistniejących w moich grupach chorych obie substancje prezentowały podobną kondycję diagnostyczną. Ze względu na wykazany wpływ cukrzycy i choroby niedokrwiennej serca na poziomy IMPDH2 postanowiono sprawdzić tą zależność także dla wzorcowego markera raka prostaty - PSA. Poszukiwano odpowiedzi na pytanie: Czy któraś z tych chorób może zaniżać poziom PSA u chorych z Ca Prostate i tym samym pogarszać jego wartość diagnostyczną? Do porównania poziomu PSA u badanych,

u których zdiagnozowano występowanie choroby niedokrwiennej serca i cukrzycy wykorzystano testy U Manna-Whitney'a. Wykazano istnienie istotnych statystycznie ujemnych różnic poziomów swoistego antygeny sterczowego pomiędzy pacjentami chorującymi na cukrzycę i wolnymi od niej ($U = 369, p < 0,05$). Nie wykazano takich różnic pomiędzy pacjentami z chorobą niedokrwinną serca i nie mającymi problemów w obrębie krążenia wieńcowego ($U = 547,5, p > 0,05$). Jako że, ChNS nie miała wpływu na wyniki PSA, jej związek z IMPDH2 i nowotworem prostaty pozostaje incydentalny. Natomiast wpływ cukrzycy na obniżenie poziomu markerów PSA i IMPDH2 u chorych z rozpoznanym rakiem prostaty jest faktem zarówno według tego badania, jak i wcześniej przytaczanych (w rozdziale „Charakterystyka grupy badanej”). Jest to niewątpliwie ciekawa obserwacja w kontekście prób populacyjnych w których stwierdzano redukcję ryzyka wystąpienia raka prostaty u diabeetyków spożywających Metforminę.¹⁴⁶ Zamysłem autorów było wykazanie, że Metformina chroni chorych przed nowotworem stercza. Tymczasem grupa ta mogła być niedostatecznie diagnozowana w kierunku CaP z powodu stwierdzania niższych wartości PSA w przebiegu cukrzycy.

Słabszą stroną IMPDH2 w zakresie specyficzności diagnostycznej raka prostaty będzie z pewnością stwierdzona w tej pracy słaba ujemna korelacja pomiędzy jej poziomem a poziomem BMI w grupie testowej. Można to tłumaczyć faktem stanowiącym, że ludzie z chorobą nowotworową ulegają kacheksji. Osiągają wtedy znacznie niższe poziomy BMI niż populacja ogólna. Tymczasem wartości Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II korelują ze skalą Gleasona. Jak wykazano w grupie badanej, są tym wyższe im bardziej złośliwy histopatologicznie nowotwór stwierdzamy. Łącząc oba stwierdzenia można przyjąć tezę, że chorzy z bardziej złośliwym nowotworem (wysoki Gl. score, wysokie IMPDH2), mają większe ryzyko wystąpienia kacheksji (niskie BMI). Aby umocnić przyjęte założenie w moich grupach badanych postanowiłem sprawdzić bezpośrednio związek skali Gleasona z BMI. W wyniku analizy korelacji monotonicznej tau Kendalla stwierdzono u badanych słaby ujemny związek pomiędzy złośliwością nowotworu w skali Gleasona a poziomem BMI. Wskazuje to na niewielką (nieznaczną) tendencję do współzmienności, w której wyższym wartościom skali Gleasona towarzyszą niższe poziomy BMI. Wynika z tego, że przyjęte założenie jest słuszne. Wpływ Body Mass Index na poziom IMPDH2 może pogarszać jego swoistość jako biomarkera. Na szczęście zachodzi on jedynie w grupie testowej i daje się wytłumaczyć powyższymi rozważaniami.

Jak udowodniono powyżej wyższa specyficzność Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II w stosunku do PSA, w zakresie diagnostyki raka prostaty nie pozostawia wątpliwości. Powyższe napawające optymizmem spostrzeżenia co do przewagi IMPDH2 nad PSA jako markera bardziej swoistego nie mogą jednak zmienić głównego wniosku płynącego z mojego badania. Jako że, nie wykazano różnic w stężeniach Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej 2 pomiędzy pacjentami chorymi na raka prostaty a zdrowymi oraz nie stwierdzono związku pomiędzy poziomem PSA a IMPDH2 w obu grupach, enzym ten nie znajdzie zastosowania w diagnostyce nowotworu gruczołu krokowego.

Drugą ścieżką poszukiwań obraną przeze mnie na polu onkologii urologicznej, było odnalezienie związku mogącego mieć zastosowanie w follow-up chorych po leczeniu raka prostaty. Także tutaj oznaczanie PSA znalazło szerokie zastosowanie i jest głównym składnikiem obserwacji pacjentów. Obecnie jako wyznacznik wznowy biochemicznej stanowi podstawowy wykładnik niepowodzenia leczenia radykalnego, zarówno prostatektomii jak i RTG-terapii.^{147,148} Odpowiedź na leczenie, pod postacią spadku PSA, zaobserwowano także w moim badaniu, u prawie wszystkich pacjentów. Badając IMPDH2 podjąłem próbę sprawdzenia przydatności tego związku w wyżej opisanym kontekście. Poziomy IMPDH2 zmniejszyły się u części chorych którzy zareagowali na terapię. Fakt ten nie wyklucza całkowicie nowo badanego związku z obrębem monitoringu leczenia raka stercza, tym bardziej, że w trakcie dalszych oznaczeń obserwowano kolejne korzystne na tym polu cechy.

Przykładowo wartości skali Gleasona uszeregowane wg stopnia złośliwości nowotworu (Gl. score_rec) poddałem analizie korelacji monotonicznej tau Kendalla dla zmiennych nieparametrycznych. W jej wyniku stwierdziłem u badanych dodatnią korelację pomiędzy złośliwością nowotworu wyrażoną w skali Gleasona a poziomem Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II ($r=0,175$, $p < 0,05$). Wskazuje to na tendencję do współzmienności, w której wyższym wartościom IMPDH2 towarzyszą wyższe poziomy skali Gleasona. Wynik ten stanowi pierwszą przesłankę wskazującą, że IMPDH2 ma jednak jakąś przydatność w diagnostyce Ca Prostatæ. Pomimo tego, że nie nadaje się do wczesnego wykrywania raka prostaty i nie ma pełnego związku z jego odpowiedzią na leczenie, może być jednak dobrym markerem pozwalającym przewidzieć złośliwość histopatologiczną nowotworu.

Osoby z rakiem prostaty mające wyczuwalne ognisko nowotworu w badaniu DRE przejawiają tendencję do wyższych wartości PSA oraz skali Gleasona. Udowodniano to już

kilkukrotnie w wielu badaniach, o czym wspominałem we wstępie pracy. Zebrana przeze mnie grupa chorych również prezentuje takie zjawisko. Można wnioskować, że nowotwory prostaty rozpoznawane przy pomocy badania DRE mogą być bardziej zaawansowane miejscowo i prezentować gorszą histopatologię. Tymczasem Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II jest większa u chorych z nowotworem wyczuwalnym przy pomocy badania palcem przez odbytnicę DRE(+), a więc często z rakiem bardziej zaawansowanym miejscowo. Powyższy wynik to druga przesłanka wskazująca na przydatność IMPDH2 w diagnostyce Ca Prostatæ.

Należy też uwzględnić trzeci fakt, czyli wnioski płynące z wcześniejszego badania, opublikowane przez autora i wsp. w Central European Journal of Urology, dotyczące dodatniej korelacji poziomów IMPDH2 u osób z obecnością przerzutów Ca Prostate.¹⁴⁹

Te trzy wykazane zależności pozwalają upatrywać w Dehydrogenazie Inozynomonofosforanowej II enzymu mogącego różnicować postacie nowotworu o poszczególnych stopniach ryzyka. Wysoki poziom IMPDH2 może przepowiadać zarówno gorszą złośliwość histopatologiczną, wyższe zaawansowanie miejscowe i obecność choroby uogólnionej (przerzutów) raka prostaty. Pomimo tego, że ze względu na bardzo dobrą odpowiedź na terapię, PSA jest nadal niezagrożonym biomarkerem w monitorowaniu leczenia raka stercza Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II mogłaby być przydatna np. w kontekście protokołów aktywnego nadzoru (AS). Dodanie jej do regularnych oznaczeń w trakcie obserwacji chorych prawdopodobnie byłoby w stanie pomóc wyekstrahować chorych z agresywnymi, zaawansowanymi postaciami raka prostaty kwalifikującymi się do włączenia leczenia radykalnego. Oczywiście jej przydatność wymaga dalszych obszerniejszych badań, przekraczających zakres tej pracy.

W drogach rozwoju współczesnej diagnostyki raka prostaty daje się zauważyć kilkanaście trendów. Obecnie prym wiodą coraz dokładniejsze techniki obrazowania stercza. Wiemy, że rezonans magnetyczny, jako metoda o wyższej rozdzielczości tkankowej od tomografii, sprawdza się znakomicie w obrazowaniu gruczołu krokowego. Postęp dokonał się już w momencie wprowadzania aparatów 3T w miejsce 1,5T. Kolejnym krokiem było zastosowanie cewy endorektalnej, a stosowany dziś powszechnie multiparametryczny NMR pozwala na osiągnięcie najwyższej czułości i specyficzności w obrazowaniu zmian patologicznych wewnątrz stercza ze wszystkich dostępnych metod. System oceny PIRADS (Prostate Imaging Reporting and Data System) okazał się na tyle skuteczny w badaniach

gruczołu krokowego, że trwają prace nad wprowadzeniem go do diagnostyki nowotworu pęcherza moczowego.¹⁵⁰

Kolejnym trendem jest wprowadzenie nowoczesnych znaczników umożliwiających dokładniejszą lokalizację komórek nowotworowych.¹⁵¹

PET z Choliną przecierał szlaki jako jeden z pierwszych znaczników tak specyficznych dla tkanki nowotworowej prostaty. Cholina jest głównym składnikiem fosfolipidów błon komórkowych i gromadzi się w dużych stężeniach w komórkach raka prostaty dzięki kinazie choliny, enzymowi którego nadekspresję stwierdzono w tej chorobie. ¹¹C-Choline oraz ¹⁸F-Choline PET znalazł swoją pozycję w diagnostyce jako marker wznowy biochemicznej przy wysokich wartościach PSA > 1ng/ml.¹⁵² Jednak poprzez dużą ilość wyników fałszywie ujemnych występujących ze względu na niedostateczną rozdzielczość tkankową PET nie może być brany obecnie pod uwagę jako metoda w stagingu raka prostaty. Nie przewyższa on skutecznością rozszerzonej limfadenektomii miedniczej w ocenie przerzutowych węzłów chłonnych.¹⁵³

USPIO czyli Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide to nanocząsteczki tlenku żelaza wykorzystywane w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego. Znalazły zastosowanie w wielu obszarach diagnostyki NMR. Przysłużyły się do uzyskiwania lepszych obrazów wątroby, węzłów chłonnych, naczyń oraz procesów zapalnych. USPIO podane do krwiobiegu przechodzą z nim do tkanek, a z nich są ewakuuje je układ limfatyczny. Finalnie kończą w obrębie węzłów chłonnych gdzie są fagocytowane przez makrofagi. Przerzutowe węzły chłonne zawierają mniej białych krwinek tego rodzaju, a dodatkowo mają one upośledzoną funkcję żerną. Zatem USPIO pozostają dłużej w obrębie przerzutów węzłowych dając ich charakterystyczne świecenie w obrazach T2.¹⁵⁴ Pozwala to na stwierdzanie komórek nowotworowych w obrębie niepowiększonych węzłów chłonnych z 65% - 75% czułością i 93% - 96% specyficznością. W Europie (zwłaszcza w Holandii, gdzie jest produkowany) najbardziej znanym środkiem kontrastowym zawierającym USPIO jest Ferumoxtran-10. Tymczasem w Stanach Zjednoczonych, ze względu na dopuszczenie do stosowania przez FDA w leczeniu niedokrwistości z niedoboru żelaza u chorych z przewlekłą chorobą nerek, bardziej popularny jest Ferumoxytol. Drugi związek jest słabiej zbadany w zakresie obrazowania NMR i trzeba podać go dwukrotnie więcej, ale jest dłużej stosowany w praktyce klinicznej i ma dzięki temu ugruntowany profil bezpieczeństwa.¹⁵⁵

W diagnostyce raka stercza częstym problemem pozostaje wczesne wykrycie wznowy po leczeniu radykalnym. Pozwala ono na wdrożenie terapii uzupełniających i dalsze wydłużanie życia chorych. Niestety ze względu na niedoskonałości PSA jako markera wznowa procesu

nowotworowego nie jest dostatecznie szybko rozpoznawana. Dzieje się tak zwłaszcza przy utrzymywaniu się niskich wartości swoistego antygenu sterczowego. W takiej konfiguracji klinicznej znalazł swoje zastosowanie kolejny znacznik PET czyli ^{68}Ga -PSMA. Związek ten jest ligandem PSMA, dużej glikoproteiny przebłonowej charakterystycznej dla komórek stercza. W komórkach raka prostaty ma ona od 100x-1000x większą ekspresję na powierzchni błony komórkowej niż w innych tkankach. Zwiększa się ona dodatkowo ze stopniem zaawansowania miejscowego, złośliwością histopatologiczną i w przypadkach nowotworu opornego na kastrację.¹⁵¹ W dużej metaanalizie z 2016 roku wykazano, że ^{68}Ga -PSMA prezentuje ogólny współczynnik wykrywalności wznowy biochemicznej na poziomie 76%. Dodatkowo ma znakomitą wykrywalność BCR przy niskich wartościach swoistego antygenu sterczowego: 58% - 76% odpowiednio dla wartości PSA 0,2 - 1,0 ng/ml.¹⁵⁶ Dobre wyniki badań nowego znacznika zaowocowały uzyskaniem rekomendacji EAU w poszukiwaniu przerzutów węzłowych i odległych po wznowie biochemicznej jeśli $\text{PSA} \geq 0,2 \text{ ng/ml}$.

Następnym kierunkiem rozwoju jest odkrywanie nowych markerów zarówno na poziomie podstawowej biochemii jak i specyficznych mutacji czy alteracji genowych. Jedne próby wprowadzania nowych technik wywodzą się często z dość prostych, choć egzotycznych pomysłów. Dobrym tego przykładem jest rekrutowanie psów w celu wykrywania u ludzi nowotworu prostaty. Pierwsza wzmianka o tego rodzaju metodzie ukazała się już w 2008 roku.¹⁵⁷ Kolejne publikacje ukazały się w obecnej dekadzie, a ich wyniki są dość obiecujące. Specjalnie wytrenowane psy potrafią osiągnąć wartości czułości i specyficzności powyżej 95% w wykrywaniu raka prostaty z próbek moczu.¹⁵⁸ Obecnie najważniejszą i zarazem najskuteczniejszą ścieżką poszukiwań w obrębie diagnostyki raka stercza jest droga angażująca badania ludzkiego DNA i RNA. Od dawna wiadomo, że podwójna nić determinuje wszystkie nasze cechy, a w szczególności nowotworzenie. Spopularyzowane ostatnio badania genetyczne oddają usługi także w obrębie raka prostaty. Wiemy że, istnieją zmiany genomu charakterystyczne dla określonych rodzajów nowotworu gruczołu krokowego. Najpopularniejszymi alteracjami genetycznymi odpowiedzialnymi za wyciszenie kluczowych genów supresorowych (hamujących rozwój nowotworu), są metylacje DNA. Fakt ten wykorzystali naukowcy z Irvine w Californii tworząc test ConfirmMDx. Udowodnili oni, że istnieją dwie specyficzne alteracje genowe charakterystyczne dla raka prostaty. Są to metylacje genów APC i RASSF1. Ponadto użyli oni także biomarkera epigenetycznego nowotworu gruczołu krokowego GSTP1 kodującego transferazę glutationową-S Pi. Łącząc te trzy związki stworzyli test tkankowy służący

potwierdzeniu nieobecności raka w rdzeniach po pierwszej negatywnej biopsji u pacjenta. Może on wskazać chorych z fałszywie ujemnym wynikiem pierwszego pobrania wycinków, którzy odniosą korzyść z powtórnej punkcji. Pozwala także odstąpić od dalszej inwazyjnej diagnostyki w grupach z przetrwałym podwyższonym stężeniem PSA, po pierwszym prawidłowym wyniku badania histopatologicznego. ConfirmMDx jest testem tkankowym. Badaniu poddawane są rdzenie z pierwszej negatywnej biopsji u pacjenta. Jego przewaga nad oceną mikroskopową polega na wykrywaniu zmian epigenetycznych nie tylko w samych komórkach nowotworowych, ale także w otaczającej raka histopatologicznie jeszcze zdrowej tkance. Korzyść tą nazywa się „efektem pola”.¹⁵⁹ Te same rdzenie które nie zawierają jeszcze komórek nowotworowych, mogą mieć zmiany genetyczne świadczące o sąsiedztwie raka i dać dodatni wynik testu ConfirmMDx. Tym samym nie dziwi wyższa negatywna wartość przepowiadająca nieobecność raka NPV na poziomie 90% w porównaniu do histopatologii, która niesie NPV od 65-75%.^{160,161}

Kolejny test zwalidowany przez tą grupę to Select MDx tzw. „Płynnej biopsji” (ang. Liquid Biopsy). Pozwala on stwierdzić zwiększone ryzyko raka prostaty Gl. Score ≥ 7 u chorych nigdy nie poddawanych biopsji stercza. Producent sugeruje używanie go w trakcie podstawowego skriningu CaP. Test wykorzystuje pomiar ekspresji dwóch biomarkerów mRNA DLX1 oraz HOXC6 w stosunku do genu referencyjnego KLK3.¹⁶² Następnie wynik tej części badania jest łączony algorytmem z klinicznymi czynnikami ryzyka (wiekiem, PSA, objętością prostaty, DRE). Materiał do oznaczeń stanowi tu mocz pacjenta pobrany po uprzednim masażu prostaty. Niewątpliwie wrażenie robi negatywna wartość przepowiadająca NPV na poziomie 95% dla obecności nowotworu stercza Gl. Score ≥ 7 , oraz NPV $> 99\%$ dla obecności raka prostaty Gl. Score ≥ 8 . Zarówno Confirm MDx jak i Select MDx zostały przebadane pod kątem kosztowej efektywności, wykazano że ich stosowanie przynosi wymierne korzyści w QALY (Quality-Adjusted-Life-Year) pacjentów oraz pozwala zaoszczędzić średnio \$1,694 na pacjenta.¹⁶³

Badania ludzkiego genomu zataczają coraz szersze kręgi. Metodą mikromacierzy można oznaczyć kilkaset alteracji genowych w obrębie komórek prostaty z których każda będzie miała określoną czułość i specyficzność w wykrywaniu raka gruczołu krokowego. Na tegorocznym (2019) kongresie Europejskiego Towarzystwa Urologicznego w Barcelonie Prof. Laurence Klotz przedstawił pracę, która wzbudziła prawdziwą burzę pytań i zainteresowanie wśród uczestników panelu biomarkerów w diagnostyce raka stercza. Zaprojektował on test genetyczny dedykowany wykrywaniu istotnego klinicznie nowotworu prostaty. Jego podstawą jest oznaczanie panelu miRNA (micro RNA) oraz snc-RNA (small

non coding-RNA) w eksosomach próbki moczu wolnej od komórek. Eksosomy są uwalnianymi z komórek pęcherzykami, z powinowactwem do błon komórkowych. Ich funkcja nie jest do końca poznana jednakże są bardzo stabilne i łatwo je wyekstrahować. MiRNA (micro RNA) oraz snc-RNA (small non coding-RNA) w nich zawarte ma wpływ na biologię komórek. Oznaczenie składa się z dwóch warstw. Pierwsza czyli tzw. „Sentinel PCa” pozwala rozpoznać mężczyzn chorych na raka prostaty. Druga natomiast, nazwana „Sentinel CS” pomaga wyodrębnić chorych z klinicznie istotnym nowotworem. Najbardziej szokujące okazały się wartości specyficzności i negatywnej wartości przewidywającej (NPV) oraz czułości i pozytywnej wartości przewidywającej (PPV). Wszystkie parametry mieszczą się w przedziale między 98-100%.¹⁶⁴ Wyniki są obiecujące jednakże samo badanie wymaga kontynuacji ponieważ wykonano je na niezbyt licznej grupie n=235 pacjentów. Niestety takie kierunki poprawy diagnostyki nowotworu stercza angażują wiele kosztownych i trudnych oznaczeń połączonych skomplikowanymi algorytmami które, chociaż poprawiają skuteczność diagnostyki Ca Prostate o cenne procenty, to raczej nieprędko będą powszechnie dostępne.¹⁶⁵

W metodach skriningu raka prostaty potrzebujemy połączenia prostoty, dostępności, kosztoskryningu i łatwości interpretacji. Wszystkie te cechy łączy PSA. Znalezienie drugiego tak dobrego pojedynczego markera jest nie lada wyzwaniem, choćby ze względu na heterogenność ognisk samego nowotworu stercza.¹⁶⁶ W tym kontekście Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa 2 na pewno nie znajdzie zastosowania. Siła tego enzymu może ujawnić się w związku z jego powinowactwem do zaawansowanych i agresywnych postaci nowotworu oraz przydatnością do monitorowania odpowiedzi na leczenie. W miejscu gdzie współczesne metody wykrywania istotnego klinicznie Ca Prostate zawodzą IMPDH2 mogłoby pokazać swój potencjał. Coraz szersze wdrażanie protokołów aktywnego nadzoru (AS) wymaga skutecznego wykrywania momentu przekształcenia się "uśpionego" nowotworu gruczołu krokowego w chorobę stanowiącą rzeczywiste zagrożenie dla pacjenta. IMPDH2, po odpowiedniej walidacji, mogłoby istnieć w praktyce klinicznej jako pojedyncze badanie lub być częścią panelu markerów połączonych specjalnym algorytmem.¹⁶⁷ Stężenie Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej 2 oznaczane przy pomocy testu ELISA jest badaniem tanim. Jedno oznaczenie to koszt odczynników na poziomie zaledwie 45 złotych. Spektrofotometr konieczny do odczytania wyników testu znajduje się na wyposażeniu praktycznie każdego laboratorium. Pobranie krwi jest procedurą niezwykle mało inwazyjną. Te wszystkie cechy czynią z IMPDH2 badanie proste, dostępne i tanie zupełnie jak PSA

pozostające nieprzerwanie od 30 lat wzorem dla wielu innych markerów chorób nowotworowych. Chociaż lata świetności swoisty antygen sterczowy ma już bezpowrotnie za sobą, gdyż z upływem lat dostrzegamy coraz więcej jego ograniczeń, to niełatwo będzie znaleźć drugi tak niepozorny związek, który ukształtuje diagnostykę, leczenie i monitorowanie raka prostaty na kolejne lata. Zdetronizowanie swoistego antygenu sterczowego jest nie lada wyzwaniem. Jednakże, dla dobra naszych chorych, próbujemy wszyscy gdyż jak powiedział

John C. Maxwell: "Efektywne osiągnięcia są skutkiem nieefektywnych przygotowań."

6. Wnioski

Oceniając przydatność IMPDH2 jako nowego biomarkera w diagnostyce i monitorowaniu raka prostaty, na podstawie oznaczenia poziomów stężeń w surowicy krwi sformułowano następujące wnioski:

1. Oznaczając poziomy IMPDH2 w chwili rozpoznania raka stercza nie wykazano różnic w stężeniach Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej 2 pomiędzy pacjentami chorymi na raka prostaty a zdrowymi. Dodatkowo nie wykazano związku pomiędzy poziomem PSA a IMPDH2 w obu grupach. Wobec powyższego enzym ten nie jest przydatny jako marker „de novo” w diagnostyce nowotworu gruczołu krokowego.
2. 6 miesięcy po wdrożeniu leczenia stężenie IMPDH2 obniża się podobnie jak PSA. Pozwala to przypuszczać, że badany związek może nadawać się do monitorowania odpowiedzi na terapię po oznaczeniu jego stężenia podstawowego jako niezależny marker.
3. Kolejną korzyścią jest wyraźny związek IMPDH2 z zaawansowanymi postaciami raka prostaty. Koreluje ono dodatnio zarówno ze skalą Gleasona jak i obecnością nowotworu wyczuwalnego palcem przez odbytnicę DRE (+). Takie odkrycia sugerują, iż włączenie tego enzymu do protokołów aktywnego nadzoru (AS) mogłoby prawdopodobnie przynieść poprawę wykrycia nowotworów istotnych klinicznie.
4. W trakcie monitorowania odpowiedzi na terapię IMPDH2 byłoby markerem dość swoistym ponieważ ani wiek, ani rozmiar prostaty nie mają z nim związku. Dodatkowo spośród najczęściej występujących chorób podstawowych (nadciśnienia tętniczego, ChNS, cukrzyca, arytmii, kamicy) jedynie cukrzyca i choroba niedokrwienna serca mają na jego stężenie niewielki wpływ. Ciekawym znaleziskiem zauważonym już w kilku pracach, jest potwierdzona w tym badaniu tendencja do niższych stężeń PSA u chorych cierpiących na cukrzycę. Wyższe IMPDH2 u pacjentów z niskim BMI można w obrębie tej pracy wytłumaczyć kachekcją w zaawansowanych postaciach raka prostaty. To spostrzeżenie umacnia fakt występowania wyższych skali Gleasona u tych chorych.
5. Swoistość IMPDH2 jako markera poprawiałby brak wpływu przewlekłego stosowania najpopularniejszych używek (alkoholu oraz palenia tytoniu) na jego stężenie.

7. Supplement

Formularz zgody pacjenta.

Nazwisko i Imię:.....

Dokładny adres:.....

Telefon:....., e-mail:.....

Cel badania: Chcielibyśmy zaprosić Pana do udziału w badaniu naukowym „Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II jako biomarker w diagnostyce i leczeniu raka prostaty”. Rak prostaty jest najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn w krajach rozwiniętych. Najważniejsze w skutecznym leczeniu tej choroby jest jej wczesne rozpoznanie, oraz monitorowanie efektów terapii. Używane przez nas dotychczas biomarkery (jak np. PSA) mają swoje ograniczenia. Cały czas trwają poszukiwania „idealnego” związku chemicznego, którego stężenie wskazałoby nam ryzyko obecności raka prostaty, lub pozwoliło monitorować przebieg leczenia tego nowotworu, u określonego pacjenta. Badanie nasze ma charakter poznawczy i ma na celu określenie przydatności enzymu Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II w wyżej wymienionym przypadku.

Procedura badania: Przed biopsją stercza zostanie pobrana od Pana krew w ilości 2x 9 ml celem oznaczenia wartości PSA i IMPDH 2. Zebrane zostaną dane dotyczące Pana wieku, wagi, wzrostu i objętości gruczołu krokowego. Następnie 6 miesięcy po wdrożeniu ewentualnego leczenia, ponownie zostanie pobrana krew w ilości 2x 9 ml celem oznaczenia wartości PSA i IMPDH 2. Powyższe dane zostaną opracowane statystycznie.

Poufność: Dane zebrane w czasie uczestnictwa w badaniu, łącznie z Pana danymi osobowymi, będą traktowane, jako poufne. Identyfikacja Pana danych będzie odbywać się poprzez nadanie im numeru kodowego, co pozwoli na zachowanie całkowitej anonimowości. Weryfikacja Pana danych osobowych będzie odbywać się tylko w ośrodku badawczym i będzie dokonywana przez lekarza i badacza, pod rygorem zachowania tajemnicy służbowej. Informacje te nie będą udostępniane innym podmiotom, bądź osobom. Wyniki badania naukowego, w którym bierze Pan udział, mogą być publikowane lub prezentowane w trakcie spotkań naukowych i kongresów, jednakże również w tych przypadkach wszelkie dane dotyczące Pana osoby pozostaną anonimowe.

Świadoma zgoda na udział w badaniu:

Wyrażam zgodę na udział w badaniu naukowym „Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II jako biomarker w diagnostyce i leczeniu raka prostaty”.

Wyrażam zgodę na użycie mojej krwi w wyżej wymienionym badaniu.

Zapoznałem się z informacją o badaniu i w pełni rozumiem jej treść.

Wyrażam zgodę na przechowywanie i przetwarzanie moich danych osobowych zebranych dla celów badawczych. Zostałem poinformowany, że mam prawo do wglądu do moich danych osobowych, celem ich poprawiania, uzupełniania, bądź wycofania z bazy.

Data:..... Czytelny podpis:.....

Formularz zgody pacjenta- grupa badana (Sup-1).

Arkusze oceny pacjenta
do biopsji gruczołu krokowego.

Data:.....

Nazwisko i Imię:

Pesel: Wiek :

Waga : Wzrost :

Objętość prostaty : BMI :

PSA : Liczba biopsji :

Poprzednie zabiegi
urologiczne :

Arkusze oceny pacjenta do biopsji gruczołu krokowego (Sup-2).

Imię i nazwisko:

Rodzaj leczenia:

Usunięcie prostaty	
Usunięcie prostaty z RTG-terapią	
RTG-terapia z hormonoterapią	
Hormonoterapia	
RTG-terapia	

Objawy nieporządane:

Dolegliwości dysuryczne		Osłabienie strumienia moczu	
Krwiomocz		Zaburzenia erekcji	
Częstomocz dzienny		Uczucie braku energii	
Parcia naglące		Biegunka	
Nietrzymanie moczu		Zaparcie	
Ginekomastia		Gorączka	
Bóle jąder		Nykturia	

PSA po leczeniu:

IMPDH 2 po leczeniu:

Data:

Podpis pacjenta:

DRE:

Obecność przerzutów:	
Hist-Pat.	
Scyntygrafia	
NMR / KT	

Stosowanie używek:	
Palenie tytoniu	
Alkohol	

Choroby współistniejące:	
Nadciśnienie tętnicze	
Choroba niedokrwienna serca	
Arytmia	
Cukrzyca	
Kamica nerkowa	

Arkusz oceny pacjenta po leczeniu (Sup-3).

Formularz zgody pacjenta.

Nazwisko i Imię:

Dokładny adres:

Telefon:, e-mail:

Cel badania: Chcielibyśmy zaprosić Pana do udziału w badaniu naukowym „Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II jako biomarker w diagnostyce i leczeniu raka prostaty”. Rak prostaty jest najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn w krajach rozwiniętych. Najważniejsze w skutecznym leczeniu tej choroby jest jej wczesne rozpoznanie, oraz monitorowanie efektów terapii. Używane przez nas dotychczas biomarkery (jak np. PSA) mają swoje ograniczenia. Cały czas trwają poszukiwania „idealnego” związku chemicznego, którego stężenie wskazałoby nam ryzyko obecności raka prostaty, lub pozwoliło monitorować przebieg leczenia tego nowotworu, u określonego pacjenta. Badanie nasze ma charakter poznawczy i ma na celu określenie przydatności enzymu Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej II w wyżej wymienionym przypadku.

Procedura badania: Jednocześnie z badaniami podstawowymi zostanie pobrana od Pana krew w ilości 2x 9 ml celem oznaczenia wartości PSA i IMPDH 2. Zebrane zostaną dane dotyczące Pana wieku, wagi, wzrostu i objętości gruczołu krokowego. Powyższe dane zostaną opracowane statystycznie.

Poufność: Dane zebrane w czasie uczestnictwa w badaniu, łącznie z Pana danymi osobowymi, będą traktowane, jako poufne. Identyfikacja Pana danych będzie odbywać się poprzez nadanie im numeru kodowego, co pozwoli na zachowanie całkowitej anonimowości. Weryfikacja Pana danych osobowych będzie odbywać się tylko w ośrodku badawczym i będzie dokonywana przez lekarza i badacza, pod rygorem zachowania tajemnicy służbowej. Informacje te nie będą udostępniane innym podmiotom, bądź osobom. Wyniki badania naukowego, w którym bierze Pan udział, mogą być publikowane lub prezentowane w trakcie spotkań naukowych i kongresów, jednakże również w tych przypadkach wszelkie dane dotyczące Pana osoby pozostaną anonimowe.

Świadoma zgoda na udział w badaniu:

Wyrażam zgodę na udział w badaniu naukowym „Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II jako biomarker w diagnostyce i leczeniu raka prostaty”.

Wyrażam zgodę na użycie mojej krwi w wyżej wymienionym badaniu.

Zapoznałem się z informacją o badaniu i w pełni rozumiem jej treść.

Wyrażam zgodę na przechowywanie i przetwarzanie moich danych osobowych zebranych dla celów badawczych. Zostałem poinformowany, że mam prawo do wglądu do moich danych osobowych, celem ich poprawiania, uzupełniania, bądź wycofania z bazy.

Data: Czytelny podpis:

Formularz zgody pacjenta- grupa kontrolna (Sup-4).

8. Spis rycin

Rycina 1. Podstawowe wzory stopni złośliwości w skali Gleasona.	18
Rycina 2. Przekształcenie IMP w GMP.	33
Rycina 3. Aparat 2101 Falcon firmy B-K Medical z transrektalną głowicą dwupłaszczyznową używany do badań.	39
Rycina 4. Stolik zabiegowy przygotowany do wykonania biopsji stercza.	40

9. Spis tabel

Tabela 1. Lista kolejności województw według wielkości standaryzowanych współczynników zachorowalności na nowotwory złośliwe gruczołu krokowego w Polsce w 2012 roku.	11
Tabela 2. Lista kolejności województw według wielkości standaryzowanych współczynników umieralności na nowotwory złośliwe gruczołu krokowego w Polsce w 2012 roku.	11
Tabela 3. Histologiczne typy nowotworów.	13
Tabela 4. Grupy ryzyka wznowy biochemicznej EAU, zlokalizowanego i lokalnie zaawansowanego raka prostaty.	19
Tabela 5. Ryzyko raka prostaty i szanse stwierdzenia nowotworu pośredniego i wysokiego ryzyka (Gl. Score ≥ 7) w zależności od poziomu PSA w surowicy.	20
Tabela 6. Wartości PSA dla stercza o objętości > 40 ml w zależności od wieku.	23
Tabela 7. Czułość i swoistość PSA w diagnostyce raka prostaty według różnych autorów.	31
Tabela 8. Podsumowanie wymienionych wyżej związków, korzystne oraz niepożądane korelacje i cechy poszczególnych markerów.	31
Tabela 9. Liczba biopsji wykonana przed rozpoznaniem nowotworu prostaty.	44
Tabela 10. Pozostałe parametry w grupie kontrolnej.	47
Tabela 11. Test normalności rozkładu zmiennych: wiek, BMI, V prostaty, IMPDH2 I, IMPDH2 II, PSA Stat. i PSA (po leczeniu).	50
Tabela 12. Statystyki opisowe badanych zmiennych.	51
Tabela 13. Statystyki opisowe poziomów PSA.	51
Tabela 14. Tabela zależności poziomu PSA od objętości prostaty w grupie badanej.	54
Tabela 15. Tabela zależności poziomu PSA od objętości prostaty w grupie kontrolnej.	54
Tabela 16. Tabela zależności objętości prostaty od wieku w obu grupach chorych.	55
Tabela 17. Tabela zależności poziomu PSA od wieku w obu grupach chorych.	55
Tabela 18. Statystyki opisowe poziomów IMPDH2 w obu grupach.	58
Tabela 19. Statystyki opisowe poziomów IMPDH2 w grupie badanej przed (IMPDH2 I) i po (IMPDH2 II) leczeniu.	60
Tabela 20. Statystyki opisowe zmiany poziomów IMPDH2 w grupie badanej w zależności od wdrożonego leczenia.	62

Tabela 21. Uporządkowanie skali Gleasona pod względem złośliwości histopatologicznej."	65
Tabela 22. Zależności poziomu IMPDH2 od wartości PSA w grupie badanej.	68
Tabela 23. Tabela zależności poziomu IMPDH2 od wartości PSA w grupie kontrolnej.	68
Tabela 24. Zależność poziomu IMPDH2 od objętości prostaty w grupie badanej.	70
Tabela 25. Zależność poziomu IMPDH2 od objętości prostaty w grupie kontrolnej.	70
Tabela 26. Zależność poziomu IMPDH2 od BMI w grupie badanej.	72
Tabela 27. Zależność poziomu IMPDH2 od BMI w grupie kontrolnej.	72
Tabela 28. Zależność poziomu IMPDH2 od wieku chorych w grupie badanej.	75
Tabela 29. Zależność poziomu IMPDH2 od wieku chorych w grupie kontrolnej.	75
Tabela 30. Wpływ najczęściej występujących schorzeń na poziomy IMPDH2 w grupie badanej.	77
Tabela 31. Wpływ cukrzycy oraz choroby niedokrwiennej serca na poziom PSA w grupie badanej. ..	81

10. Spis wykresów

Wykres 1. Zachorowalność na poszczególne rodzaje nowotworów w Polsce w 2012r.	9
Wykres 2. Umieralność na poszczególne rodzaje nowotworów w Polsce w 2012r.	9
Wykres 3. Zachorowalność na poszczególne rodzaje nowotworów w województwie lubuskim w 2012r.	10
Wykres 4. Liczba zachorowań na raka prostaty w zależności od wieku w Polsce w 2012r.	12
Wykres 5. Normogram zaproponowany w celu określenia ryzyka stwierdzenia raka prostaty w biopsji, przy pomocy panelu czterech kalikrein sterczowych oraz wieku i DRE pacjenta. Göteborg (Szwecja).	29
Wykres 6. Wiek pacjentów w grupie badanej.	41
Wykres 7. Objętość prostaty w grupie badanej Width x Height x Depth (ml.)	41
Wykres 8. Body Mass Index pacjentów w grupie badanej (kg/m^2).	42
Wykres 9. PSA pacjentów w grupie badanej (ng/ml).	42
Wykres 10. Skala Gleasona nowotworów prostaty w grupie badanej.	43
Wykres 11. Poziom IMPDH 2 w grupie badanej.	44
Wykres 12. Choroby współistniejące w grupie badanej	45
Wykres 13. Wiek pacjentów w grupie kontrolnej.	46
Wykres 14. IMPDH2 w grupie kontrolnej.	47
Wykres 15. Porównanie wartości PSA przed i po włączeniu leczenia raka prostaty.	52
Wykres 16. Wykres zależności poziomu PSA od objętości prostaty w obu grupach chorych	53
Wykres 17. Porównanie poziomu PSA z wynikiem testu DRE w grupie badanej.	56
Wykres 18. Porównanie wartości skali Gleasona z wynikiem testu DRE w grupie badanej.	57
Wykres 19. Porównanie wartości IMPDH2. Grupa badana vs. Grupa kontrolna.	59

Wykres 20. Porównanie wartości IMPDH2. Grupa badana(testowa) vs. Grupa kontrolna z uwzględnieniem 11 obserwacji odstających lub ekstremalnych w Grupie badanej (testowej).....	60
Wykres 21. Porównanie wartości IMPDH2 przed i po włączeniu leczenia raka prostaty.	61
Wykres 22. Porównanie wartości IMPDH2 przed i po włączeniu leczenia raka prostaty z uwzględnieniem wartości ekstremalnych.	62
Wykres 23. Wpływ rodzaju zastosowanego leczenia na zmianę poziomów IMPDH2 w grupie badanej.	64
Wykres 24. Zależność poziomu IMPDH2 od skali Gleasona w grupie badanej.	66
Wykres 25. Zależność poziomu IMPDH2 od wartości PSA w obu grupach.	67
Wykres 26. Zależność poziomu IMPDH2 od objętości prostaty w obu grupach.	69
Wykres 27. Zależność poziomu IMPDH2 od wartości BMI w obu grupach.	71
Wykres 28. Zależność poziomu BMI od wartości skali Gleasona w obu grupach.	73
Wykres 29. Zależność poziomu IMPDH2 od wieku chorych w obu grupach.	74
Wykres 30. Związek poziomów IMPDH2 z wynikiem badania DRE w grupie badanej.	76
Wykres 31. Poziomy IMPDH2 w grupie badanej u osób z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych.	78
Wykres 32. Poziomy IMPDH2 w grupie badanej u osób z chorobą niedokrwienną serca i zdrowych.	79
Wykres 33. Poziomy IMPDH2 w grupie badanej u osób z cukrzycą i zdrowych.	79
Wykres 34. Poziomy IMPDH2 w grupie badanej u osób cierpiących na arytmieję i zdrowych.	80
Wykres 35. Poziomy IMPDH2 w grupie badanej u osób z kamicą układu moczowego oraz zdrowych.	80
Wykres 36. Poziomy PSA w grupie badanej u osób z chorobą niedokrwienną serca oraz osób zdrowych.	82
Wykres 37. Poziomy PSA w grupie badanej u osób chorych na cukrzycę oraz osób zdrowych.	82
Wykres 38. Wpływ popularnie stosowanych używek na stężenie IMPDH2 w grupie badanej.	83
Wykres 39. Poziomy IMPDH2 w grupie badanej u osób palących i niepalących tytoniu.	84
Wykres 40. Poziomy IMPDH2 w grupie badanej u osób pijących i nie spożywających alkoholu.	84

11. Streszczenia

11.1. Streszczenie

Wstęp: Od 30 lat PSA jest złotym standardem wśród markerów w diagnostyce i leczeniu raka stercza. Nie jest jednak idealne. Jego wysoka czułość i niska specyficzność w kontekście masowego skriningu doprowadza do częstego wykrywania nowotworów nieistotnych klinicznie i co za tym idzie nadmiernego, niepotrzebnego leczenia. 18% nowotworów rozpoznaje się bez podwyższenia PSA, na podstawie samego badania DRE. Potrzebujemy nowego biomarkera w diagnostyce i leczeniu raka prostaty. Nowe doniesienia wskazują, że rolę taką mogłaby spełnić Dehydrogenaza Inozynomonofosforanowa II (IMPDH2).

Cel pracy: Celem mojej pracy jest ocena przydatności IMPDH2 jako nowego biomarkera w diagnostyce i monitorowaniu raka prostaty, na podstawie oznaczenia poziomów stężeń w surowicy krwi.

Oznaczyłem poziomy IMPDH 2 w chwili rozpoznania raka stercza i 6 miesięcy po wdrożeniu leczenia. Określiłem korelację stężenia IMPDH2 do stopnia zaawansowania raka, poziomu PSA, objętości prostaty, BMI, wieku, DRE.

Dokonałem oceny zależności poziomu IMPDH2 od najczęściej występujących chorób podstawowych (cukrzyca, nadciśnienia tętniczego, chorób serca itp.).

Zbadałem wpływ przewlekłego stosowania najpopularniejszych używek (alkoholu oraz palenia tytoniu) na stężenie IMPDH2.

Materiał i metody: Grupę badaną stanowią chorzy z rozpoznanym rakiem stercza na oddziale Urologii Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze w latach 2013-2014 poddani następującym formom leczenia:

- * prostatektomia radykalna
- * RTG-terapia
- * RTG-terapia z hormonoterapią adjuwantową
- * hormonoterapia w monoterapii
- * baczna obserwacja (WW)

W grupie kontrolnej znaleźli się losowo wybrani pacjenci oddziału Urologii Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze trafiający celem leczenia chorób nienowotworowych układu moczowego w latach 2013-2014.

Z badania wyłączono pacjentów z rozpoznanym rakiem prostaty którzy:

- zostali poddani aktywnemu nadzorowi, prostatektomii radykalnej z adjuwantową RTG-terapią, prostatektomii radykalnej z hormonoterapią
- nie otrzymali żadnej formy leczenia lub kontroli
- nie zgłosili się na wizytę kontrolną po 6-ciu miesiącach od wdrożenia leczenia
- nie wyrazili zgody na udział w badaniu.

Pacjentów którzy zostali poddani bacznej obserwacji (WW), włączono tylko do pierwszej fazy badania (oznaczenie IMPDH2 przed leczeniem, w trakcie diagnostyki raka).

Wyniki: Badaniu poddano grupę 88 mężczyzn z rakiem prostaty, charakteryzującą się następującymi parametrami: Wiek 57 - 92 lat; BMI 15,8 - 40,6 kg/m²; Objętość stercza 17 - 200 cm³; Gleason sc. 4 - 10; Poziom PSA 3,98 - 3182 ng/ml; IMPDH2 10,1 - 483,89 pg/ml; Liczba biopsji: 1-71 (83%) chorych, 2-12 (14%) chorych, 3-2 (1%) chorych, 4-1 (1%) chorych, 5-2 (1%) chorych; Status DRE (+) 20 chorych; 30 osób palących tytoń; 15 osób nadużywających alkoholu; Obecność chorób współistniejących: cukrzyca 20 chorych, nadciśnienie tętnicze 38 chorych, arytmia 14 chorych, choroba niedokrwienna serca 16 chorych, kamica nerkowa 9 chorych; W drugim etapie badania, po 6 miesiącach od wdrożenia leczenia analizowano:

Poziom IMPDH2 3 - 421,58 pg/ml;

Poziom PSA 0,00 - 113,77ng/ml;

Wnioski: Oznaczając poziomy IMPDH2 w chwili rozpoznania raka stercza nie wykazano różnic w stężeniach Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej 2 pomiędzy pacjentami chorymi na raka prostaty a zdrowymi. Dodatkowo nie wykazano związku pomiędzy poziomem PSA a IMPDH2 w obu grupach. Wobec powyższego enzym ten nie jest przydatny jako marker „de novo” w diagnostyce nowotworu gruczołu krokowego.

6 miesięcy po wdrożeniu leczenia stężenie IMPDH2 obniża się podobnie jak PSA. Pozwala to przypuszczać, że badany związek może nadawać się do monitorowania odpowiedzi na terapię po oznaczeniu jego stężenia podstawowego jako niezależny marker.

Kolejną korzyścią jest wyraźny związek IMPDH2 z zaawansowanymi postaciami raka prostaty. Koreluje ono dodatnio zarówno ze skalą Gleasona jak i obecnością nowotworu wyczuwalnego palcem przez odbytnicę DRE (+). Włączenie tego enzymu do protokołów aktywnego nadzoru (AS) mogłoby przynieść poprawę wykrycia nowotworów istotnych klinicznie.

W trakcie monitorowania odpowiedzi na terapię IMPDH2 byłoby markerem dość swoistym ponieważ wiek, rozmiar prostaty oraz przewlekłe stosowanie najpopularniejszych używek (alkoholu oraz palenia tytoniu) nie mają wpływu na jego stężenie.

Dodatkowo spośród najczęściej występujących chorób podstawowych (nadciśnienia tętniczego, ChNS, cukrzycy, arytmii, kamicy) jedynie cukrzyca i choroba niedokrwienna serca mają na jego stężenie niewielki wpływ. Wyższe IMPDH2 u pacjentów z niskim BMI można w obrębie tej pracy wytłumaczyć kachekcją w zaawansowanych postaciach raka prostaty. To spostrzeżenie umacnia fakt występowania wyższych skali Gleasona u tych chorych.

11.2. Abstract

Introduction: PSA has been the gold standard among markers in both diagnostics and treatment of prostatic carcinoma. In the context of mass screening, its high sensitivity and low specificity lead to a frequent detection of clinically irrelevant tumors. Therefore, it decreases the level of extensive, as well as unnecessary treatment. 18% of tumors is diagnosed without the increasement of the PSA and based on the DRE examination alone. We are in need of a new biomarker for diagnostics, as well as treatment of prostate cancer. New information indicate that Inosine-5'-monophosphate Dehydrogenase II (IMPDH2) could be the solution to this problem.

Purpose of the thesis: The purpose of my thesis is to asses usefulness of IMPDH2 as a new biomarker in both diagnostics and monitoring of prostate cancer, based on marking concentration levels in blood serum.

I marked the IMPDH2 levels at the moment of diagnosing prostatic carcinoma, as well as 6 months after treatment has been implemented. I defined correlation between IMPDH2 concentration and cancer's severity, PSA level, prostate volume, BMI, age and DRE.

I assessed the relationship between IMPDH2 level and the most common underlying pathologies (diabetes, arterial hypertension, heart disorders etc.).

I examined the impact of chronic use of the most popular drugs (alcohol and tobacco) on IMPDH2 concentration.

Materials and methods: The research group consists of inpatients of Urology Department of the Provincial Hospital in Zielona Góra, in years 2013-2014, who were subjects to the following forms of treatment:

- * Radical Prostatectomy
- * RTG-therapy
- * RTG-therapy with adjuvant hormonotherapy
- * Hormonotherapy in monotherapy
- * Watchful Waiting (WW)

The control group consists of randomly selected patients of Urology Department of the Provincial Hospital in Zielona Góra, who were treated for noncancerous urinary system diseases, in years 2013-2014. The research excludes patients with diagnosed prostate cancer, who:

- were subjects to active supervision, radical prostatectomy with adjuvant RTG-therapy, radical prostatectomy with hormonotherapy
- were not subjects to any form of treatment or control
- did not reported to a follow-up visit after 6 months from the treatment implementation
- did not give consent to participate in the research.

The patients who had been subjects to vigilant observation (WW) were only included in phase one of the research (IMPDH2 marking before treatment, during cancer diagnostics).

Results: A group of 88 men with prostate cancer was the subject to the research. Here are their characteristics: Age 57 - 92 years; BMI 15,8 - 40,6 kg/m²; Prostate volume 17 - 200 cm³; Gleason sc. 4 – 10; PSA level 3,98 - 3182 ng/ml; IMPDH2 10,1 - 483,89 pg/ml; Number of biopsies: 1-71 (83%) of inpatients, 2-12 (14%) of inpatients, 3-2 (1%) inpatients, 4-1 (1%) of inpatients, 5-2 (1%) of inpatients; DRE status (+) 20 inpatients; 30 smokers; 15 alcohol abusers; Identified co-existing diseases: diabetes 20 inpatients, arterial hypertension 38 inpatients, arrhythmia 14 inpatients, myocardial infraction 16 inpatients, nephrolithiasis 9 inpatients;

In phase two of the research, after 6 months from the treatment implementation, the following factors were analyzed:

IMPDH2 level 3 - 421,58 pg/ml;

PSA level 0,00 - 113,77ng/ml;

Conclusions: By marking IMPDH2 levels in the moment of diagnosing prostatic carcinoma, no differences in Inosine-5'-monophosphate Dehydrogenase II concentration between patients suffering from prostate cancer and healthy patients, were observed. Additionally, there were no indications of a relationship between PSA level and IMPDH2 level in both of these groups. Due to the aforementioned, the enzyme is not useful as “de novo” marker in prostate tumor diagnostics.

Six months after the treatment implementation, the IMPDH2 concentration, as well as PSA level, had decreased. This allows to assume that the examined relationship might be useful in monitoring the answer to the therapy, after marking its basic concentration as an independent marker.

The other benefit is a clear relation between IMPDH2 and developed forms of prostate cancer. It has a positive correlation with both the Gleason scale and detection of tumor by digital rectal exam (DRE). Inclusion of this enzyme to active supervision protocols could improve detection of clinically relevant tumors.

During the monitoring of the answer to the therapy, IMPDH2 would be quite a peculiar marker because age, prostate volume and chronic use of the most popular drugs (alcohol and tobacco) do not impact its concentration.

Additionally, diabetes and myocardial infraction are the only underlying pathologies (arterial hypertension, myocardial infraction, diabetes, arrhythmia, nephrolithiasis) that have a minor impact on its concentration. In the scope of this thesis, higher IMPDH2 of patients with low BMI can be explained with marasmus in developed forms of prostate cancer. This insight strengthens the fact of higher Gleason scales in case of these inpatients.

12. Piśmiennictwo

-
- ¹ Wojciechowska Urszula, Didkowska Joanna. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej - Curie. Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 20.10.2015r.
- ² International Agency for Research on Cancer World Health Organization. Cancer Mortality Database. <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>
- ³ Hara M, Inorre T, Fukuyama T: Some physico-chemical characteristics of gamma-seminoprotein, an antigenic component specific for human seminal plasma. *Jap J Legal Med* 1971; 25:322-324.
- ⁴ Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979;17:159-163.
- ⁵ Kuriyama M, Wang MC, Papsidero LD. Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. *Cancer res.* 1980;40:4658-4662.
- ⁶ Thompson IM, Pauler DK, Goldman PJ i wsp. Prevalence of prostate cancer among men with prostate-specific antigen level of $< \text{or} = 4.0$ ng per millimeter. *N Engl J. Med* 2004; 350: 2239-48.
- ⁷ Finne P., Auvinen A., Aro J., i wsp. Estimation of prostate cancer risk on the basis of total and free prostate-specific antigen, prostate volume and digital rectal examination. *Eur. Urol.* 2002;41(6):619-626.
- ⁸ Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, Richie JP, deKernion JB, Walsh PC, Scardino PT et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998 May 20;279(19):1542-1547.
- ⁹ Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ: Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 2008 Apr;8 (4):268-78.
- ¹⁰ Nurmikko P, Pettersson K, Piironen T, Hugosson J, Lilja H: Discrimination of prostate cancer from benign disease by plasma measurement of intact, free prostate-specific antigen lacking an internal cleavage site at Lys145-Lys146. *Clin Chem* 2001; 47:1415-1423.
- ¹¹ Slawin KM, Shariat S, Canto E. BPSA: A novel serum marker for benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol.* 2005;7(suppl 8):52-56.
- ¹² Trapasso JG, deKernion JB, Smith RB et al. The incidence and significance of detectable levels of serum prostate specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol* 1994;152(5 pt 2):1821-5.
- ¹³ Partin AW, Pearson JD, Landis PK, et al. Evaluation of serum prostate-specific antigen velocity after radical prostatectomy to distinguish local recurrence from distant metastases. *Urology* 1994 May;43(5):649-59.
- ¹⁴ Hancock SL, Cox RS, Bagshaw MA. Prostate specific antigen after radiotherapy for prostate cancer: a reevaluation of long-term biochemical control and the kinetics of recurrence in patients treated at Stanford University. *J Urol* 1995 Oct;154(4):1412-17.
- ¹⁵ Kane CJ, Amling CL, Johnstone PAS et al. Limited value of bone scintigraphy and computed tomography in assessing biochemical failure after radical prostatectomy. *Urology* 2003;61(3):607-11.
- ¹⁶ Castellucci P, Fuccio C, Nanni C et al. Influence of trigger PSA and PSA kinetics on 11C-Choline PET/CT detection rate in patients with biochemical relapse after radical prostatectomy. *J Nucl Med* 2009 Sep;50(9):1394-400.
- ¹⁷ Boorjian SA, Thompson RH, Tollefson MK et al. Long-term risk of clinical progression after biochemical recurrence following radical prostatectomy: the impact of time from surgery to recurrence. *Eur Urol* 2011 Jun;59(6):893-9.
- ¹⁸ Moul JW, Wu H, Sun L et al. Early versus delayed hormonal therapy for prostate specific antigen only recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 2004 Mar;171:1141-7.
- ¹⁹ Moul JW, Sun L, Hotaling JM, et al. Age adjusted prostate specific antigen and prostate specific antigen velocity cut points in prostate cancer screening. *J Urol.* 2007 177:499-504.
- ²⁰ Stamey TA, Yang N, Hay AR, et al. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987 Oct;317(15):909-16.
- ²¹ Lee F, Littrup PJ, Loft-Christensen L, et al. Predicted prostate specific antigen results using transrectal ultrasound gland volume. Differentiation of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer* 1992;70:211-220.
- ²² Roehrborn CG, Boyle P, Gould AL, et al. Serum prostate-specific antigen as a predictor of prostate volume in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 1999 Mar;53(3):581-9.
- ²³ Prostate specific antigen adjusted for the transition zone volume as a second screening test: A prospective study of 248 cases. Seok-Ho K, Jae-Hyun B, Hong-Seok P, Duck-Ki Yoon et al. *Int J Urol.* 2006 Jul;13(7):910-4.

- ²⁴ DeAntoni EP, Crawford ED, Oesterling JE, Ross CA, Berger ER et al. Age- and race-specific reference ranges for prostate-specific antigen from a large community-based study. *Urology* 1996 Aug;48(2):234-9.
- ²⁵ Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, Lieber MM. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA* 1993 Aug 18;270(7):860-4.
- ²⁶ Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-432.
- ²⁷ Stattini P, Soderberg S, Hallmans G, Bylund A, Kaaks R, Stenman UH, Bergh A, Olsson T. Leptin is associated with increased prostate cancer risk: a nested case - referent study. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:1341-1345.
- ²⁸ Somasundar P, Yu A, Vona-Davis LC, McFadden DW. Differential responses of leptin on cancer in vitro. *J Surg Res.* 2002;113:50.
- ²⁹ Onuma M, Bub JD, Rummel TL, Iwamoto Y. Prostate cancer cell – adipocyte interaction: leptin mediates androgen - independent prostate cell proliferation through c-jun NH2 – terminal kinase. *J Biol Chem.* 2003;278:42660-42667.
- ³⁰ Frankenberry KA, Somasundar P, McFadden DW, Vona-Davis LC. Leptin induces cell migration and the expression of growth factors in human prostate cancer cells. *Am J Surg.* 2004;188:560-565.
- ³¹ Considine RV, Sinah MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive - leptin concentrations in normal - weight and obese humans. *N Engl. J Med.* 1996;334:324-325.
- ³² Bergstrom A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer In Europe. *Int J Cancer* 2001;91:421-430.
- ³³ Bray GA. The underlying basis for obesity: relationship to cancer. *J Nutr.* 2002;132:3451S-3455S.
- ³⁴ Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003;348:1625-1638.
- ³⁵ Saglam K, Aydur E, Yilmaz M, Goktas S. Leptin influences cellular differentiation and progression in prostate cancer. *J Urol.* 2003;169:1308-1311.
- ³⁶ Malendowicz W. Heterogenność płatów prostaty szczura w odniesieniu do ekspresji genów leptyny i izoform jej receptora. Implikacje kliniczne. Katedra i Klinika Urologii i Onkologii Urologicznej, Wydział Lekarski II, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. 2007r.
- ³⁷ Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, I wsp.: DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. December 1999r. *Cancer Res.* 59 (23): 5975–9.
- ³⁸ Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C.: DD3PCA3 RNA analysis in urine- a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur. Urol.* 2004 Aug;46 (2):182-6.
- ³⁹ Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, Brentano S, Mathis J, Pham J, Meyer T, Cass M, Hodge P, Macairan ML, Marks LS, Rittenhouse H. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem.* 2006;52:1089-95.
- ⁴⁰ Whitman EJ, Groskopf J, Ali A, Chen Y, Blase A, Furusato B, Petrovics G, Ibrahim M, Elsamanoudi S, Cullen J. PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. *J Urol.* 2008 Nov;180(5):1975-1978.
- ⁴¹ van Poppel H, Haese A, Graefen M, de la Taille A, Irani J, de Reijke T, Remzi M, Marberger M. The relationship between Prostate CAncer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance. *BJU Int.* 2012 Feb;109(3):360-366.
- ⁴² Auprich M, Chun FK, Ward JF, Pummer K, Babaian R, Augustin H, Luger F, Gutsch S, Budäus L et al. Critical assessment of preoperative urinary prostate cancer antigen 3 on the accuracy of prostate cancer staging. *Eur Urol.* 2011 Jan;59(1):96-105.
- ⁴³ Augustin H, Mayrhofer K, Pummer K, Mannweiler S. Relationship between prostate cancer gene 3 (PCA3) and characteristics of tumor aggressiveness. *Prostate* 2013 Jan;73(2):203-210.
- ⁴⁴ Tsaor I, Hennenlotter J, Oppermann E, Munz M, Kuehs U, Stenzl A, Schilling D. PCA3 and PSA gene activity correlates with the true tumor cell burden in prostate cancer lymph node metastases. *Cancer Biomark.* 2015;15(3):311-316.
- ⁴⁵ IMD Labor Berlin-Potsdam.
<http://www.imd-berlin.de/fachinformationen/diagnostikinformationen/prostatadiagnostik-psa.html>
- ⁴⁶ Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, Furusato B, Sun C, Chen Y, Nau M, Ravindranath L et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 2005 May 26;24(23):3847-52.

- ⁴⁷ Vaarala MH, Porvari K, Kyllonen A, Lukkarinen O, Vihko P. The *TMPRSS2* gene encoding transmembrane serine protease is overexpressed in a majority of prostate cancer patients: detection of mutated *TMPRSS2* form in a case of aggressive disease. *Int J Cancer*. 2001;94:705–710.
- ⁴⁸ Lin B, Ferguson C, White JT, Wang S, Vessella R, True LD, Hood L, Nelson PS. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease *TMPRSS2*. *Cancer Res* 1999;59: 4180–4.
- ⁴⁹ 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.
- ⁵⁰ Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, et al. *TMPRSS2*:*ETV4* gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:3396–400.
- ⁵¹ Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, Laxman B, Cao Q, Prensner JR, Cao X, Singla N, Montie JE, Varambally S, Mehra R, Chinnaiyan AM. Characterization of *TMPRSS2*:*ETV5* and *SLC45A3*:*ETV5* gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:73–80.
- ⁵² Perner S, Demichelis F, Beroukhi R, Schmidt FH, Mosquera JM, Setlur S, Tchinda J, Tomlins SA, Hofer MD, Pienta KG, et al. *TMPRSS2*:*ERG* fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66:8337–8341.
- ⁵³ Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. Expression of variant *TMPRSS2*/*ERG* fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66:8347–8351.
- ⁵⁴ Noninvasive detection of *TMPRSS2*:*ERG* fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer. Laxman B, Tomlins SA, Mehra R, Morris DS, Wang L, Helgeson BE, Shah RB, Rubin MA, Wei JT, Chinnaiyan AM. *Neoplasia*. 2006 Oct;8(10):885–8.
- ⁵⁵ Leyten GH, Hessels D, Jannink SA, Smit FP, de JH, Cornel EB, de Reijke TM, Vergunst H, Kil P, Knipscheer BC, van Oort IM, Mulders PF, Hulsbergen-van de Kaa CA, Schalken JA. Prospective multicentre evaluation of *PCA3* and *TMPRSS2*:*ERG* gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. *Eur Urol* 2014;65:534–42.
- ⁵⁶ Pettersson A, Graff RE, Bauer SR, Pitt MJ, Lis RT, Stack EC, Martin NE, Kunz L, Penney KL et al. The *TMPRSS2*:*ERG* rearrangement, *ERG* expression, and prostate cancer outcomes: a cohort study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Sep;21(9):1497–509.
- ⁵⁷ Perner S, Demichelis F, Beroukhi R, Schmidt FH, Mosquera JM, Setlur S, Tchinda J, Tomlins SA et al. *TMPRSS2*:*ERG* fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66:8337–41
- ⁵⁸ Demichelis F, Fall K, Perner S, Andren O, Schmidt F, Setlur SR, Hoshida Y, Mosquera JM et al. *TMPRSS2*:*ERG* gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 2007;26:4596–9.
- ⁵⁹ Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, Zhou Q, Al-Ahmadie HA, Fine SW, Eastham JA, Scardino PT, Scher HI, Tickoo SK, Reuter VE, Gerald WL. *TMPRSS2*:*ERG* gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res*. 2009;69:1400–6.
- ⁶⁰ Saramaki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. *TMPRSS2*:*ERG* fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3395–400.
- ⁶¹ Fleischmann A, Saramäki OR, Zlobec I, Rotzer D, Genitsch V, Seiler R, Visakorpi T, Thalmann GN. Prevalence and prognostic significance of *TMPRSS2*:*ERG* gene fusion in lymph node positive prostate cancers. *Prostate* 2014 Dec;74(16):1647–1654.
- ⁶² Tomlins SA, Aubin SM, Siddiqui J, Lonigro RJ, Sefton-Miller L, Miick S, Williamsen S, Hodge P, Meinke J, Blase A et al. Urine *TMPRSS2*:*ERG* fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Sci Transl Med*. 2011 Aug 3;3(94):94ra72.
- ⁶³ Mikołajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, Rittenhouse AG, Marks LS, Song W et al. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Res* 2000;60:756–9.
- ⁶⁴ Jansen FH, van Schaik RH, Kurstjens J, Horninger W, Klocker H, Bektic J et al.: Prostate-specific antigen isoform p2PSA in combination with total PSA and free PSA improves diagnostic accuracy in prostate cancer detection. *Eur Urol* 2010;57:921–7.
- ⁶⁵ Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG et al. A multi-center study of [-2]pro-prostate-specific antigen (PSA) in combination with PSA and free PSA for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml PSA range. *J Urol*. 2011 May;185(5):1650–1655.
- ⁶⁶ Loeb S, LJ Sokoll, Broyles DL, Bangma CH, van Schaik RH, Klee GG, Wei Jt, Sanda MG, Partin AW, Slawin KM et al. Prospective multicenter evaluation of the Beckman Coulter Prostate Health Index using WHO calibration. *J Urol*. 2013 May;189(5):1702–6.

- ⁶⁷ Lazzeri M, Abrate A, Lughezzani G, Gadda GM, Freschi M, Mistretta F, Lista G, Fossati N, Larcher A, Kinzikheeva E, Buffi N, Dell'Acqua V, Bini V, Montorsi F, Guazzoni G. Relationship of chronic histologic prostatic inflammation in biopsy specimens with serum isoform [-2]proPSA (p2PSA), %p2PSA, and prostate health index in men with a total prostate-specific antigen of 4-10 ng/ml and normal digital rectal examination. *Urology* 2014 Mar;83(3):606-12.
- ⁶⁸ Stephan C, Jung K, Semjonow A, Schulze-Forster K, Cammann H, Hu X, Meyer HA, Bögemann M, Miller K, Friedersdorff F. Comparative assessment of urinary prostate cancer antigen 3 and TMPRSS2:ERG gene fusion with the serum [-2]prostate-specific antigen-based prostate health index for detection of prostate cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):280-8.
- ⁶⁹ Guazzoni G, Lazzeri M, Nava L, Lughezzani G, Larcher A, Scattoni V, Gadda GM, Bini V, Cestari A et al. Preoperative prostate-specific antigen isoform p2PSA and its derivatives, %p2PSA and prostate health index, predict pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *Eur Urol*. 2012 Mar;61(3):455-466.
- ⁷⁰ Lazzeri M, Haese A, Abrate A, de la Taille A, Redorta JP, McNicholas T, Lughezzani G, Lista G, Larcher A, Bini V, Cestari A et al. Clinical performance of serum prostate-specific antigen isoform [-2]proPSA (p2PSA) and its derivatives, %p2PSA and the prostate health index (PHI), in men with a family history of prostate cancer: results from a multicentre European study, the PROMetheuS project. *BJU int*. 2013 Aug;112(3):313-21.
- ⁷¹ Fossati N, Lazzeri M, Haese A, McNicholas T, de la Taille A, Buffi NM, Lughezzani G, Gadda GM, Lista G, Larcher A, Abrate A, Mistretta F, Bini V, Redorta JP, Graefen M, Guazzoni G. Clinical performance of serum isoform [-2]proPSA (p2PSA), and its derivatives %p2PSA and the Prostate Health Index, in men aged <60 years: results from a multicentric European study. *BJU int*. 2015 Jun;115(6):913-20.
- ⁷² Haese A, Graefen M, Steuber T, Becker C, Pettersson K, Piironen T, Noldus J, Huland H, Lilja H. Human glandular kallikrein 2 levels in serum for discrimination of pathologically organ-confined from locally-advanced prostate cancer in total PSA-levels below 10 ng/ml. *Prostate* 2001 Oct 1;49(2):101-9.
- ⁷³ Steuber T, Nurmikko P, Haese A, Pettersson K, Graefen M, Hammerer P, Huland H, Lilja H. Discrimination of benign from malignant prostatic disease by selective measurements of single chain, intact free prostate specific antigen. *J Urol*. 2002 Nov;168(5):1917-22.
- ⁷⁴ Vickers AJ, Cronin AM, Aus G, Pihl CG, Becker C, Pettersson K, Scardino PT, Hugosson J, Lilja H. A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Göteborg, Sweden. *BMC Med*. 2008 Jul 8;6:19.
- ⁷⁵ Vickers AJ, Cronin AM, Aus G, Pihl CG, Becker C, Pettersson K, Scardino PT, Hugosson J, Lilja H. Impact of recent screening on predicting the outcome of prostate cancer biopsy in men with elevated prostate-specific antigen: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Gothenburg, Sweden. *Cancer*. 2010 Jun 1;116(11):2612-20.
- ⁷⁶ Vickers AJ, Cronin AM, Roobol MJ, Savage CJ, Peltola M, Pettersson K, Scardino PT, Schröder FH, Lilja H. A four-kallikrein panel predicts prostate cancer in men with recent screening: data from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, Rotterdam. *Clin Cancer Res*. 2010 Jun 15;16(12):3232-9.
- ⁷⁷ Voigt JD, Zappala SM, Vaughan ED, Wein AJ. The Kallikrein Panel for prostate cancer screening: its economic impact. *Prostate* 2014 Feb;74(3):250-9.
- ⁷⁸ Parekh DJ, Punnen S, Sjöberg DD, Asroff SW, Bailen JL, Cochran JS, Concepcion R, David RD, Deck KB, Dumbadze I, Gambla M, Grable MS, Henderson RJ, Karsh L, Kirsch EB et al. A multi-institutional prospective trial in the USA confirms that the 4KScore accurately identifies men with high-grade prostate cancer. *Eur Urol*. 2015 Sep;68(3):464-70.
- ⁷⁹ Carlsson S, Maschino A, Schröder F, Bangma C, Steyerberg EW, van der Kwast T, van Leenders G, Vickers A, Lilja H, Roobol MJ. Predictive value of four kallikrein markers for pathologically insignificant compared with aggressive prostate cancer in radical prostatectomy specimens: results from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer section Rotterdam. *Eur Urol*. 2013 Nov;64(5):693-699.
- ⁸⁰ Lilja HJ, Vickers AJ, Sjöberg D et al. Improving the specificity of prostate cancer screening for early detection of lethal disease. *J Clin Oncol*. 2014;32:5s suppl; abstr 5081.
- ⁸¹ Hasui Y, Marutsuka K, Asada Y, Ide H, Nishi S, Osada Y. Relationship between serum prostate specific antigen and histological prostatitis in patients with benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1994;25:91-96.
- ⁸² Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J Urol*. 1995;154:407-413.
- ⁸³ Punglia RS, D'Amico AV, Catalona WJ, Roehl KA, Kuntz KM. Impact of age, benign prostatic hyperplasia, and cancer on prostate-specific antigen level. *Cancer* 2006 Apr 1;106(7):1507-1513.

- ⁸⁴ Roehrborn CG, Pickens GJ, Carmody T 3rd. Variability of repeated serum prostate-specific antigen (PSA) measurements within less than 90 days in a well-defined patient population. *Urology*. 1996 Jan;47(1):59-66.
- ⁸⁵ Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level $\leq$ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 2004 May 27;350(22):2239-2246.
- ⁸⁶ Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL Jr, Beard JH, Pond HS, Terry WJ, Igel TC, Kidd DD. Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol*. 1990 Jun;143(6):1146-1152.
- ⁸⁷ Roth HJ, Stewart SC, Brawer MK. A comparison of three free and total PSA assays. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 1998 Dec;1(6):326-331.
- ⁸⁸ Brawer MK, Meyer GE, Letran JL, Bankson DD, Morris DL, Yeung KK, Allard WJ. Measurement of complexed PSA improves specificity for early detection of prostate cancer. *Urology*. 1998 Sep;52(3):372-8.
- ⁸⁹ Moyer VA, U.S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2012 Jul 17;157(2):120-134.
- ⁹⁰ Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, Fouad MN, Isaacs C, Kvale PA, Reding DJ, Weissfeld JL et al. Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Jan 18; 104(2):125-132.
- ⁹¹ Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Wever E, Gulati R, Feuer E et al. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:374-83.
- ⁹² Nam RK, Saskin R, Lee Y, Liu Y, Law C, Klotz LH, Loblaw DA, Trachtenberg J, Stanimirovic A, Simor AE, Seth A, Urbach DR, Narod SA. Increasing hospital admission rates for urological complications after transrectal ultrasound guided prostate biopsy. *J Urol*. 2010 Mar;183(3):963-968.
- ⁹³ Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW: *Biochemia Harpera*. Wyd. PZWL Warszawa 2006r. s.474-481.
- ⁹⁴ Hedstrom L: IMP Dehydrogenase: structure, mechanism and inhibition. *Chem Rev*. 2009; 109(7):2903
- ⁹⁵ Natsumeda Y, Ohno S, Kawasaki H, Konno Y, Weber G, Suzuki K: Two distinct cDNAs from human IMP dehydrogenase *J Biol. Chem*. 1990; 265:5292-5295.
- ⁹⁶ Nagai M, Natsumeda Y, Weber G: Selective up-regulation of type II Inosine 5'-monophosphate Dehydrogenase messenger RNA expression in human leukemias. *Cancer Res*. 1992; 52:258-261.
- ⁹⁷ Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, Yamaji Y, Ohno S, Suzuki K, Weber G: Expression of human IMP dehydrogenase types I and II in *Escherichia coli* and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. *J Biol. Chem*. 1991;266:506-509.
- ⁹⁸ Vittori S, Camaioni E, Costanzi S, Volpini R, Lupidi G, Cristalli G: Structure-activity relationships of adenosine deaminase inhibitors. *Nucleosides and Nucleotides* 1999,18 (4)-(5).
- ⁹⁹ Kizaki H, Williams JC, Morris HP, Weber G: Increased cytidine 5'-triphosphate synthetase activity in rat and human tumors. *Cancer res*. 1980 Nov;40(11):3921-7.
- ¹⁰⁰ Jackson RC, Weber G, Morris HP: IMP dehydrogenase: An enzyme linked with proliferation and malignancy. *Nature* 1975; 256:331.
- ¹⁰¹ Knight RD, Mangum J, Lucas DL, Cooney DA, Khan EC, Wright DG: Inosine monophosphate dehydrogenase and myeloid cell maturation. *Blood* 1987; 69:634.
- ¹⁰² Lucas DL, Webster HK, Wright DG: Purine metabolism In myeloid precursor cells during maturation. *J Clin Invest* 1983;72:1889.
- ¹⁰³ Collart FR, Chubb CB, Mirkin BL, Huberman E: Increased Inosine-5'-phosphate Dehydrogenase gene expression in solid tumor tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* 1992;52:5826.
- ¹⁰⁴ Balzarini J, Karlsson A, Wang L, Bohman C, Horska K, Votruba I, Fridland A, Van Aerschot A, Herdewijn P, De Clercq E. Eicar (5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide). A novel potent inhibitor of inosinate dehydrogenase activity and guanylate biosynthesis. *J Biol Chem*. 1993 Nov 25;268(33):24591-24598.
- ¹⁰⁵ Zou J, Han Z, Zhou L, Cai C, Luo H, Huang Y, Liang Y, He H, Jiang F, Wang C, Zhong W. Elevated expression of IMPDH2 is associated with progression of kidney and bladder cancer. *Med Oncol*. 2015 Jan;32(1):373.
- ¹⁰⁶ Floryk D, Tollaksen LS, Giometti C: Differentiation of human prostate cancer PC-3 cells induced by inhibitors of Inosine 5'-monophosphate Dehydrogenase. *Cancer Res*. 2004;64:9049-9056.
- ¹⁰⁷ Floryk D, Huberman E: Mycophenolic acid-induced replication arrest, differentiation markers and cell death of androgen-independent prostate cancer cells DU145. *Cancer Letters* 2006;231:20-29.
- ¹⁰⁸ Guyon I, Fritsche H, Choppa P, Yang Li-Ying, Barnhill S. A Four-Gene Expression Signature for Prostate Cancer Cells Consisting of UAP1, PDLIM5, IMPDH2, and HSPD1. *UroToday International Journal*. 2009;2(4):3834-3844.

- ¹⁰⁹ Zhao-dong H, Yan-qiong Z, Hui-chan H, Qi-shan D, et al.: Identification of novel serological tumor markers for human prostate cancer using integrative transcriptome and proteome analysis *Med Oncol*. 2012;29(4):2877-2888.
- ¹¹⁰ Zhou L, Xia D, Zhu J, Chen Y, Chen G, Mo R, Zeng Y, Dai Q, He H, Liang Y, Jiang F, Zhong W. Enhanced expression of IMPDH2 promotes metastasis and advanced tumor progression in patients with prostate cancer. *Clin Transl Oncol*. 2014 Oct;16(10):906-913.
- ¹¹¹ Woronowicz B. Czy można pić bezpiecznie? (pol.). Internetowy Serwis Abstynentów Od Alkoholu. [dostęp 2013-07-11].
- ¹¹² American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2005. Atlanta: American Cancer Society.
- ¹¹³ Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC et al.: The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J. Urol* 1984; 132:474-479.
- ¹¹⁴ Isaacs JT, Coffey DS: Etiology and disease processes of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1989;2 (Suppl 2):33-40.
- ¹¹⁵ Guess HA, Arrighi HM, Metter EJ, et al.: The cumulative prevalence of prostatism matches the autopsy prevalence of benign prostatic hyperplasia (Baltimore Longitudinal Study of Aging). *Prostate* 1990; 17:241-246.
- ¹¹⁶ National Collaborating Centre for Cancer (UK). Prostate Cancer: Diagnosis and Treatment. NICE Clinical Guidelines, No. 175.:54
- ¹¹⁷ Albertsen PC, Hanley JA, Barrows GH, Penson DF, Kowalczyk PD, Sanders MM, Fine J: Prostate Cancer and the Will Rogers Phenomenon. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1248 – 1253.
- ¹¹⁸ Esposito K, Chiodini P, Capuano A, Bellastella G, Maiorino MI, Parretta E, Lenzi A, Giugliano D: Effect of metabolic syndrome and its components on prostate cancer risk: meta-analysis. *J Endocrinol Invest*. 2013;36:132.
- ¹¹⁹ Van Hemelrijck M, Garmo H, Holmberg L, Ingelsson E, Bratt O, Bill-Axelsson A, Lambe M, Stattin P, Adolfsson J: Absolute and relative risk of cardiovascular disease in men with prostate cancer: results from the Population-Based PCBaSe Sweden. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 20;28(21):3448-3456.
- ¹²⁰ Lee MS, Finch W, Mahmud E: Cardiovascular complications of radiotherapy. *Am J Cardiol*. 2013 Nov 15;112(10):1688-1696.
- ¹²¹ van den Belt-Dusebout AW, Nuver J, de Wit R, Gietema JA, ten Bokkel Huinink WW, Rodrigus PT, Schimmel EC, Aleman BM, van Leeuwen FE. Long-term risk of cardiovascular disease in 5-year survivors of testicular cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 20;24(3):467-475.
- ¹²² Ross R: Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
- ¹²³ Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24; 454(7203):436-444.
- ¹²⁴ Whitlock MC, Yeboah J, Burke GL, Chen H, Klepin HD, Hundley WG: Cancer and Its Association With the Development of Coronary Artery Calcification: An Assessment From the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2015 Nov 9;4(11).
- ¹²⁵ Dankner R, Boffetta P, Balicer RD, Boker LK, Sadeh M, Berlin A, Olmer L, Goldfracht M, Freedman LS: Time-Dependent risk of cancer after a diabetes diagnosis in a cohort of 2.3 million adults. *Am J Epidemiol*. 2016 Jun 15;83 (12):1098-1106.
- ¹²⁶ Ji J, Sundquist J, Sundquist K: Association of family history of type 2 diabetes with prostate cancer: A national cohort study. *Front Oncol*. 2016 Aug 29;6:194.
- ¹²⁷ Lee J, Giovannucci E, Jeon JY: Diabetes and mortality in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Springerplus* 2016 Sep 13;5(1):1548.
- ¹²⁸ Dankner R, Boffetta P, Keinan-Boker L, Balicer RD, Berlin A, Olmer L, Murad H, Silverman B, Hoshen M, Freedman LS. Diabetes, prostate cancer screening and risk of low- and high-grade prostate cancer: an 11 year historical population follow-up study of more than 1 million men. *Diabetologia* 2016Aug;59(8):1683-1691.
- ¹²⁹ La Vecchia C, Franceschi S, Talamini R, Negri E, Boyle P, D'Avanzo B: Marital status, indicators of sexual activity and prostatic cancer. *J Epidemiol Community Health*. 1993 Dec; 47(6): 450–453.
- ¹³⁰ Ilić M, Vlajinac H, Marinković J. Case-control study of risk factors for prostate cancer. *Br J Cancer*. 1996 Nov;74(10):1682-1686.
- ¹³¹ Jackman SV, Kibel AS, Ovuworie CA, Moore RG, Kavoussi LR, Jarrett TW. Familial calcium stone disease: TaqI polymorphism and the vitamin D receptor. *J Endourol*. 1999 May;13(4):313-316.
- ¹³² Seyhan S, Yavascaoglu I, Kilcarslan H, Dogan HS, Kordan Y. Association of vitamin D receptor gene Taq I polymorphism with recurrent urolithiasis in children. *Int J Urol*. 2007 Dec;14(12):1060-1062.

- ¹³³ Demoury C, Karakiewicz P, Parent ME. Association between lifetime alcohol consumption and prostate cancer risk: A case-control study in Montreal, Canada. *Cancer Epidemiol.* 2016 Sep 21;45:11-17.
- ¹³⁴ Menezes RF, Bergmann A, Aguiar SS, Thuler LC. Alcohol consumption and the risk of cancer in Brazil: a study involving 203,506 cancer patients. *Alcohol* 2015; 49 (7):747–751.
- ¹³⁵ Ketcham AS, Wexler H, Mantel N. Effects of alcohol in mouse neoplasia. *Cancer Res.* 1963 Jun;23:667-70.
- ¹³⁶ Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol.* 2004 May-Jun;39(3):155-65.
- ¹³⁷ López-Lázaro M. A local mechanism by which alcohol consumption causes cancer. *Oral Oncol.* 2016 Oct; 62:149-152.
- ¹³⁸ Wallgren, H. Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol: Effect on biological membranes. In: *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 1. Oxford: Pergamon, 1970. pp. 161-188
- ¹³⁹ Florek E. Skład chemiczny i kancerogeny dymu tytoniowego. *Alkoholizm i narkomania* 1999;36 (3).
- ¹⁴⁰ American Cancer Society. Carcinogens in tobacco products. <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/tobaccocancer/carcinogens-found-in-tobacco-products>
- ¹⁴¹ How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2010.
- ¹⁴² Huncharek M, Haddock KS, Reid R, Kupelnick B. Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *Am J Public Health.* 2010 Apr;100(4):693-701.
- ¹⁴³ Rohrmann S, Linseisen J, Allen N, Bueno-de-Mesquita HB, Johnsen NF, Tjønneland A, Overvad K et al. Smoking and the risk of prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer.* 2013 Feb 19;108(3):708-14.
- ¹⁴⁴ Carter BD, Abnet CC, Feskanich D, Freedman ND, Hartge P, Lewis CE, Ockene JK, Prentice RL, Speizer FE, Thun MJ, Jacobs EJ. Smoking and mortality--beyond established causes. *N Engl J Med.* 2015 Feb 12;372(7): 631-40.
- ¹⁴⁵ Moreira DM, Aronson WJ, Terris MK, Kane CJ, Amling CL, Cooperberg MR, Boffetta P, Freedland SJ. Cigarette smoking is associated with an increased risk of biochemical disease recurrence, metastasis, castration-resistant prostate cancer, and mortality after radical prostatectomy: results from the SEARCH database. *Cancer.* 2014 Jan 15;120(2):197-204. Erratum *Cancer.* 2015 Dec 1;121(23):4272.
- ¹⁴⁶ Preston MA, Riis AH, Ehrenstein V, Breau RH, Batista JL, Olumi AF, Mucci LA, Adami HO, Sørensen HT. Metformin use and prostate cancer risk.
- ¹⁴⁷ Moul JW. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. *J Urol.* 2000 Jun;163(6):1632-42
- ¹⁴⁸ Roach M 3rd¹, Hanks G, Thames H Jr, Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, Sandler H. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Jul 15;65(4):965-74.
- ¹⁴⁹ Wieczorek P, Bałut-Wieczorek M, Jasinski M, Szabłoński W, Antczak A. Inosine monophosphate dehydrogenase 2 as a marker of aggressive and advanced prostate cancer. *Cent European J Urol.* 2018;71: 399-403.
- ¹⁵⁰ Panebianco V, Narumi Y, Altun E, Bochner BH, Efsthathiou JA, Hafeez S, Huddart R, Kennish S, Lerner S, Montironi R, Muglia VF, Salomon G, Thomas S, Vargas HA, Witjes JA, Takeuchi M, Barentsz J, Catto JWF. Multiparametric Magnetic Resonance Imaging for Bladder Cancer: Development of VI-RADS (Vesical Imaging-Reporting And Data System). *Eur Urol.* 2018 Sep;74(3):294-306.
- ¹⁵¹ Thoeny HC, Barbieri S, Froehlich JM, Turkbey B, Choyke PL. Functional and Targeted Lymph Node Imaging in Prostate Cancer: Current Status and Future Challenges. *Radiology.* 2017 Dec;285(3):728-743.
- ¹⁵² Wallitt KL, Khan SR, Dubash S, Tam HH, Khan S, Barwick TD. Clinical PET Imaging in Prostate Cancer. *Radiographics.* 2017 Sep-Oct;37(5):1512-1536.
- ¹⁵³ Vagnoni V, Brunocilla E, Bianchi L, Porreca A, Borghesi M, Pultrone CV, Angelo P, Chessa F, Ceci F, Mengoni F, Dababneh H, Castellucci P, Fanti S, Martorana G, Schiavina R. State of the art of PET/CT with 11-choline and 18F-fluorocholine in the diagnosis and follow-up of localized and locally advanced prostate cancer. *Arch Esp Urol.* 2015 Apr;68(3):354-70.
- ¹⁵⁴ Dadfar SM, Roemhild K, Drude NI, von Stillfried S, Knüchel R, Kiessling F, Lammers T. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019 Jan 10. PII: S0169-409X(19)30005-5.
- ¹⁵⁵ Birkhäuser FD, Studer UE, Froehlich JM, Triantafyllou M, Bains LJ, Petralia G, Vermathen P, Fleischmann A, Thoeny HC. Combined ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide-enhanced and diffusion-weighted

magnetic resonance imaging facilitates detection of metastases in normal-sized pelvic lymph nodes of patients with bladder and prostate cancer. *Eur Urol.* 2013 Dec;64(6):953-60.

¹⁵⁶ Perera M, Papa N, Christidis D, Wetherell D, Hofman MS, Murphy DG, Bolton D, Lawrentschuk N. Sensitivity, Specificity, and Predictors of Positive ⁶⁸Ga-Prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography in Advanced Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol.* 2016 Dec;70(6):926-937.

¹⁵⁷ Gordon RT, Schatz CB, Myers LJ, Kosty M, Gonczy C, Kroener J, Tran M, Kurtzhals P, Heath S, Koziol JA, Arthur N, Gabriel M, Hempling J, Hempling G, Nesbitt S, Tucker-Clark L, Zaayer J. The use of canines in the detection of human cancers. *J Altern Complement Med.* 2008 Jan-Feb;14(1):61-7.

¹⁵⁸ Taverna G, Tidu L, Grizzi F, Torri V, Mandressi A, Sardella P, La Torre G, Cocciolone G, Seveso M, Giusti G, Hurle R, Santoro A, Graziotti P. Olfactory system of highly trained dogs detects prostate cancer in urine samples. *J Urol.* 2015 Apr;193(4):1382-7.

¹⁵⁹ Trujillo KA, Jones AC, Griffith JK, Bisoffi M. Markers of field cancerization: proposed clinical applications in prostate biopsies. *Prostate Cancer.* 2012;2012:302894.

¹⁶⁰ Stewart GD, Van Neste L, Delvenne P, Delr  e P, Delga A, McNeill SA, O'Donnell M, Clark J, Van Criekinge W, Bigley J, Harrison DJ. Clinical utility of an epigenetic assay to detect occult prostate cancer in histopathologically negative biopsies: results of the MATLOC study. *J Urol.* 2013 Mar;189(3):1110-6.

¹⁶¹ Partin AW, Van Neste L, Klein EA, Marks LS et al. Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. *J Urol.* 2014 Oct;192(4):1081-7.

¹⁶² Van Neste L, Hendriks RJ, Dijkstra S, Trooskens G, Cornel EB, Jannink SA, de Jong H, Hessels D, Smit FP et al. Detection of High-grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker-Based Risk Score. *Eur Urol.* 2016 Nov;70(5):740-748.

¹⁶³ Govers TM, Caba L, Resnick MJ. Cost-Effectiveness of Urinary Biomarker Panel in Prostate Cancer Risk Assessment. *J Urol.* 2018 Dec;200(6):1221-1226.

¹⁶⁴ Klotz LH, Tenniswood M, Tilki D, DiRienzo DA, Wang WL. miR Scientific Sentinel Scores- a New Platform Technology for Identification of Clinically Significant Prostate Cancer Using miRNA and snoRNA Expression Signatures. 34th Annual European Association of Urology Congress 2019r. Barcelona, Biomarkers Panel.

¹⁶⁵ Alford AV, Brito JM, Yadav KK, Yadav SS, Tewari AK, Renzulli J. The Use of Biomarkers in Prostate Cancer Screening and Treatment. *Rev Urol.* 2017;19(4):221-234.

¹⁶⁶ Wei L, Wang J, Lampert E, Schlanger S, DePriest AD, Hu Q, Gomez EC, Murakam M, Glenn ST, Conroy J, Morrison C, Azabdaftari G, Mohler JL, Liu S, Heemers HV. Intratumoral and Intertumoral Genomic Heterogeneity of Multifocal Localized Prostate Cancer Impacts Molecular Classifications and Genomic Prognosticators. *Eur Urol.* 2017 Feb;71(2):183-192.

¹⁶⁷ Leapman MS, Nguyen HG, Cowan JE, Xue L, Stohr B, Simko J, Cooperberg MR, Carroll PR. Comparing Prognostic Utility of a Single-marker Immunohistochemistry Approach with Commercial Gene Expression Profiling Following Radical Prostatectomy. *Eur Urol.* 2018 Nov;74(5):668-675.