

# Dijagnostička vrijednost serumske koncentracije kemokina CXCL13 u bolesnika s karcinomom prostate

---

Marić, Marjan

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:008514>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marjan Marić**

**Dijagnostička vrijednost serumske  
koncentracije kemokina CXCL13 u  
bolesnika s karcinomom prostate**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2022.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marjan Marić**

**Dijagnostička vrijednost serumske  
koncentracije kemokina CXCL13 u  
bolesnika s karcinomom prostate**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2022.

**Doktorski rad je izrađen u Klinici za urologiju KBC Zagreb**

**Voditelji rada:** Akademik Željko Kaštelan, predstojnik Klinike za urologiju KBC Zagreb, redoviti profesor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

**Zahvala:**

Zahvaljujem svom mentoru, akademiku Željku Kaštelanu na uloženom trudu, vrijednim savjetima i nesebičnoj pomoći. Također, velika hvala doc.dr.sc. Snježani Židovec Lepej i njenom timu na pomoći u izvođenju laboratorijskih analiza te prof.dr.sc. Tvrtku Hudolinu na kritičkom čitanju disertacije. Hvala mojoj obitelji na strpljenju i podršci.

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	PROSTATA .....	2
1.1.1.	Anatomija prostate .....	2
1.1.2.	Histološka građa .....	3
1.1.3.	Uloga prostate u reproduktivnoj funkciji .....	3
1.1.4.	Prostata Specifični Antigen (PSA) .....	5
1.2.	BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE .....	6
1.3.	KARCINOM PROSTATE .....	8
1.3.1.	Epidemiologija karcinoma prostate .....	8
1.3.2.	Etiopatogeneza karcinoma prostate .....	10
1.3.3.	Gleasonov zbroj .....	11
1.3.4.	Klasifikacija Međunarodnog društva za urološku patologiju (engl. International Society of Urological Pathology (ISUP)) .....	11
1.4.	IMUNOLOŠKO PREPOZNAVANJE .....	13
1.4.1.	Citokini .....	13
1.4.2.	Kemokini .....	14
1.4.3.	CXCL13 .....	15
1.4.4.	Kemokini u malignim bolestima .....	17
1.4.5.	Kemokini u karcinomu prostate .....	18
2.	HIPOTEZA .....	20
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	21
4.	ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA .....	22
4.1.	Ispitanici .....	22
4.2.	Biološki uzorci .....	22
4.3.	Biopsija prostate .....	23

4.4. Metode .....	23
4.4.1. Analiza prostata specifičnog antigena .....	23
4.4.2. Kvantifikacija kemokina CXCL13 u serumu .....	24
4.5. Statističke metode .....	24
5. REZULTATI .....	26
5.1. Opća i klinička obilježja ispitanika .....	26
5.2. Razlike u vrijednostima PSA, volumena i serumske koncentracije kemokina CXCL13 u odnosu na skupine .....	29
5.3. Povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13, dobi pacijenata, vrijednosti PSA, f/t PSA i volumena prostate .....	34
5.3.1. Utjecaj serumske koncentracije kemokina CXCL13 i PSA na vjerojatnost pozitivnog nalaza biopsije (regresijska analiza) .....	36
5.3.2. Uloga PSA i kemokina CXCL13 u pozitivnom nalazu biopsije (ROC analiza).....	37
5.4. Gleasonov zbroj i ISUP klasifikacija oboljelih od karcinoma prostate .....	39
5.4.1. Utjecaj serumske koncentracije kemokina CXCL13 i PSA na vjerojatnost većeg rizika (ISUP gradus> 1) regresijska analiza .....	46
5.4.2. Uloga tumorskog markera PSA i kemokina CXCL13 kod ispitanika s većim rizikom (ISUP > 1) u skupini s karcinomom prostate (ROC analiza) .....	47
6. RASPRAVA .....	49
7. ZAKLJUČCI .....	56
8. SAŽETAK .....	57
9. SUMMARY .....	58
10. LITERATURA .....	59
11. ŽIVOTOPIS .....	69

## PRILOZI

### - POPIS TABLICA I SLIKA

### POPIS OZNAKA I KRATICA

PSA Prostata Specifični Antigen

KP karcinom prostate

BHP benigna hiperplazija prostate

SZ središnja zona

TZ tranzicijska zona

PZ periferna zona

hKLK humani kalikrein

f/t PSA omjer slobodnog u odnosu na vezani prostata specifični antigen

DHT dihidrotestosteron

DNK deoksiribonukleinska kiselina

RNK ribonukleinska kiselina

5ARI 5 $\alpha$ -reduktaza

IARC Međunarodna Agencija za Istraživanje Raka (engl. International Agency for Research on Cancer)

GZ Gleasonov zbroj (engl. Gleason Score)

ISUP Međunarodno Društvo za Urološku Patologiju (engl. International Society of Urological Pathology)

IFN interferon

CSF čimbenici stimulacije kolonija (engl. colony stimulating factors)

CR kemokinski receptor

BLC B-limfocitni kemoatraktant (engl. B-lymphocyte chemoattractant)

BLR-1 receptor Burkittovog limfoma 1 (engl. Burkitt`s lymphoma receptor 1)

MS multipla skleroza

RA reumatoidni artritis

VEGF faktor rasta vaskularnog endotela (engl. vascular endothelial growth factor)

RLU relativne svjetlosne jedinice (engl. relative light units)

SD standardna devijacija

CT kompjuterizirana tomografija (engl. computer tomography)

AUC površina ispod krivulje (engl. area under the curve)

STAT3 transduktor signala i aktivator transkripcije 3 (engl. signal transducer and activator of transcription 3)

ERK vanstaničnim signalom regulirana kinaza (engl. extracellular-signal-regulated kinase)

ERSPC Europska randomizirana studija probira na KP (engl. European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer)

PLCO Prostata, Pluća, Kolorektum i Jajnik (engl. Prostate, Lung, Colorectal, Ovarian)

PHI indeks zdravlja prostate (engl. Prostate Health Index)

JNK Jun N-terminalna kinaza



## 1. UVOD

Prostata je pomoćni organ muškog reproduktivnog trakta i njena je glavna funkcija proizvodnja i izlučivanje proteina koji čine veći dio volumena ejakulata. Općenito, primarna funkcija prostatičnog sekreta odnosi se na neutralizaciju kiselog medija koji se nalazi u rodnici, osiguravanje energije za spermatozoite te razgradnju matriksa kojeg čine seminogelini 1 i 2 (nakon ejakulacije i formiranja koaguluma u rodnici). Određeni proteini koji se izlučuju iz prostate također sudjeluju u procesu kapacitacije spermatozoida te u interakciji s cervikalnom sluzi(1). Nakon ejakulacije stvara se mekani koagulum u rodnici da bi se potom u razdoblju od 5 do 20 minuta isti razgradio uslijed djelovanja prostate specifičnog antigena (PSA) na matriks kojeg tvore seminogelini 1 i 2 (2). PSA je u svojoj suštini tkivna serinska proteaza tipa kalikreina i jedan od glavnih sekretornih produkata prostate. Unatrag trideset godina PSA je poznat po širokoj upotrebi u probiru na karcinom prostate (KP), a proizvodi se u cilindričnim stanicama epitela prostate koje ga potom luče direktno u lumen. U normalnim uvjetima ovaj protein ne prelazi epitelnu bazalnu membranu i ne nalazi se u krvotoku odraslih muškaraca. Međutim, u uvjetima kada je narušena normalna arhitektura prostate, poput kronične upale, benigne hiperplazije ili karcinoma, PSA može ući u stromu prostate te se može otkriti u krvotoku (3). Nakon uvođenja PSA u probir bolesnika na KP krajem 1980-ih u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), došlo je do značajnog pomaka u stadiju novootkrivenih karcinoma prema lokalno ograničenim kao i u incidenciji prema dobnim skupinama što je sve skupa dovelo do smanjenja u ukupnom mortalitetu. Podaci koji se mogu dobiti iz baze podataka "Nadzor, epidemiologija i krajnji rezultati" (engl. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)) pokazuju da se u navedenom vremenskom razdoblju postotak novootkrivenih bolesnika sa metastatskim karcinomom prostate u SAD smanjio sa 16% u periodu između 1985-1989 na samo 4% u 2003. godini (4). Probir na KP zasnovan na PSA često dovodi do dijagnoze lokalno ograničenog i histološki indolentnog karcinoma koji vjerojatno ne bi značajno ugrozio dijagnosticirane muškarce kroz njihov preostali životni vijek, te je samim time liječenje radikalnom prostatektomijom ili iradijacijom koje ih izlaže značajnim neželjenim posljedicama upitno. Meta analize velikih randomiziranih studija su pokazale da se udio ovakvih bolesnika u ukupnom broju kreće između 20% i 50% (5).

## 1.1. PROSTATATA

### 1.1.1. Anatomija

Prostata se nalazi u ekstraperitonealnom prostoru između zdjelične dijafragme i peritonealne šupljine. Smještena je sa stražnje strane simfize stidne kosti, ispred rektuma i ispod mokraćnog mjehura te je svojim položajem dostupna za digitorektalni pregled (DRP). Opisana kao "kestenjača", konusnog je oblika i okružuje proksimalnu uretru pri izlasku iz mjehura. Prostata se sastoji od baze, vrha, prednje, stražnje površine. Baza prostate je spojena s vratom mjehura, a prostatična uretra prolazi kroz njezinu sredinu blizu prednje stijenke, koja je uska i konveksnog oblika. Vrh prostate se oslanja na gornju površinu urogenitalne dijafragme i dodiruje medijalnu površinu mišića levatora ani. Stražnja površina je trokutasta, ravna i naslonjena na prednji zid rektuma. Lateralna površina prostate spaja se s prednjom i naslanja se na fasciju levatora ani iznad urogenitalne dijafragme.

Prostata se sastoji od žljezdanih i stromalnih elemenata koji su prema njezinoj periferiji čvrsto srasli i tvore pseudokapsulu. Unutarnji sloj pseudokapsule prostate sastoji se od glatkih mišića dok je vanjski sloj sačinjen od kolagena. Prostata je inervirana parasimpatetičkim živčanim vlaknima pelvinih splanhičkih živaca putem donjeg hipogastričnog plexusa od kojeg se odvajaju vlakna za prostatički plexus. Ova vlakna su odgovorna za regulaciju sekrecije iz acinusa prostatične žlijezde. Donji hipogastrični plexus također prima preganglijska simpatička vlakna iz gornjeg hipogastričnog plexusa za motoričku inervaciju glatkih mišića strome žlijezde (kontrola ejakulacije i kontrakcije glatkih mišića). Kako je prostata u uskoj anatomskoj vezi s mokraćnim mjehurom, ona s njime dijeli i opskrbu krvlju. Donja vezikularna arterija čini glavninu opskrbe prostate krvlju, dok dio krvi dolazi iz srednje rektalne i unutarnje pudendalne arterije. Vene oko prostate čine plexus koji odvodi krv u unutarnje ilijačne vene. Limfa prostate se većim dijelom drenira u unutarnje ilijačne i obturatorne limfne čvorove. Manji dio limfne drenaže može u početku proći kroz presakralne ili rjeđe kroz vanjske ilijačne limfne čvorove.

Prostata je podijeljena u 3 zone: središnju zonu (SZ), tranzicijsku zonu (TZ) i perifernu zonu (PZ). Te zone imaju različito embrionalno podrijetlo i razlikuju se po histologiji, anatomskim obilježjima, biološkim funkcijama kao i osjetljivosti na patološke poremećaje (6). Poznato je da 70% svih karcinoma prostate potječe od PZ, koja se primarno tijekom embriogeneze razvija iz urogenitalnog sinusa. Suprotno tome, SZ, koja je podrijetla iz Wolfvog kanala, ima vrlo

nisku učestalost karcinoma prostate. Zanimljivo je da iako je TZ embrionalno istog porijekla kao i PZ, postotak KP koji proizlazi iz TZ je oko 25%. Isto se može objasniti razlikama u stromalnoj komponenti ove dvije zone. Stroma TZ više je fibromuskularna u odnosu na PZ i pretpostavlja se da je benigna hiperplazija prostate (BPH), koja pretežno nastaje u TZ, bolest fibromuskularne strome (7).

### **1.1.2. Histološka građa**

Prostata odraslog čovjeka je tubuloalveolarna žlijezda sastavljena od kanalića obloženih pseudostratificiranim cilindričnim epitelom. Sekretorne stanice koje oblažu kanale cilindričnog su oblika s jezgrama smještenima u bazi stanice. Gotovo kontinuirani sloj bazalnih epitelnih stanica naslanja se na bazalnu membranu sekretornih stanica i ima važnu ulogu u parakrinoj regulaciji njihove funkcije (8). Postoji i treći tip, neuroendokrine stanice, ali one su rijetke i raštrkane po acinusima i kanalićima te je njihova uloga u funkciji prostate većim dijelom nepoznata (9). Prostatične žlijezde variraju u veličini i imaju lumene koji su obloženi naborima vezivnog tkiva. Konkrecije prostate (precipitacije sekreta) također se mogu naći u lumenu prostatičnih žlijezda i indikativne su za dob muškarca, jer se njihova učestalost povećava s godinama. Epitel prostate je okružen gustom fibromuskularnom stromom u kojoj se nalaze nakupine glatkih mišićnih stanica pomiješanih s elastičnim vlaknima. Glavna funkcija fibromuskularne strome je osiguravanje prikladnog mikrookoliša za urednu funkciju epitelnog dijela prostate. Stromalni dio žlijezde pridonosi održavanju ili ponovnoj uspostavi fiziološkog mikrookoliša što pridonosi održavanju homeostaze u prostati. Dokazi upućuju da patološka aktivacija stanica sadržanih u stromi doprinosi upalnim procesima koji mogu poremetiti fertilitet muškarca i odigrati ključnu ulogu u nastanku KP (10).

### **1.1.3. Uloga prostate u reproduktivnoj funkciji**

Spolna reprodukcija zahtijeva suradnju nekoliko organa muškog urogenitalnog sustava. Kroz svoju suradnju, testisi (koji sadrže germinativne, Sertolijeve i Leydigove stanice), epididimis te akcesorne žlijezde (prostata, sjemeni mjehurići te bulbouretralne žlijezde) istovremeno pridonose produkciji ejakulata. Testisi produciraju zrele germinativne stanice spermatozoe, dok je uloga prostate i sjemenih mjehurića produkcija proteina koji imaju ulogu u stvaranju i kasnijoj razgradnji sjemenog koaguluma te molekula koje spermatozoidima koriste kao izvor

energije te ih štite od kiselog medija rodnice. Ejakulacija, koagulacija te likvefakcija čine strogo sinkronizirani kaskadni niz koji na kraju omogućuje spermatozoidu da dospije do jajne stanice i istu oplodi. Prostata je izuzetno važan reproduktivni organ te muški ferilitet u velikom dijelu ovisi o sekretima iz prostatičnog epitela. Ključni doprinos prostatičnog sekreta leži u njegovoj ulozi molekularnog okidača u svim koracima fekundacije, od ejakulacije do aktivacije spermatozoida i njihove kapacitacije. U ukupnom volumenu ejakulata, prostatični sekret čini u prosjeku 1/3. Prostatični sekret sastoji se od niza signalnih molekula koje kontroliraju čin ejakulacije te reguliraju proteine izlučene od strane sjemenih mjehurića i bulbouretralnih žlijezda. Ti proteini potiču likvefakciju ejakulata u rodnici te potiču maturaciju i motilitet spermatozoida. U navedene proteine koje prostata izlučuje u ejakulat spada i humani glandularni kalikrein 2 (engl. human glandular kalikrein 2 (hK2)), PSA, citrat (intermedijarni metabolit Krebsovog ciklusa) te  $Zn^{2+}$  (element u tragovima koji se aktivno sprema u epitelnim stanicama prostatičnih žlijezda) (11). Epitelne stanice prostatičnih žljezdanih acinusa proizvode energiju procesom glikolize (što je inače obilježje proliferirajućih malignih stanica) za razliku od ostalih somatskih stanica koje energiju dobivaju pomoću Krebsovog ciklusa (12). Koncentracija citrata u prostatičnom sekretu iznosi između 24 i 130 mmol dok je koncentracija u plazmi 0.1 mmol što znači da je 240 do 1300 puta viša. Metabolički put sinteze i oksidacije citrata se dešava u Krebsovom ciklusu koji je smješten u mitohondriju. U tipičnim somatskim stanicama citrat se kroz Krebsov ciklus oksidira i koristi za produkciju energije ili se šalje iz mitohondrija u citosol gdje se cijepa pomoću enzima citrat liaze kako bi proizveo acetil koenzim A (osnovni element u sintezi masnih kiselina). U epitelnim stanicama prostate metabolizam citrata zaustavlja ion cinka ( $Zn^{2+}$ ), koji se veže s enzimom m-akonitazom u Krebsovom ciklusu, što zaustavlja njegovu oksidaciju i dovodi do akumulacije u staničnoj citoplazmi. Citrat izlučen iz epitelnih stanica prostate služi primarno kao izvor energije za spermatozoide u ejakulatu. Normalna ljudska prostata ima najvišu koncentraciju  $Zn^{2+}$  u odnosu na druga tkiva u organizmu, a to se postiže aktivnim transportom  $Zn^{2+}$  iz plazme kroz membranske transportne proteine (13). U fiziološkim uvjetima kalikreinski proteini u prostatičnom sekretu su inaktivirani reverzibilnim vezivanjem sa  $Zn^{2+}$ . U trenutku ejakulacije dolazi do miješanja sekreta bogatog germinativnim stanicama iz epididimisa sa sekretom iz sjemenih mjehurića i prostate. Proteini iz sjemenih mjehurića (seminogelini 1 i 2) tvore želatinoznu masu, svrha koje je zadržavanje ejakulata u rodnici. Nakon nekog vremena seminogelini koji imaju veći afinitet za  $Zn^{2+}$  od kalikreinskih proteina isti vežu na sebe te tako aktiviraju proteolitičku kaskadu koja dovodi do likvefakcije sjemena i oslobađanja spermatozoida (14).

#### 1.1.4. Prostata Specifični Antigen (PSA)

PSA je serinska proteaza pod androgenom regulacijom i član je obitelji tzv. tkivnih serinskih proteaza. Proizvodi ga prvenstveno duktalni i acinarni epitel prostate, izlučuje se u lumen gdje je njegova funkcija cijepanje semenogelina 1 i 2 u sjemenom koagulumu. PSA spada u tkivne kalikreine, kodira ga gen smješten na kromosomu 19q13.4.1(15). Kalikreini su u početku bili definirani kao serinske proteaze koje razgrađuju određene proteine visoke molekularne mase kako bi oslobodile bioaktivne peptide nazvane kinini. Sada su podijeljeni u dvije obitelji, kalikreine tkiva i plazme. Sekvenciranjem humanog genoma otkriveno je ukupno 15 gena na kromosomu 19q13.3-q13.4 koji kodiraju tkivne kalikreine (svi su kodirani s pet egzona slične veličine i imaju 40% do 80% homologne sekvence). Geni kalikreina eksprimiraju se u više tkiva, a mnogi su i regulirani pomoću steroidnih hormona. Uz PSA, hKLK 2 i hKLK4 se prema dostupnim spoznajama sintetiziraju isključivo u tkivu prostate te su pod androgenom kontrolom(16). Većina prostatičnog žljezdanog tkiva nalazi se u PZ i sjemena tekućina koju proizvode ove žlijezde prazni se u 12 do 20 izvodnih kanala, a zatim u mokraćnu cijev. PSA je najzastupljeniji protein u sjemennoj tekućini, s koncentracijom od 0,5 do 2,0 mg/ml, a glavni su mu fiziološki supstrat seminogelini 1 i 2 koje luče sjemeni mjehurići (17). Žlijezde prostate u čovjeka sastoje se od jednog sloja sekretornih epitelnih stanica koje su okružene kontinuiranim slojem bazalnih stanica i bazalnom membranom. Sekretorne epitelne stanice u acinima i kanalićima proizvode PSA koji se potom izlučuje izravno u lumen. Histološka značajka karcinoma prostate je poremećaj odnosa bazalnih stanica i bazalne membrane, a čini se da ovaj gubitak normalne žljezdane arhitekture omogućuje povećanu propusnost i izravni pristup PSA u perifernu cirkulaciju. Korištenje PSA kao biomarkera za karcinom prostate inicijalno je predloženo krajem 1970-ih, kada su ga Wang i sur. izolirali iz normalnog tkiva te adenoma i malignog tkiva prostate (18). Otprilike 30% PSA u sjemennoj plazmi je proteolitički aktivan enzim, a približno 5% ga je vezano s inhibitorom proteina C (19). Ostale forme PSA su neaktivne zbog unutarnjih cijepanja (vjerojatno posredovanih proteazama u sjemennoj tekućini). Većina (70% do 90%) PSA koji ulazi u perifernu krv cirkulira vezana s inhibitorom proteaze alfa 1-antikimotripsinom (20). PSA u perifernoj krvi koji je katalitički neaktivan zbog unutarnjih cijepanja ne tvori komplekse s inhibitorima proteaze ili drugim proteinima i cirkulira kao slobodni PSA (engl. free PSA (fPSA)). Ova unutarnja cijepanja PSA se događaju unutar sjemene tekućine te su prisutna u manjem postotku u tkivu prostate zahvaćenom karcinomom (što se objašnjava poremećajem žljezdane arhitekture i bijegom PSA u perifernu cirkulaciju).

Slijedom toga, omjer slobodnog i ukupnog PSA ( engl. free to total PSA (f/t PSA)) niži je u mnogih muškaraca s KP i koristi se u procijeni rizika i potrebe za biopsijom kod vrijednosti PSA između 4 i 10 ug/L (21). U zdravom tkivu prostate većina fPSA odgovara proteinu koji je inaktiviran unutarnjim proteolitičkim cijepanjem. Suprotno tome kod KP ova cijepana frakcija je relativno smanjena u ukupnoj količini što rezultira nižim odnosom slobodnog i ukupnog PSA koji se detektira u perifernoj krvi. U slučajevima kada je serumska koncentracija PSA između 4 i 10 ug/L procijenjeni rizik od karcinoma prostate je manji od 8% ukoliko je f/t PSA veći od 25%, naspram 56% rizika ukoliko je f/t PSA manji od 10% (22)(23). Kako ne postoji značajan izvor serumskog PSA izvan prostate, navedeni marker se može koristiti za praćenje učinkovitosti radikalne lokalne terapije (radikalna prostatektomija ili terapija zračenjem) kao i kod bolesnika koji primaju sistemske terapije u slučajevima metastatske bolesti.

## **1.2. BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE (BHP)**

Prevalencija BHP raste nakon 40-te godine života kada je zastupljena u 8% muške populacije, do 60% u devetom desetljeću života. Neki podaci sugeriraju da postoji manji rizik od razvoja BHP kod muškaraca u azijskim zemljama u usporedbi sa zapadnom, bijelom populacijom. Genetika, prehrana i način života mogu imati ulogu u nastanku BHP (24)(25). Nedavna izvješća upućuju na značajnu povezanost kliničkog BHP s metaboličkim sindromom i erektilnom disfunkcijom, kao i moguću ulogu upale kao uzroka hiperplazije prostate (26). BHP je u stvari histološka dijagnoza koja podrazumijeva nereguliranu proliferaciju svih komponenti (vezivno tkivo, glatke mišiće i žljezdani epitel) unutar TZ prostate. Pojava novih žljezdanih formacija obično se vidi samo u fetalnoj fazi razvoja prostate te je moguće da su vezivne stanice strome te koje ponovno parakrinom indukcijom potiču nastanak BHP. Osim moguće ubrzane diobe, postoji i teorija da se primijećeni povećani ukupni broj stanica u BHP može objasniti i poremećajem u apoptozi (27). Androgeni, estrogini, interakcija između strome i epitelnih stanica žlijezda, čimbenici rasta i neurotransmiteri mogu imati ulogu (pojedinačno ili u kombinaciji) u etiologiji hiperplastičnog rasta. Iako androgeni nisu direktan uzrok nastanka BHP, normalan razvoj prostate pa tako i pojava njenih patoloških procesa poput BHP nije moguć bez prisutnosti testikularnih androgena tijekom i nakon puberteta. U mozgu, skeletnim mišićima i sjemenskom epitelu, testosteron izravno stimulira stanične procese koji ovise o androgenima. U prostati, međutim, enzim vezan za nuklearnu membranu stanice, steroidna 5 $\alpha$ -

reduktaza, pretvara testosteron u dihidrotestosteron (DHT). DHT ima jače djelovanje na prostatu od testosterona radi većeg afiniteta za androgeni receptor u staničnoj jezgri. Nakon aktivacije receptora, isti se veže na specifična mjesta deoksiribonukleinske kiseline (DNK) u jezgri što u konačnici rezultira povećanom transkripcijom određenih proteina ovisnih o androgenima (28). Razine DHT i androgenih receptora u prostatičnom tkivu ostaju visoke tijekom cijelog procesa starenja muškarca, unatoč činjenici da se periferna razina testosterona smanjuje s godinama. Pod pretpostavkom normalnih raspona koncentracije cirkulirajućih androgena, nema jasne povezanosti između koncentracije istih i veličine prostate kod starijih muškaraca (29). Uklanjanje testosterona iz organizma (npr. tijekom antiandrogene terapije kod KP) ima za rezultat smanjenje sinteze proteina u stanicama i involuciju tkiva koja su osjetljiva na androgene. Uz inaktivaciju ključnih gena ovisnih o androgenu (na primjer PSA), povlačenje androgena dovodi do aktivacije specifičnih gena koji su uključeni u programiranu staničnu smrt. Kako je već ranije navedeno, tkivna koncentracija DHT u prostati je visoka i u starijih muškaraca. Konverziju testosterona u DHT katalizira ranije spomenuti enzim  $5\alpha$ -reduktaza kojeg postoje dvije varijante, svaku kodira poseban gen. Tip II  $5\alpha$ -reduktaze se gotovo isključivo nalazi u tkivu prostate te kod bolesnika sa urođenim nedostatkom ovog enzima njegova deficijencija dovodi do toga da su između ostalog, prostate rudimentarne što upućuje na izrazitu važnost androgene stimulacije i tijekom embriogeneze. Selektivni inhibitor  $5\alpha$ -reduktaze tip II (engl.  $5\text{-}\alpha$  reductase inhibitor (5ARI)) finasterid, dovodi do blokade tog enzima te do značajnog smanjenja DHT u tkivu prostate. Navedeno smanjenje tog potentnog androgena u prostatičnom tkivu za posljedicu ima apoptozu epitelnih stanica prostatičnog žljezdanog tkiva kao i do pada u serumskoj vrijednosti PSA (koje odražava smanjenu produkciju navedenog enzima u prostati). Finasterid i dutasterid (koji je ne selektivan 5ARI) se koriste u terapiji BHP (30).

## 1.3. KARCINOM PROSTATE

### 1.3.1. Epidemiologija karcinoma prostate

Na temelju podataka Međunarodne Agencije za Istraživanje Raka (engl. International Agency for Research on Cancer (IARC)) za 2018. godinu, širom svijeta je zabilježeno 1.276.106 novih slučajeva KP s većom prevalencijom u razvijenim zemljama. Razlike u stopama učestalosti u svijetu odražavaju razlike u dostupnosti i korištenju zdravstvene usluge, odnosno dijagnostičkih alata. Stopa incidencije i smrtnosti od raka prostate snažno je povezana sa dobi, a najveća je kod starijih muškaraca (> 65 godina starosti). Rak prostate drugi je po učestalosti zloćudni tumor (nakon karcinoma pluća) kod muškaraca u svijetu, sa 1.276.106 novootkrivenih i 358.989 smrtnih slučajeva (3,8% svih smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom kod muškaraca) u 2018. godini (31). Incidencija i smrtnost od raka prostate u svijetu pozitivno koreliraju sa starenjem populacije, a prosječna dob muškaraca u trenutku dijagnoze je 66 godina. U industrijski razvijenim državama gdje je i ukupna incidencija viša u odnosu na zemlje u razvoju, 1 na 350 muškaraca mlađih od 50 godina dobije dijagnozu KP, stopa incidencije raste do 1 na 52 muškarca u dobi od 50 do 59 godina te u subpopulaciji iznad 65 godina doseže čak 60% od ukupnog broja (32). Treba napomenuti da su kod Afroameričkih muškaraca stope incidencije veće u usporedbi s bjelačkom populacijom u SAD-u, sa 158.3 dijagnosticiranih novih slučajeva na 100 000 muškaraca, također treba napomenuti da je njihov mortalitet približno dvostruko veći (33). Razlozi za ovu nejednakost su višestruki te leže u razlici u socijalnim, okolišnim i genetskim čimbenicima. Osim dobi i rase, jedini nepobitno utvrđeni faktor rizika za KP je obiteljska nasljednost koja u incidenciji zauzima najmanji udio. Rizik od KP za prve rođake dijagnosticiranih muškaraca otprilike je dvostruko veći od rizika u općoj populaciji. Ovaj obiteljski rizik je 4 puta veći od rizika za opću populaciju kod rođaka u prvom koljenu muškaraca s KP kojima je bolest dijagnosticirana prije šezdesete godine života. Također, 50% veći rizik kod jednojajčanih u usporedbi sa dvojajčanim blizancima, veća incidencija kod Afroamerikanaca u odnosu na ostale rase u SAD-u, podupire genetske čimbenike kao važnu odrednicu varijacije rizika u populaciji (34). Varijacije u incidenciji i mortalitetu od KP na globalnoj razini se također mogu pripisati i dostupnosti dijagnostičkih alata, ponajprije PSA, razlikama u metodama probira i nejednakosti u pristupu zdravstvenoj zaštiti (35). U Europskoj Uniji, KP čini najčešće dijagnosticirani malignom u muškoj populaciji te je u 2018. godini činio 25% ukupnog broja dijagnosticiranih karcinoma (36). U SAD-u KP drugi je najčešće



dijagnosticirani malignom u ukupnom broju te je činio 9,5% svih novih slučajeva karcinoma registriranih u 2018. godini (34). Populacijske studije su pokazale da Afroamerikanci imaju najveću učestalost KP u svijetu te imaju veću vjerojatnost da će razviti bolest ranije u usporedbi s drugim rasnim i etničkim skupinama. To se odražava u podacima ne samo za Afroamerikanace, već i za populaciju u Karibima i muškarce čije podrijetlo dolazi iz subsaharske Afrike, a žive u Europi što sugerira da oni imaju zajedničku genetsku pozadinu koja ih predisponira za raniji razvoj KP (37). S druge strane Chu i suradnici izvijestili su da su stope incidencije KP čak 40 puta veće među Afroamerikanacima nego među muškarcima u Subsaharskoj Africi (38). Te razlike sugeriraju da čimbenici okoliša također igraju važnu ulogu u etiologiji raka prostate. Međunarodne stope smrtnosti od KP znatno se razlikuju u cijelom svijetu (39). U 2018. godini najviše stope smrtnosti zabilježene su u Centralnoj Americi (10.7 na 100 000), zatim u Australiji i Novom Zelandu (10.2) te Zapadnoj Europi (10.1) (40). Najniža stopa zabilježena je u zemljama Azije (Južna i Srednja 3.3, Istočna 4.7 i Jugoistočna 5.4) i Sjeverne Afrike (5.8). Trećina smrtnih slučajeva od KP zabilježenih 2018. godine dogodila se u Aziji 33.0% (118427 smrtnih slučajeva), slijedi Europa sa 29.9% (107315 smrtnih slučajeva). Stopa smrtnosti od KP je viša u starijim dobnim skupinama, a gotovo 55% svih smrtnih slučajeva je zabilježeno kod muškaraca nakon 65. godine života (41). Američka Preventivna Radna Skupina (engl. U.S. Preventive Task Force (USPSTF)) 2018. godine izvijestila je da postoji potencijalna korist od probira populacije pomoću PSA u smislu smanjenja broja smrtnih slučajeva od KP kod muškaraca u dobi od 55 do 69 godina (42). Međutim, za muškarce starije od 70 godina za sve rase podaci su manje uvjerljivi (43). Iako su stope incidencije karcinoma prostate visoke, većina slučajeva otkriva se u lokaliziranom stadiju bolesti. Stopa 5-godišnjeg preživljavanja u SAD-u za muškarce s dijagnozom KP iznosi oko 98% (38). Podaci iz projekta Eurocare (EUROCARE-5) pokazali su da je kod pacijenata kojima je dijagnosticiran KP u razdoblju od 2003. do 2007. godine stopa 5-godišnjeg preživljavanja 83% (36). Preživljavanje je variralo od 76% u zemljama istočne Europe do 88% u zemljama južne i srednje Europe. Štoviše, stopa preživljenja se s vremenom povećala u cijeloj Europi, a najveći napredak zabilježen je u istočnoeuropskim zemljama (44).

### 1.3.2. Etiopatogeneza karcinoma prostate

Karcinom je hiperproliferativni poremećaj koji uključuje staničnu transformaciju, disregulaciju apoptoze, nekontroliranu staničnu proliferaciju, angiogenezu, invaziju i metastaziranje. Općenito je prepoznat kao bolest povezana sa starenjem; srednja dob dijagnosticiranih bolesnika u industrijaliziranim zemljama je gotovo 70 godina i očekuje se da će se povećati (45). Karcinom se često manifestira kao završna faza kronične upale, otprilike 20% karcinoma jetre, jednjaka, želuca, debelog crijeva, kože i prostate doista se može pripisati kroničnim upalnim procesima tkiva i organa uzrokovanih okolišnim čimbenicima kao što su infektivni ili neinfektivni agensi te kroničnim neinfektivnim autoimunim upalnim bolestima (46). Upala je složeni fiziološki proces s ciljem održavanja homeostaze u tkivu, odnosno odgovoru na tkivne stresore poput infekcije, kemijskog ili mehaničkog oštećenja tkiva. Akutna upala koja predstavlja urođeni imunitet često prethodi razvoju zaštitnih adaptivnih imunoloških odgovora na patogene i maligno alterirane stanice. S druge strane, pokazalo se da kronična upala pridonosi tumorigenezi u svim fazama razvoja karcinoma. Kronična upala doprinosi nastanku karcinoma generiranjem genotoksičnog stresa, potom njegovoj promociji potičući staničnu proliferaciju te na kraju napredovanju pojačavanjem angiogeneze i lokalne invazije tkiva. Epidemiološka i klinička ispitivanja upućuju na snažnu povezanost između kronične infekcije/upale i pojave karcinoma (47)(48). Poznato je da zlouporaba alkohola može dovesti do karcinoma jetre i gušterače, pušenje uzrokuje kroničnu upalu dišnih putova i pojavu karcinoma pluća dok zarazne bolesti poput virusnog hepatitisa C dovode do kroničnog hepatitisa i posljedične maligne alteracije. Genetskim studijama na životinjama i ljudima dobiveni su dokazi o snažnoj ulozi pojedinih gena na predispoziciju za nastanak KP (49). Posebno su važni podatci dobiveni u studijama slučajeva i kontrola (engl. case control) te studijama jednojajčanih blizanaca kao i analizama segregacije i ispitivanjima genoma koji naglašavaju snažnu genetsku podlogu u procesu maligne alteracije epitelnih stanica prostate (50-52). Identificirani su brojni geni kandidati, a posebno njihove varijante, koje su nedvosmisleno povezane s povećanim rizikom od nastanka KP kao i zajednički jednonukleotidni polimorfizmi većeg broja alela niske penetrantnosti tzv. 'aleli koji modificiraju gene', u pet kromosomskih regija (tri na 8q24 i po jedan na 17q12 i 17q24.3) koji vjerojatno imaju važnu ulogu u predispoziciji za nastanak KP (53). Popis gena koji su uključeni u predispoziciju za nastanak KP je dosta velik te sadrži gene koji kodiraju različite signalne putove, uključujući one koji sudjeluju u djelovanju androgena, popravljanju deoksiribonukleinske kiseline (DNK), metabolizmu steroidnih hormona te karcinogenih

supstanci s kojima organizam dolazi u kontakt. Rijetke genetske aberacije staica zametne linije u genima za popravak oštećenja DNK povezane su s višim stopama dijagnoza KP. Tako na primjer mutacije gena raka dojke 1 i 2 ( engl. Breast Cancer Gene (BRCA 1 i 2) kod zahvaćenih muškaraca daju 3,8 i 8,6 puta povećan rizik od razvoja KP u odnosu na opću populaciju (54). Također postoji i opći konsenzus o potencijalu specifičnih kombinacija inačica ovih gena koje u prikladnim okolišnim situacijama utječu na povećanje rizika od nastanka i napredovanja KP.

### **1.3.3. Gleasonov zbroj (GZ)**

Trenutni sustav histološke gradacije karcinoma prostate razvijen je u periodu između 1967. i 1973. od strane dr. Donalda Gleasona (55). Sustav dodjeljuje histološkim uzorcima vrijednost od 1 do 5 te zbraja najzastupljeniji i drugi najčešći uzorak. Budući da je u zadnjih 40 godina došlo do napretka u dijagnostici i liječenju KP isto tako je došlo i do napretka u histološkoj klasifikaciji te se danas koristi modificirana verzija Gleasonovog sustava koja je revidirana do sada u tri navrata počevši od 2005. godine. Trenutni Gleasonov sustav histološke gradacije se dosta razlikuje od originalnog. Zbrojevi 2 do 5 se više ne koriste a neki histološki obrasci koji su ranije bili GZ 6 sada spadaju pod 7 što je dovelo do toga da sadašnji KP sa zbrojem 6 imaju bolju prognozu od "originalnih šestica". Gleasonov sustav gradacije kreće se u rasponu od 2 do 10, no 6 je najniža ocjena koja se trenutno dodjeljuje. Kad se pacijentima kaže da imaju KP GZ 6 (imajući na umu da je 10 maksimalan zbroj), to implicira da je njihova prognoza srednja što pridonosi njihovom strahu od agresivnijeg karcinoma i neuspjeha liječenja. Kako bi poboljšali prognostičku klasifikaciju bolesnika kojima je dijagnosticiran KP međunarodno društvo za urološku patologiju je do sada u tri navrata održalo konsenzusni sastanak (2005. 2014. i 2019. godine).

### **1.3.4. Klasifikacija Međunarodnog Društva za Urološku Patologiju (engl. International Society of Urological Pathology (ISUP))**

Na konsenzusnom sastanku održanom u Chicagu 2014. godine usvojena je nova klasifikacija biopsijom dokazanih karcinoma prostate prema modificiranoj Gleasonovoj histološkoj gradaciji koja se sastoji od zbroja najzastupljenijeg KP i onog manje zastupljenog (ukoliko su prisutne dvije histološke slike). U slučaju da je prisutna samo jedna histološka slika, ista se zbraja sama sa sobom kako bi se dobio GZ. Kod prisustva tri histološke slike u zbroj se unosi

dominantna histološka slika te najagresivnija forma karcinoma bez obzira na njen udio u ukupnom bioptatu. Ukoliko se dokazani karcinom većim dijelom sastoji od histološkog gradusa 4 ili 5, identifikacija gradusa 2 ili 3 u <5% bioptata se ne treba uvrštavati u GZ. GZ se treba odrediti za svaki biopsijom dobiveni cilindar prostatičnog tkiva u kojem je otkriven karcinom te se izvještava postotak zahvaćenosti svakog pojedinog cilindra. Uz modifikacije GZ usvojena je i prognostička Gleasonova gradacija (engl. Gleason Grade (GG)) koja je bolesnike podijelila u ukupno 5 grupa (56):

U gradus grupu 1 spadaju bolesnici kojima je dokazan KP GZ  $\leq 6$  (u histološkoj slici su prisutne individualne dobro diferencirane žljezdane formacije).

U gradus grupu 2 spadaju bolesnici kojima je dokazan KP GZ  $3+4=7$  (u histološkoj slici dominiraju dobro formirane žljezdane formacije uz manji udio loše oblikovanih /stopljenih/ kribriformnih žlijezda).

U gradus grupu 3 spadaju bolesnici kojima je dokazan KP GZ  $4+3=7$  (pretežno loše oblikovane /srasle ili kribriformne žlijezde s manjom komponentom dobro oblikovanih žlijezda).

U gradus grupu 4 spadaju bolesnici kojima je dokazan KP GZ  $4+4=8$ ;  $3+5=8$ ;  $5+3=8$  (samo slabo oblikovane /srasle/kribriformne žlijezde ili pretežno dobro oblikovane žlijezde i manja komponenta u kojima nema žljezdanih formacija ili pretežno nedostaju žlijezde i manja komponenta dobro oblikovanih žljezdanih formacija).

U gradus grupu 5 spadaju bolesnici kojima je dokazan KP GZ 9 ili 10 (izostanak formiranih žlijezda uz komedonekrozu sa ili bez loše oblikovanih /sraslih/kribriformnih žlijezda).

Ove prognostičke grupe temeljene na modificiranom Gleasonovom sustavu gradacije pojednostavljaju grupiranje 25 mogućih varijanti GZ u 5 prognostički signifikatnih grupa što ima velik značaj u procjeni kliničkog ishoda liječenja i očekivanog preživljenja (57).

Na zadnjem ISUP konsenzusnom sastanku održanom u Nici 2019. godine usvojene su sljedeće izmjene:

- Navesti u biopsijama postotak Gleasonovog uzorka 4 za sve GZ 7 (ISUP GG 2 i 3)
- Za radikalne prostatektomije, uključiti prisutnost tercijarnog/manje zastupljenog Gleasonovog obrasca 4 i 5 u GZ, ako čini >5% volumena tumora
- Izvjestiti o prisutnosti tercijarnog/manje zastupljenog Gleasonovog obrasca 4 i 5 u patološkom nalazu nakon RP
- Izostaviti ocjenu intraduktalnog karcinoma (IK) bez dokaza invazivnog raka prostate
- Uključiti ocjenu IK u GZ kada je prisutan invazivni rak
- Komentirati prisutnost i značaj IK-a u biopsijama i patološkim preparatima prostate

- Komentirati prisutnost i značaj invazivnog kribriiformnog karcinoma u biopsijama i patološkim preparatima nakon radikalne prostatektomije
- Navesti u sustavnim biopsijama poseban GZ (ISUP GG) za svako pojedinačno mjesto biopsije
- Prijaviti globalni (agregatni) GZ (ISUP GG) u ciljanim biopstatima dobivenim na osnovu multiparametrijskog magneta prostate (mpMR) (zasebno za svaku sumnjivu mpMR leziju)
- Prijaviti specifične benigne histološke nalaze kod sumnjivih (PIRADS 4-5) mpMR ciljanih biopstata u kojima nije dokazan KP.

## 1.4. IMUNOLOŠKO PREPOZNAVANJE

### 1.4.1. Citokini

Citokini su glikoproteini molekularne mase od 15 do 25 kilodaltona (kD) koji posreduju u međustaničnoj komunikaciji. Proizvode ih više vrsta stanica u organizmu, a imaju važnu ulogu u procesu rasta, diferencijacije i sazrijevanja stanica imunološkog sustava. Također sudjeluju u efektorskoj fazi imunoreakcije, posebice u kontekstu aktivacije i migracije stanica imunološkog sustava (58)(59). Citokini djeluju na hematopoetske, ali i druge stanice poput fibroblasta i hepatocita (parakrino djelovanje), a katkad djeluju i na iste stanice koje ih luče (autokrino djelovanje). Djeluju lokalno na mjestu lučenja, a učinak im brzo nestaje (poluvijek raspada im je nekoliko minuta), pa ih mnogi smatraju lokalnim hormonima. Međutim, manji se broj citokina luči u krv i djeluje na udaljena tkiva, neki u fiziološkim dok drugi to čine u patološkim stanjima (poput sepse). Većina citokina se luči tek nakon podražaja, a samo rijetki konstitutivno. Da bi citokin djelovao na neku stanicu, ona mora izražavati odgovarajući receptor. Receptor na stanici može biti izložen a priori ili tek nakon podražaja antigenom, mitogenom ili nekim drugim citokinom, a može se pojaviti i spontano tijekom staničnog ciklusa. Nakon interakcije citokina i receptora, dolazi do prijenosa unutarstaničnog signala preko drugih glasnika, nakon čega dolazi do aktivacije gena u ciljnim stanicama. Citokinima-inducibilni proteini moduliraju biološke procese u stanici koje u konačnici prepoznamo kao biološki učinak određenog citokina. Biološko djelovanje citokina ostvaruje se kroz brojne interakcije s drugim citokinima koje mogu biti sinergističke, aditivne ili antagonističke. Bitne

karakteristike bioloških učinaka citokina su pleiotropizam (jedan citokin djeluje na različite stanice) i redundancija (više citokina ima jednak učinak na određenu stanicu) (59). Citokini se mogu svrstati u pojedine skupine na klasičan način, na temelju njihove građe ili na temelju građe njihovih receptora. Citokini se najčešće dijele na interleukine (IL), interferone (IFN), citoksine i čimbenike rasta hematopoetskih kolonija (83). Interleukine proizvode leukociti i makrofagi, dok interferoni imaju antivirusni učinak. Citoksini mogu ubiti ciljne stanice, dok čimbenici stimulacije kolonija (engl. colony stimulating factors (CSF)) potiču rast i diferencijaciju kolonija hematopoetskih stanica (58-60). Po funkciji se citokini svrstavaju u četiri skupine: citokini urođene imunosti (proupalni citokini), citokini stečene (specifične) imunosti, čimbenici rasta kolonija te imunosupresijski (inhibicijski) citokini. Citokine urođene imunosti proizvode prvenstveno makrofagi i druge akcesorne imunološke stanice kao odgovor na nespecifične upalne podražaje. Citokine specifične (adaptivne) imunosti koji djeluju u različitim reakcijama specifične imunosti, stvaraju primarno limfociti (59).

#### **1.4.2. Kemokini**

Kemotaktični citokini (kemokini) su strukturalno i funkcionalno heterogena skupina niskomolekularnih citokina (veličine 8-10 kDa) koji djeluju kemotaktički na upalne stanice te uzrokuju njihovu migraciju u upalom zahvaćena tkiva. Osim privlačenja upalnih stanica, često uzrokuju i njihovu aktivaciju, potiču sekreciju proupalnih citokina i njihovo vezanje za endotelne stanice. Luče ih upalne (npr. neutrofil i limfociti) i stanice imunog sustava (u prvom redu makrofagi i dendritičke stanice) nakon poticaja produktima mikroorganizama, ili bilo kojeg upalnog podražaja tkiva, ali ih mogu lučiti gotovo sve stanice u organizmu. Već izlučeni proupalni citokini potiču stvaranje kemokina i ta međusobna interakcija (kaskada) ima važnu ulogu u nespecifičnoj otpornosti organizma na mikroorganizme. Kemokini posreduju u mnoštvu bioloških procesa uključujući neurološki razvoj, diferencijaciju i aktivaciju T-limfocita, apoptozu, angiogenezu, u reakcijama odbacivanja transplantata, no njihova najvažnija uloga odražava se u upalnim procesima jer potiču aktivaciju i migraciju leukocita (u smjeru gradijenta kemokina) na mjesto upale što omogućava zaustavljanje invazije patogena (61-63). Kemokini iskazuju kemotaktičnu aktivnost na različite vrste stanica, ovisno o distribuciji ekspresije njihovih receptora. Otkriveno je da se neki kemokini luče konstitutivno u limfnim organima (luče ih stromalne ili endotelne stanice) i reguliraju limfocitnu cirkulaciju i usmjerenu migraciju limfocita i dendritičkih stanica u limfne organe. Ovisno o njihovoj regulaciji i produkciji, kemokini se mogu podijeliti na „homeostatske“, koji reguliraju

recirkulaciju leukocita u normalnim uvjetima, i „inflammatorne“ kemokine koji se produciraju kao odgovor na upalne podražaje. Kemokini se vežu na specifične receptore koji pripadaju kemokinskoj obitelji, a za koje je svojstveno da je glavna receptora smještena u membrani kroz koju prolazi 7 puta u obliku petlje. Ti se receptori vežu za velike proteine G koji vrlo brzo potiču prijenos signala putem sekundarnih glasnika (ciklički adenozin-monofosfat, inozitol-fosfat, Ca<sup>2+</sup>). To inducira kemotaksiju leukocita prema upalom zahvaćenom području te njihovu aktivaciju (64)(65). Dobro je proučeno 20 kemokinskih receptora (CR) koje, prema kemokinima koje vežu, razvrstavamo u 4 skupine: CXCR1-CXCR6, CCR1-CCR10, CR1 i CXXXCR1. Sličnost u građi je velika pa je pleotropizam u djelovanju posljedica prisutnosti različitih receptora na istoj stanici i sposobnosti pojedinog receptora da veže više kemokina. Vjeruje se da kemokini, odnosno njihovi receptori privlače različite podvrste T-limocita na mjesto ulaska antigena i time sudjeluju u usmjeravanju (polarizaciji) imunskog odgovora u smislu stanične (Th1), odnosno humoralne (Th2) imunosti. Prema slijedu aminokiselina nakon pojave prvog cisteina (C) kemokini se dijele u četiri skupine: CXC, CX3C, CC i C (X je bilo koja aminokiselina). Jedini poznati predstavnik grupe CX3C je fraktalkin s kemotaktičkim i adhezijskim djelovanjem na T-limfocite i NK-stanice (engl. natural killer) (70)(71). Kemokini CXC djeluju kemotaktički na neutrofilne leukocite. Najpoznatiji predstavnik i prvi otkriveni kemokin, CXCL8, sintetizira se u makrofagima i endotelnim stanicama. CXCL13 (engl. B-lymphocyte chemoattractant (BLC)) je konstitutivno eksprimiran u sekundarnim limfnim organima (slezena, limfni čvorovi, Peyerove ploče) od strane folikularnih dendritičkih stanica i makrofaga. Selektivno je kemotaktičan za B-limfocite i sudjeluje u kontroli organizacije B-limfocita unutar folikula u limfnim tkivima. CXCL13 primarno djeluje preko receptora CXCR5 većinom izraženog na zrelih B-limfocitima, a u manjoj mjeri i na pomoćničkim i citotoksičnim T-limfocitima. Kemokini C (najpoznatiji predstavnik limfotaktin) privlače T-limfocite i NK-stanice. Kemokini CC privlače monocite-makrofage i limfocite, a u različitom stupnju i druge fagocitne stanice, NK-stanice i bazofile (69)(70).

### 1.4.3. CXCL13

B-limfocitni kemoatraktant (BLC), poznat kao BCA-1 (engl. B-Cell Attracting chemokine 1) ili CXCL13 je član CXC podtipa kemokinske superobitelji. BCA-1 peptid ima 109 aminokiselina i sadrži 22 aminokiselinska ostatka na argininskom kraju prije prva 4 cisteinska ostatka, što potvrđuje da je to CXC kemokin. Northern blot i ribosinukleinska kiselina (RNK)

dot blot analizom je detektirana konstitutivna ekspresija 1.4kb BCA-1 transkripta s najvišom razinom ekspresije u jetri, zatim u slezeni, limfnim čvorovima, crvuljku i želucu. Niža ekspresija je pokazana u slinovnicama i dojčkama, dok u drugim tkivima nije dokazana ekspresija. Ljudski BLC dijeli 64% aminokiselinske sličnosti s mišjim Blc-om. Gen za CXCL13 se nalazi na 4q21, blizu gena za većinu ostalih CXC kemokina. Primarni receptor za CXCL13 je 7-transmembranski receptor povezan s G-proteinom, CXCR5, poznat kao i receptor Burkittovog limfoma 1 (engl. Burkitt's lymphoma receptor 1, BLR-1). Stanice koje izražavaju CXCR5 i odgovaraju na CXCL13 uključuju B-limfocite, folikularne pomoćničke T-limfocite, osteoblaste, podocyte, kao i kožne dendritičke stanice. Područje funkcije CXCL13 stalno raste od otkrića 1998. godine. Inicijalno se vidjelo da mu je glavna uloga u stvaranju i održavanju mikroarhitekture limfnog tkiva, pa tako CXCL13 deficijentni miševi nisu razvijali limfne čvorove. CXCL13 je kemoatraktant za B-limfocite in vitro. Kasnije je otkriveno kako ovaj kemokin ima i ulogu u formiranju ektopičnog limfnog tkiva u uvjetima kronične upale poput one u multiploj sklerozi (MS) ili reumatoidnom artritisu (RA). Dokaz ekspresije CXCL13 u *Helicobacter pylori* gastritisu, plućnoj tuberkulozi ili infekciji s *Bartonellom Henselae* je ukazao na njegovu potencijalnu ulogu u kroničnim bakterijskim infekcijama. CXCL13 je važan za razvoj sekundarnog limfnog tkiva i usmjeravanje limfocita unutar mikro odjeljaka tih tkiva (59). Konstitutivno je izražen na B staničnim folikulima sekundarnih limfnih organa, a njegova ekspresija u tim tkivima je ovisna o aktivnosti limfotoksina  $\alpha/\beta$ . CXCL13 ima kompleksnu ulogu u antigenima induciranoj migraciji B-limfocita u sekundarna limfna tkiva. Nakon vezanja antigena, B-limfociti migriraju iz folikula na granicu T zone gdje ulaze u međudjelovanje s pomoćničkim T-limfocitima. Osim privlačenja B-limfocita, ovaj kemokin inducira i B-limfocite na poticanje stvaranja membranskog limfotoksin- $\alpha 1-\beta 2$ , citokina koji potiče razvoj folikularnih dendritičkih stanica i ekspresiju CXCL13, što stvara pozitivnu povratnu spregu. Folikularne pomoćničke CD4+ T stanice (Tfh), kao i tonzilarni memorijski T-limfociti, također izražavaju CXCR5 i migriraju na stimulaciju CXCL13. CXCL13 i CXCR5 "knock-out" miševi izražavaju slične abnormalnosti uključujući deficijenciju u razvoju većine perifernih limfnih organa. Obje vrste miševa imaju smanjen broj perifernih limfnih čvorova i Peyerovih ploča, kao i poremećaj u polarizaciji B i T-staničnih folikula u slezeni i Peyerovim pločama. Upotrebom protočne citometrije i imunohistokemije, pronađeno je kako bolesnici s HIV-1 bolešću, posebice oni s niskim CD4+ T-limfocitima imaju smanjenu ekspresiju CCR5 na B-limfocitima dok je ekspresija CXCL13 u takvih pacijenata povišena zbog aktivacije B-limfocita(69).



#### 1.4.4. Kemokini u malignim bolestima

Maligne su bolesti karakterizirane nekontroliranom diobom te poremećenom homeostazom između stanične proliferacije i programirane smrti. Kemokini su proteini i glikoproteini koji posreduju u međustaničnim interakcijama i imaju važnu ulogu u aktivaciji i migraciji stanica imunološkog sustava. Nakon vezanja na citokinske receptore, signal se prenosi u stanicu i aktivira se transkripcija citokinima-inducibilnih gena koji moduliraju biološke procese u stanici što prepoznajemo kao biološki učinak određenog citokina.

Kemokini su također prisutni u tumorskom mikrookolišu i potencijalno reagiraju s faktorima rasta u regulaciji invazije i metastaziranja tumora. U tumorskom mikrookolišu, specifični kemokini su odgovorni za usmjeravanje leukocita na mjesto tumora. Nekoliko tipova upalnih stanica (uključujući neutrofile, makrofage i limfocite) usmjerenih u tumor ima dvostruku (pozitivnu i negativnu) ulogu u progresiji tumora. Također mogu igrati ulogu u funkcionalnosti tumorskih i drugih stanica, što zajedno regulira proces tumorskog razvoja i progresije (70). Nedavne su in vitro i in vivo studije ukazale na članove kemokinske obitelji i njihove receptore kao faktore maligne transformacije, progresije i metastatskog potencijala mnogobrojnih tumora (70-72). CXCL1 i CXCL8, ligandi za CXCR2 su potvrđeni kao autokrini faktori rasta stanica melanoma koje konstitutivno ekspimiraju CXCR2. Ovi kemokini povećavaju invazivnost stanica humanog melanoma i koreliraju s metastatskim potencijalom stanica u miša(73)(74). Brojni kemokini (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL2, CXCL7, CXCL8 i CXCL10,) su utvrđeni kao promotori invazivnosti i metastatskog potencijala stanica karcinoma dojke. S obzirom da je CXCR4 najčešći kemokinski receptor ekspimiran u tumorskim stanicama, povezan je sa preko 25 različitih epitelnih, mezenhimalnih i hematopoetskih tumora u ljudi (75)(76). Također je pokazano kako stimulacija stanica melanoma, glioma i stanica tumora jajnika koje ekspimiraju CXCR4 sa CXCL12 olakšava staničnu proliferaciju i migraciju (77). CCL2 je najčešće ekspimiran kod tumora ovarija te sudjeluje u privlačenju makrofaga (78). Nedavno je pokazano kako je ekspresija kemokinskih receptora CXCR4 i CCR7 na tumorskim stanicama preko stimulacije migracije stanica tumora in vitro i in vivo direktno uključena u nastanak metastaza. Također su studije na kliničkim uzorcima pokazale kako ekspresija kemokina korelira i s kliničkim ishodom. Prisutnost CCR7 u karcinomu pluća ne-malih stanica je direktno povezana sa razvojem metastaza u limfnim čvorovima (79). Angiogeneza je također važna za razvoj ascitesa i metastaza u karcinomu ovarija. Uloga kemokina u tumorskoj angiogenezi je dobro poznata i uglavnom kontrolirana sa CXC kemokinima (80).

Usmjeravanje regulatornih T-limfocita je mehanizam kojim tumori mogu razviti imunološku prednost, a inhibicija te migracije ili funkcije regulatornih T-limfocita upotrebom protutijela protiv CCL2 može predstavljati novi anti-tumorski mehanizam liječenja karcinoma koji izražavaju ovaj kemokin (80)(81).

#### **1.4.5. Kemokini u karcinomu prostate**

U KP, histološka analiza je pokazala direktnu pozitivnu korelaciju između gustoće krvnih žila u invazivnom KP i incidenciji metastaza. Direkcijska migracija stanica KP, što je ključni korak u razvoju metastaza, je određena pomoću kemokinskih receptora eksprimiranih u stanicama KP i ekspresije odgovarajućeg liganda u ciljnim organima. Novija istraživanja govore kako je CXCL12/CXCR4 kemokinska os uključena u proces metastaziranja stanica KP. Ekspresija CXCR4 u stanicama KP je uključena u usmjeravanje tumorskih stanica u mikrookoliš s visokim koncentracijama CXCL12, poput kosti. Također je pokazano kako androgeni receptori negativno reguliraju CXCR4, sugerirajući kako gubitak androgenih receptora potiče migraciju stanica KP. Inhibicija CXCR4 *in vivo* samo djelomično blokira metastatski potencijal i agresivno ponašanje KP, što upućuje na to da i drugi faktori igraju ulogu u kontroli tkivno-specifične migracije (77)(82)(83).

Nekoliko ranije objavljenih radova ukazuje da je CXCR7, još jedan receptor za CXCL12 također eksprimiran u KP. *In vitro* studije u KP sugeriraju kako su promjene u ekspresiji CXCR7 povezane s pojačanim adhezivnim i invazivnim karakteristikama kao i boljim preživljenjem tih staničnih sojeva (84)(85).

Također je pokazano kako i CXCR7 regulira ekspresiju pro-angiogenih faktora CXCL8 i faktor rasta vaskularnog endotela (eng. vascular endothelial growth factor (VEGF)), što sugerira njihovu ulogu u tumorskoj angiogenezi. Osim CXCR4 i CXCR7, značajna pozitivna korelacija je pokazana između ekspresije CXCL16 i CXCR6 sa stadijem i gradusom KP, kao i da CXCL16 može stimulirati rast staničnih linija KP koje eksprimiraju CXCR6 (86). Visoka ekspresija CXCL16 i visoka koekspresija CXCL16/CXCR6 u KP je pokazana kao neovisni prognostički faktor lošeg ishoda bolesti (87). ELR-pozitivni kemokini (npr. CXCL8) imaju i angiogeni efekt kod KP. CXCL8 je značajno povišen kod bolesnika sa dijagnosticiranim KP u odnosu na zdrave ljude i muškarce s BHP. Aplikacija CXCL8 neutralizirajućih protutijela inhibira tumorski rast i angiogenezu u KP na mišjem modelu (77)(87). Pokazano je kako je i CCR9 visoko eksprimiran u stanicama KP. Neke su studije pokazale kako ekspresija i aktivacija CCR9 utječe

na migraciju stanica, invaziju i ekspresiju matriks-metaloproteinaza (MMP), što zajedno može utjecati na metastaziranje KP(88). Studija Tsaur i sur. je pokazala kako je aktivnost u ekspresiji gena za CCL2 i CCR6 bila značajnije viša u tumorskom tkivu u usporedbi s normalnim tkivom prostate. CCL2 je bio viši i u krvi pacijenata s KP u usporedbi s kontrolama, a CCR2 tkivna mRNA je negativno korelirala s GS i gradusom KP (89). Studija Izumi i sur. je uspoređivala CCL2 kao komplementarni biomarker PSA kod KP. Bolesnici s višim razinama CCL2 su imali lošiji ishod od onih s nižim razinama ovog kemokina te je zaključeno kako CCL2 može poslužiti kao novi biomarker za KP te kako kombinacija CCL2 i PSA bolje predviđa postojanje KP od pojedinačnog biomarkera (90).

Razvoj i progresija KP je praćena promjenama i u razini CXC kemokina, posebice CXCL12, CXCL13, te receptora CXCR3 i CXCR5. Budući terapijski modaliteti usmjereni u liječenje KP bi potencijalno mogli ciljati jedan ili više ranije navedenih proteina. Također se treba ispitati praktičnost CXC kemokina kao potencijalnih prognostičkih markera za KP (91).

## **2. HIPOTEZA**

Serumska koncentracija kemokina CXCL13 je povišena u bolesnika s karcinomom prostate te korelira s histološkom slikom izraženom GZ i gradusom prema ISUP klasifikaciji.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

**OPĆI CILJ:** Utvrditi visinu serumske koncentracije kemokina CXCL13 i njenu dijagnostičku vrijednost u bolesnika s KP.

#### **SPECIFIČNI CILJEVI:**

1. Utvrditi je li koncentracija CXCL13 u serumu bolesnika kod kojih je dokazan KP viša nego u kontrolnoj skupini koju čine ispitanici koji imaju nalaz biopsije bez KP.
2. Utvrditi je li koncentracija kemokina CXCL13 u serumu viša u onih bolesnika kojima je dokazan agresivniji oblik KP (viši GZ, viši gradus prema ISUP GG klasifikaciji) u odnosu na pacijente s indolentnim KP.
3. Utvrditi da li serumska koncentracija CXCL13 i/ili multimarkerski pristup (kombinacija CXCL13 i PSA) bolje predviđaju agresivniju formu KP od samog PSA.
4. Utvrditi graničnu vrijednost (engl. "cut-off") serumske koncentracije CXCL13 koja sa visokom osjetljivošću i specifičnošću selekcionira bolesnike s KP.

## **4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA**

### **4.1. Ispitanici**

U ovu prospektivnu opservacijsku studiju je bio uključen ukupno 161 ispitanik. Ispitanici su pacijenti kojima je indicirana i učinjena transrektalna biopsija prostate na Klinici za urologiju KBC Zagreb. Pacijentima je na dan biopsije uzet uzorak krvi radi određivanja koncentracije serumskog CXCL13. Ispitanici su na temelju patohistološkog nalaza biopsije podijeljeni u dvije skupine:

1. Ispitanici s dokazanim KP (86 pacijenata)
2. Kontrolna skupina koju su činili ispitanici s patohistološkim nalazom bioptata prostate u kojem nije nađen KP (75 pacijenata).

Koncentracija kemokina u serumu određena je standardiziranim kvantitativnim enzimskim imunotestovima.

Kriteriji za uključenje ispitanika u studiju:

1. Pacijenti kojima je specijalist urolog, na temelju suspektnog digitorektalnog pregleda i/ili povišene koncentracije PSA indicirao transrektalnu biopsiju prostate

Kriteriji za isključenje ispitanika iz studije:

1. Akutna infektivna bolest
2. Autoimuna bolest
3. Poznati drugi maligni proces

### **4.2. Biološki uzorci**

Od svih ispitanika je venepunkcijom na dan biopsije prostate uzeto 5 ml seruma radi dokaza kemokina. Navedeni uzorci su spremljeni na -20°C tijekom predviđenog vremena trajanja studije. Bioptati prostatičnog tkiva su pohranjeni u formalin te poslani u Zavod za patologiju Kliničkog Bolničkog Centra Zagreb radi patohistološke analize.

### **4.3. Biopsija prostate**

Biopsije prostate su napravljene u Centru za prostatu pri Klinici za urologiju KBC Zagreb. Biopsije prostate su rađene transrektalnim putem pod kontrolom ultrazvučne sonde nakon aplikacije lokalnog anestetika u preriprostatično tkivo. Tijekom biopsije je kod svakog bolesnika uzeto dvanaest cilindara iz PZ prostate, šest iz lijevog i šest iz desnog lobusa.

Biopsiju prostate indicirao je specijalist urolog na temelju povišene vrijednosti PSA i/ili suspektnog digitorektalnog pregleda prostate (DRP).

Kontraindikacije za biopsiju prostate su bile:

1. Akutni prostatitis
2. Nekorigirani poremećaji u koagulogramu uzrokovani terapijom ili usljed nasljedne/stečene bolesti

### **4.4. Metode**

#### **4.4.1. Analiza PSA**

Alinity i® test (Abbott Laboratories, IL, USA) za ukupni serumski PSA je kemoluminiscentni imunološki test mikročestica koji se koristi za kvantitativno određivanje ukupnog PSA (slobodnog PSA i PSA vezanog za alfa-1-antikimotripsin) u humanom serumu na Alinity i® analizatoru (Abbott Laboratories, IL, USA). Alinity i® test ukupnog PSA je ekvimolaran. Testovi ekvimolarnog odgovora imaju ekvivalentan odgovor i na slobodni PSA i na PSA-vezan za alfa-1-antikimotripsin. Ovaj test je imunološki test u dva koraka za kvantitativno određivanje ukupnog PSA (slobodni PSA i PSA s kompleksom alfa-1-antikimotripsin) u ljudskom serumu primjenom tehnologije testa kemoluminiscentnih mikročestica (engl. chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA)). Uzorak i paramagnetske nanočestice obložene protutijelima protiv PSA se kombiniraju i stave u inkubator. PSA prisutan u serumu se veže na paramagnetske nanočestice obložene protutijelima, nakon inkubacije, otopina se ispere. U otopinu se potom dodaju anti PSA protutijela označena akrinidiniumom. Nakon ciklusa pranja dodaju se otopine za aktiviranje. Rezultirajuća kemoluminiscentna reakcija mjeri se kao relativne svjetlosne jedinice (engl. relative light units (RLUs)). Postoji izravna veza između količine ukupnog PSA u uzorku i RLU otkrivenih pomoću optičkog sustava analizatora.

#### **4.4.2. Kvantifikacija kemokina CXCL13 u serumu**

Koncentracija kemokina u biološkim uzorcima ispitanika određena je standardiziranim kvantitativnim enzimskim imunotestovima Quantikine Human CXCL10/IP-10 ELISA test, Quantikine Human CXCL11/I-TAC ELISA test i Quantikine Human CXCL13/ BLC/BCA-1 ELISA test (R&D Systems, Minneapolis, SAD) prema uputama proizvođača. Rezultati testova očitani su primjenom optičkog čitača mikrotitracijskih pločica Captia Reader (Trinity Biotech, Wicklow, Irska). Testovi se temelje na principu kvantitativnog enzimskog imunotesta u kojem su na jažice mikrotitracijske pločice vezana monoklonska protutijela specifična za kemokin. Ukoliko biološki uzorci sadrže molekule određenog kemokina, one će se vezati za imobilizirana monoklonska protutijela. Nakon ispiranja nevezanih supstanci, u jažice mikrotitracijske pločice dodaje se poliklonsko protutijelo specifično za kemokin koje je konjugirano s enzimom (peroksidaza iz hrena). Nakon ispiranja, dodaje se substrat te enzimskom reakcijom nastaje obojeni produkt. Reakcija se zaustavlja kemijskim putem, a izmjerena optička gustoća (apsorbancija) proporcionalna je koncentraciji kemokina u uzorku koja se računa putem standardne krivulje.

#### **4.5. Statističke metode**

Kategorički podaci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike među kategoričkim varijablama testirane su Hi-kvadrat testom, a po potrebi Fisher-ovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro - Wilkovim testom. Numerički podaci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele te medijanom i granicama interkvartilnog raspona u drugim slučajevima. Sredine numeričkih varijabli od interesa su ocijenjene 95% rasponom pouzdanosti. Za testiranje razlika numeričkih varijabli između dvije nezavisne skupine ispitanika korišten je Studentov t-test i Mann-Whitneyev U test (uz Hodges-Lehmann razliku medijana), u zavisnosti o normalnosti raspodjele. Za testiranje razlika 3 i više numeričkih varijabli korišten je Kruskal-Wallis test (post-hoc Conover test). Povezanost numeričkih varijabli ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije  $\rho$  (rho) i Kendallovim  $\tau$  (povezanost s GZ i ISUP klasifikacijom). Logističkom regresijom ocijenjen je utjecaj serumske koncentracije kemokina CXCL13 na vjerojatnost da će promatrani pacijenti imati karcinom prostate, ili da će pacijenti



s dokazanim karcinomom prostate imati gradus veći od 2. Sve p rijednosti su dvostrane. Odabrana razina značajnosti je 0.05. Za analizu podataka korišten je statistički program MedCalc Statistical Software version 18.11.3 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019.) i SPSS (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Opća i klinička obilježja ispitanika

Istraživanje je provedeno na 161 bolesniku, od kojih je 75 (46,6 %) imalo nalaz biopsije prostate bez karcinoma, a kod 86 (53,4 %) bolesnika je biopsijom dokazan KP. Aritmetička sredina dobi bolesnika je 68 godina (standardne devijacije SD od 7.7 godina), bez značajne razlike u odnosu na promatrane skupine (Tablica 1).

Tablica 1. Razlika u dobi bolesnika u odnosu na skupine.

	Aritmetička sredina (standardna devijacija)		Razlika	95% CI		P*
	Bez karcinoma	KP		od	do	
Dob ispitanika (godine)	68 (8,1)	69 (7,4)	-1,5	-3,9	0,9	0,21

\*Studentov t test

Prema nalazu DRP-a, nesuspektan nalaz je imalo 77 (55,4 %) ispitanika, a suspektan njih 62 (44,6 %), bez značajne razlike prema tome imaju li uredan nalaz biopsije ili ne. Uredan nalaz urina značajnije su češće imali ispitanici s dokazanim KP ( $\chi^2$  test,  $p < 0,001$ ) (Tablica 2).

Tablica 2. Osnovna obilježja ispitanika u odnosu na rezultat biopsije prostate.

	Broj (%) bolesnika			P*
	Bez karcinoma	KP	Ukupno	
Digitorektalni pregled†				
Nesuspektan	38 (64,4)	39 (48,8)	77 (55,4)	0,07
Suspektan	21 (35,6)	41 (51,3)	62 (44,6)	
Ukupno	59 (100)	80 (100)	139 (100)	
Nalaz urina°				
Uredan nalaz	0	8/9	8/21	<b>&lt; 0,001</b>
3 – 5 E	12/12	1/9	13/21	

\* $\chi^2$  test.

†Dio ispitanika u obje skupine nije imao naveden DRP.

°Dio ispitanika u obje skupine nije imao nalaz sedimenta urina.

Komorbidity su imala 44 (37 %) bolesnika. Hipertenzija, kao komorbiditet je bila prisutna kod 23 (14.3 %) ispitanika, dijabetes kod 7 (4.3 %), infarkt miokarda u anamnezi je imalo njih 5 (3.1 %), po jedan (0.6 %) ispitanik je naveo astmu, kroničnu opstruktivnu plućnu bolest, stanje nakon operacije karcinoma kolona, transplantirani bubreg, kronični prostatitis, cerebrovaskularni inzult, kroničnu renalnu insuficijenciju, bazaliom, glaukom. Četiri (2.5 %) ispitanika je do sada već imalo biopsiju prostate, a u njih 3 (1.9 %) je učinjena nefrektomija. Antibioticima je prije biopsije prostate liječeno 7 (5.1 %) ispitanika i to najčešće ciprofloksacinom i levofloksacinom (Tablica 3).

Tablica 3. Komorbiditeti i liječenje antibioticima u odnosu na nalaz biopsije prostate

	Broj (%) bolesnika			P*
	Bez karcinoma	KP	Ukupno	
Komorbiditeti				
Da	16 (48.5)	28 (32.6)	44 (37)	0.11
Ne	17 (51.5)	58 (67.4)	75 (63)	
Ukupno	33 (100)	86 (100)	119 (100)	
Liječenje antibioticima prije biopsije				
Da	4 (6.3)	3 (4.1)	7 (5.1)	0.71 <sup>†</sup>
Ne	60 (93.8)	70 (95.9)	130 (94.9)	
Ukupno	64 (100)	73 (100)	137 (100)	

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzakti test

Bolesnici s urednim nalazom biopsije prostate su značajno češće koristili alfa-blokatore ( $\chi^2$  test, P = 0.004) i inhibitore 5 alfa-reduktaze (Fisherov egzakti test, p < 0.001) u odnosu na bolesnike s dokazanim KP (Tablica 4).

Tablica 4. Primjena alfa-blokatora i inhibitora 5 alfa-reduktaze u odnosu na nalaz biopsije prostate

	Broj (%) bolesnika			P*
	Bez karcinoma	KP	Ukupno	
Alfa - blokatori				
Da	22 (41.5)	11 (17.2)	33 (28.2)	<b>0.004</b>
Ne	31 (58.5)	53 (82.8)	84 (71.8)	
Inhibitori 5 alfa-reduktaze				
Da	10 (18.9)	0	10 (8.5)	<b>&lt; 0.001<sup>†</sup></b>
Ne	43 (81.1)	64 (100)	107 (91.5)	
Ukupno	53 (100)	64 (100)	117 (100)	

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test

## 5.2. Razlike u vrijednostima PSA, volumena prostate i serumske koncentracije kemokina CXCL13 u odnosu na skupine

Značajno su niže vrijednosti PSA u skupini ispitanika kojima biopsijom nije dokazan KP (Mann Whitney U test,  $p = 0.02$ ). Volumen prostate je značajno manji kod ispitanika s dokazanim KP, središnje vrijednosti (medijan) 40 ml (interkvartilnog raspona od 30.5 ml do 62.5 ml) u rasponu od 26 ml do 130 ml, u odnosu na ispitanike kojima nije dokazan KP (Mann Whitney U test,  $p = 0.004$ ) (Tablica 5).

Tablica 5. Vrijednosti PSA u odnosu na nalaz biopsije prostate

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika (Hodges- Lehman)	95% CI		P*
	Bez karcinoma	KP		od	do	
PSA (prostata specifični antigen) (n = 75:86)	6,6 (5.1 – 10.9)	8,7 (5.7 – 16.0)	1.45	0.27	3.06	<b>0.02</b>
Volumen prostate (n = 43:29)† [ml]	70 (40 - 93)	40 (30.5 – 62.5)	-20	-38	-6	<b>0.004</b>

\*Mann Whitney U test

† podatci o volumenu prostate nisu bili dostupni za 89 ispitanika u obje skupine.

U omjeru f/t PSA i u serumskoj koncentraciji kemokina CXCL13 nije nađeno značajnih razlika u odnosu na to kakav je nalaz biopsije prostate (Tablica 6).

Tablica 6. Razlika u omjeru f/t PSA i serumске koncentracije kemokina CXCL13 u odnosu na nalaz biopsije prostate.

	Aritmetička sredina (standardna devijacija)		Razlika	95% CI		P*
	Uredan nalaz	Ca prostate		od	do	
f/t PSA (n = 17:13)°	18.4 (7.1)	16.1 (7.4)	2.3	-3.2	7.7	0.40
Serumska koncentracija kemokina CXCL13 (n = 72:82)†	103.1 (44.9)	100.3 (44.2)	-2.8	-17.0	11.4	0.70

\*Studentov t test

° Podatci o f/t PSA nisu bili dostupni za ukupno 131 spitanika u obje grupe

† Podatci za CXCL 13 nisu bili dostupni za ukupno 7 ispitanika u obje grupe

Prema omjeru f/t PSA veći rizik je prisutan kod 20 (66.7 %) pacijenata, bez značajne razlike u odnosu na skupine (Tablica 7).

Tablica 7. Bolesnici prema riziku omjera f/t PSA u odnosu na nalaz biopsije prostate.

	Broj (%) bolesnika			P*
	Bez karcinoma	KP	Ukupno	
Rizik				
Veći (f/t PSA do 20%)	11 (64.7)	9 (69.2)	20 (66.7)	> 0.99
Manji (f/t PSA > 20%)	6 (35.3)	4 (30.8)	10 (33.3)	
Ukupno	17 (100)	13 (100)	30 (100)	

\* Fisherov egzaktni test

Vrijednosti kemokina CXCL13 su bile značajno niže, medijana 67.3 (interkvartilnog raspona od 60.5 do 84.9) u skupini spitanika koji su se prije liječili antibioticima (Hodges-Lehmanova razlika 33.2, 95% CI od 5.2 do 66.7, Mann Whitney U test  $p = 0.02$ ), u odnosu na one ispitanike koji nisu liječeni antibioticima. Nema značajnih razlika u volumenu prostate, PSA i omjeru f/t PSA u odnosu na to jesu li ispitanici prije liječeni antibiotikom (Tablica 8).

Tablica 8. Razlike u volumenu prostate, vrijednosti PSA, omjeru f/t PSA i serumskoj koncentraciji kemokina CXCL13 u odnosu na prijašnje liječenje antibiotikom.

	Medijan (interkvartilni raspon) prema uzimanju antibiotika		Razlika (Hodges- Lehman)	95% CI		P*
	Liječeni antibiotikom	Nisu liječeni antibiotikom		od	do	
Kemokin CXCL13 (n = 6:124)	67.3 (60.5 – 84.9)	101.5 (75.3 – 135.8)	33.2	5.2	66.7	<b>0.02</b>
Volumen prostate (n = 4:59) [ml]	48 (30.3 – 86)	47 (35 – 78)	5	-	-	0.78
PSA (n = 7:130)	6.52 (6.5 – 16.2)	7.41 (5.4 – 14.1)	-0.59	-3.22	3.44	0.60
f/t PSA (n = 2:22)	24 (12.7 – 24.9)	16 (10.8 – 23.3)	-7	-	-	0.23

\*Mann Whitney U test

S obzirom na nalaz DRP-a, nije bilo razlika u volumenu prostate, vrijednosti PSA, omjeru f/t PSA i serumskoj koncentraciji kemokina CXCL13 (Tablica 9).



Tablica 9. Razlike u volumenu prostate, vrijednosti PSA, omjeru f/t PSA i serumskoj koncentraciji kemokina CXCL13 u odnosu na DRP.

	Medijan (interkvartilni raspon) prema DRP		Razlika (Hodges- Lehman)	95% CI		P*
	Nije suspektno	Suspektno		od	do	
Kemokin CXCL13 (n = 75:59)	80.6 (67 – 101.9)	102.5 (67.9 – 135.9)	10.7	-4.5	25	0.17
Volumen prostate (n = 45:21) [ml]	44.2 (30.5 – 62.5)	50 (30 – 76.5)	-6	-19	9	0.31
PSA (n = 77:62)	7.94 (5.86 – 15.0)	8.35 (5.5 – 14.6)	0.24	-1.2	1.8	0.73
f/t PSA (n = 14:9)	15.5 (10 – 18.5)	17.0 (8.5 – 20.5)	-3.5	-10	3	0.31

DRP – digitalno-rektalni pregled; \*Mann Whitney U test

### **5.3. Povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13, dobi pacijenata, vrijednosti PSA, f/t PSA i volumena prostate**

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenjena je povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13, dobi pacijenata, vrijednosti PSA, f/t PSA i volumena prostate. U obje skupine ispitanika uz više serumske koncentracije kemokina CXCL13 postoji pozitivna korelacija sa starijom dobi (Spearmanov koeficijent korelacije  $Rho = 0.163$   $p = 0.04$ ). Mlađi ispitanici su imali niže vrijednosti f/t PSA (Spearmanov koeficijent korelacije  $Rho = 0.393$   $p = 0.03$ ). Niže vrijednosti PSA su imali oni ispitanici sa manjim volumenom prostate, ispitanici većeg volumena su imali više vrijednosti PSA (Spearmanov koeficijent korelacije  $Rho = 0.434$   $p < 0.001$ ).

Kod pacijenata koji su imali nalaz biopsije u kojem nije nađen KP, ispitanici s većim vrijednostima PSA su imali i veći volumen prostate (Spearmanov koeficijent korelacije  $Rho = 0.597$   $p < 0.001$ ) i obratno, dok nije bilo značajnih povezanosti između drugih vrijednosti.

U skupini pacijenata kojima je potvrđen KP, više vrijednosti CXCL13 su imali stariji pacijenti u odnosu na mlađe (Spearmanov koeficijent korelacije  $Rho = 0.250$   $p = 0.02$ ). Stariji ispitanici su imali značajno više vrijednosti f/t PSA (Spearmanov koeficijent korelacije  $Rho = 0.586$   $p = 0.03$ ) u odnosu na mlađe ispitanike. U skupini oboljelih od KP ispitanici većeg volumena prostate su imali i veće vrijednosti PSA (Spearmanov koeficijent korelacije  $Rho = 0.458$   $p = 0.01$ ), a PSA je i u negativnoj vezi s f/t PSA (Spearmanov koeficijent korelacije  $Rho = -0.689$   $p = 0.009$ ) (Tablica 10).

Tablica 10. Povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13, dobi bolesnika, volumena prostate, te vrijednosti PSA i f/t PSA

	Spearmanov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) (P vrijednost)			
	CXCL13	Dob	Volumen prostate	PSA
Svi ispitanici				
CXCL13	-			
Dob	<b>0.163 (0,04)</b>	-		
Volumen prostate	-0.055 (0.65)	0.191 (0.11)	-	
PSA	-0.056 (0.49)	0.093 (0.24)	<b>0.434 (&lt;0.001)</b>	-
f/t PSA	0.085 (0.66)	<b>0.393 (0.03)</b>	0.015 (0.97)	-0.359 (0.05)
Bolesnici s urednim nalazom biopsije				
CXCL13	-			
Dob	0.095 (0.43)	-		
Volumen prostate	-0.162 (0.30)	0.104 (0.51)	-	
PSA	-0.128 (0.29)	0.164 (0.16)	<b>0.597 (&lt;0.001)</b>	-
f/t PSA	-0.009 (0.97)	0.291 (0.26)	-0.523 (0.23)	-0.086 (0.74)
Bolesnici s potvrđenim KP				
CXCL13	-			
Dob	<b>0.250 (0.02)</b>	-		
Volumen prostate	-0.091 (0.64)	0.347 (0.07)	-	
PSA	0.045 (0.69)	-0.012 (0.91)	<b>0.458 (0.01)</b>	-
f/t PSA	0.204 (0.50)	<b>0.586 (0.03)</b>	-	<b>-0.689 (0.009)</b>

### 5.3.1. Utjecaj serumske koncentracije kemokina CXCL13 i PSA na vjerojatnost pozitivnog nalaza biopsije (regresijska analiza)

Regresijskom analizom (logistička regresija) ocijenjen je utjecaj serumske koncentracije kemokina CXCL13 i PSA te DRP-a (kao prediktora) na vjerojatnost da će kod promatranih pacijenata doći do pozitivnog nalaza biopsije (zavisna varijabla), pokazano je da PSA ima, a CXCL13 nema utjecaj na vjerojatnost pozitivnog nalaza biopsije (Tablica 11).

Tablica 11. Predviđanje vjerojatnosti pozitivnog nalaza biopsije (univarijatna regresijska analiza).

Parametar	$\beta$	Standardna pogreška	Wald	P	Omjer vjerojatnosti (Exp $\beta$ )	95% CI za Exp $\beta$
Serumska koncentracija kemokina CXCL13	-0.001	0.004	0.16	0.69	0.99	0.991– 1.006
PSA	0.047	0.020	5.68	<b>0.01</b>	1.05	1.008 – 1.089
Digitorektalni pregled - suspekti	0.64	0.35	3.34	0.06	1.9	0.95 – 3.79

$\beta$  – regresijski koeficijent

Kao model za analizu usporedbe serumske koncentracije kemokina CXCL13 zajedno s PSA, primijenili smo multivarijatnu logističku regresiju.

Model je u cijelosti statistički značajan ( $\chi^2 = 12.42$ ,  $P = 0.006$ ), u cjelini objašnjava između 8.9 % (po Cox & Snell) i 11.9 % (po Nagelkerke) varijance, te točno klasificira 56.72 % slučajeva. Jedini značajan prediktor je PSA (omjer vjerojatnosti 1.1) (Tablica 12).

Tablica 12. Predviđanje vjerojatnosti pozitivnog nalaza biopsije (multivarijatna regresijska analiza).

Parametar	$\beta$	Standardna pogreška	Wald	P	Omjer vjerojatnosti (Exp $\beta$ )	95% CI za Exp $\beta$
Serumska koncentracija kemokina CXCL13	-0.005	0.004	1.53	0.22	0.99	0.98 – 1.003
PSA	0.05	0.02	4.35	<b>0.04</b>	1.05	1.003 – 1.09
Suspektan DRP	0.67	0.37	3.22	0.07	1.96	0.94 – 4.08
Konstanta	-0.023	0.53	0.002	0.96		

$\beta$  – regresijski koeficijent

### 5.3.2. Uloga PSA i kemokina CXCL13 u pozitivnom nalazu biopsije (ROC analiza)

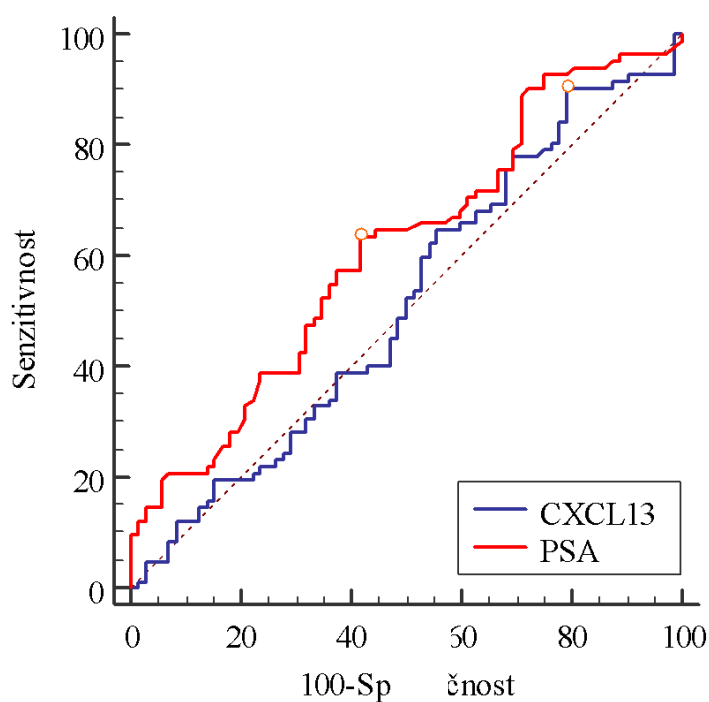
Metoda ROC-krivulje odabrana je kao jednostavan način procjene uloga PSA i CXCL13 između skupine ispitanika s obzirom na pozitivan nalaz biopsije, a određena je temeljem specifičnosti i senzitivnosti. Mijenjana je točka razlučivanja za pojedinu skupinu ispitanika kako bi se stvaranjem ROC-krivulje moglo objektivno utvrditi koja vrijednost najbolje razlučuje uspoređene skupine.

Kod ispitanika jedino smo vrijednost PSA mogli prikazati kao dijagnostički pokazatelj pozitivnog nalaza biopsije (senzitivnost = 61.6, specifičnost = 58.7,  $p = 0.02$ ), s graničnom vrijednosti (eng. cut-off)  $> 7.35$ . (Tablica 13 i Slika 1).

Tablica 13. Parametri ROC krivulje promatranih parametara s obzirom na nalaz biopsije.

Parametar	AUC*	95% CI	Senzitivnost	Specifičnost	Točka razlučivanja (cut off)	P	Youden index
PSA	0.607	0.527 – 0.683	61.6	58.7	> 7.35	<b>0.02</b>	0.20
CXCL13	0.514	0.432 – 0.595	90.2	20.8	≤ 150.6	0.77	0.11

\*površina ispod krivulje (engl. area under the curve(AUC))



Slika 1. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za PSA i CXCL13, s obzirom na pozitivan/negativan nalaz biopsije prostate

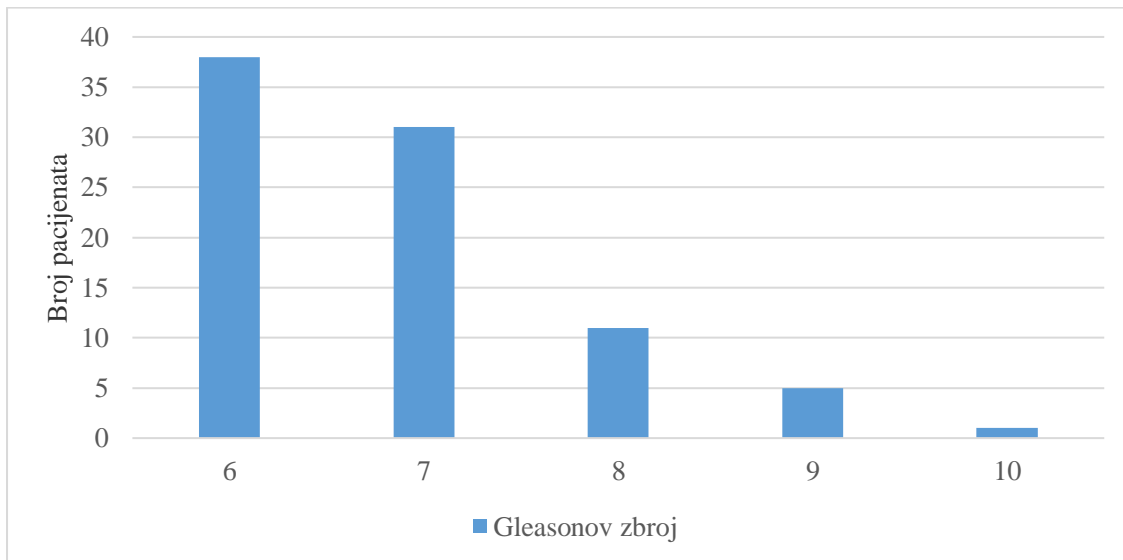
#### 5.4. Gleasonov zbroj i ISUP klasifikacija

Hstološka slika KP je izražena GZ i gradusom prema ISUP klasifikaciji. Najviše bolesnika, njih 64 (74.4 %) je imalo prvu vrijednost 3, 18 (20.9 %) vrijednost 4, a 4 (4.7 %) su imala Gleason vrijednost 5 (Tablica 14).

Tablica 14. Ispitanici u odnosu na Gleasonovu vrijednost 1. i 2 u GZ.

Gleason prva vrijednost	Broj (%) bolesnika	Gleason druga vrijednost	Broj (%) bolesnika
3	64 (74.4)	3	51 (59.3)
4	18 (20.9)	4	26 (30.2)
5	4 (4.7)	5	9 (10.5)

GZ je za 38 (44.2 %) ispitanika bio šest (6), a najviši zbroj 10 je imao samo jedan (1.2 %) (Slika 2).



Slika 2. Raspodjela bolesnika s karcinomom prostate prema GZ.

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenjena je povezanost GZ s dobi ispitanika, kemokinom CXCL13, PSA i omjerom f/t PSA. Pokazana je značajna pozitivna veza između povišenih vrijednosti PSA i većeg GZ (Spearmanov koeficijent korelacije  $\rho = 0.480$ ,  $p < 0.001$ ), dok ostale vrijednosti nisu u značajnoj vezi (Tablica 15).

Tablica 15. Povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13, dobi ispitanika, volumena prostate, te vrijednosti PSA i omjera f/t PSA u skupini sa KP.

	Spearmanov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) (P vrijednost) GZ
Kemokin CXCL13	0.143 (0.20)
Dob	0.147 (0.18)
Volumen prostate	0.018 (0.92)
PSA	<b>0.480 (&lt;0.001)</b>
f/t PSA	0.074 (0.81)

S obzirom na rezultat DRP-a u ispitanika kojima je biopsijom dokazan KP, kod suspektnih je značajno viši Gleasonov zbroj (Mann Whitney U test,  $P = 0.02$ ) te su značajno više vrijednosti kemokina CXCL13 (Mann Whitney U test,  $P = 0.03$ ) u odnosu na ispitanike s nesuspektnim rezultatom DRP-a (Tablica 16).



Tablica 16. Razlike u volumenu prostate, vrijednosti PSA, omjeru f/t PSA i serumskoj koncentraciji kemokina CXCL13 u odnosu na rezultat DRP-a u skupini oboljelih od KP.

	Medijan (interkvartilni raspon) prema DRP		Razlika (Hodges- Lehman)	95% CI		P*
	Ne suspektno	Suspektno		od	do	
Gleasonov zbroj (n = 39:41)	6 (6 – 7)	7 (6 – 8)	0	0	1	<b>0.02</b>
Kemokin CXCL13 (n = 37:39)	80.6 (32.7 – 200.8)	100.5 (69.2 – 135.9)	18.5	1.3	36.3	<b>0.03</b>
Volumen prostate (n = 17:10) [ml]	44.2 (30.5 – 62.5)	40 (30 – 55.3)	0	-15	10	0.80
PSA (n = 39:41)	7.94 (5.86 – 15.0)	9.9 (5.6 – 17.8)	0.74	-1.56	3.9	0.53
f/t PSA (n = 6:6)	15.5 (10 – 18.5)	15.5 (6.25 – 23.5)	1	-11	9	0.94

DRP – digitalno-rektalni pregled; \*Mann Whitney U test

Prema GZ ispitanici su podijeljeni u prognostičke skupine. Najviše ispitanika, njih 39(45.3%) je bilo u skupini gradusa 1 (od 2 do 6), 18 (20.9 %) ih je bilo u skupini gradusa 2 (3 + 4). Po 12 (14 %) ispitanika je svrstano u skupinu gradusa 3 (4 + 3) ili 4 ( GZ 8), dok u skupinu gradusa 5 (od 9 do 10) je svrstano 5 (5.8 %) ispitanika (Tablica 17).

Tablica 17. Raspodjela pacijenata prema ISUP klasifikaciji

Gleasonov zbroj	ISUP	Broj (%) pacijenata
2 do 6	1	39 (45.3)
3 + 4	2	18 (20.9)
4 + 3	3	12 (14)
8	4	12 (14)
9 - 10	5	5 (5.8)

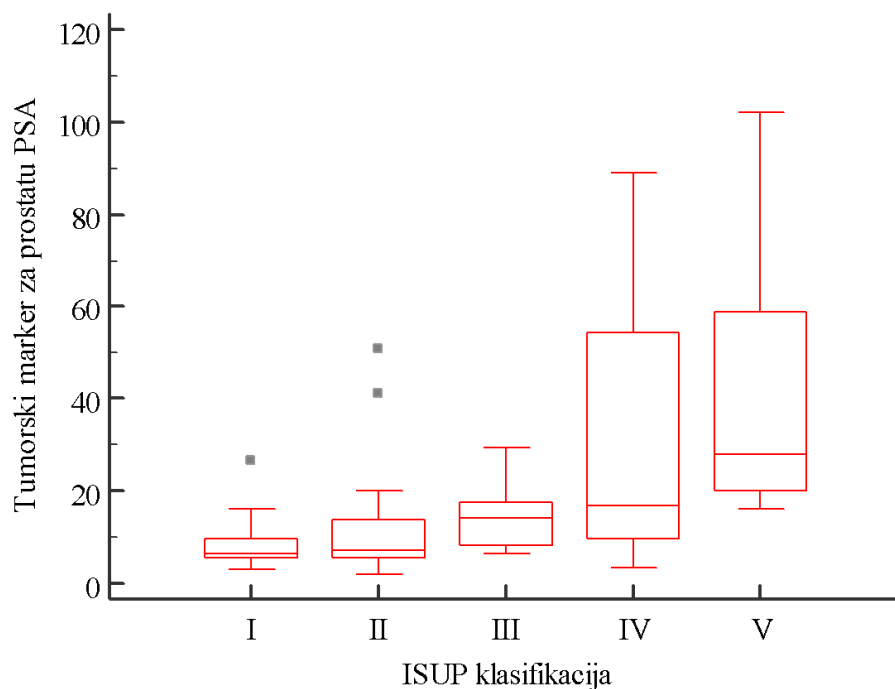
ISUP – *International Society for Urological Pathology*

Nije bilo značajnih razlika u serumskoj koncentraciji kemokina CXCL13, dobi ispitanika, volumena prostate i omjera f/t PSA u odnosu na ISUP klasifikaciju kod ispitanika kojima je potvrđen KP. Vrijednosti PSA bile su značajno više kod većih gradusa prema ISUP klasifikaciji (Kruskal Wallis test,  $p < 0.001$ ) (Post – Hoc Conover test, značajne su usporedbe gradusa: I vs. III, I vs. IV, I vs. V, II vs. III, II vs. IV i II vs.V) (Tablica 18 i Slika 3).

Tablica 18. Volumen prostate, vrijednost PSA, omjer f/t PSA i serumska koncentracija kemokina CXCL13 u odnosu na ISUP klasifikaciju.

	Medijan (interkvartilni raspon) u odnosu na ISUP klasifikaciji					P*
	I	II	III	IV	V	
CXCL13	86.4 (69.2 - 111)	88.5 (62.1 - 136)	101.75 (86.1 - 144)	110.95 (77.6 - 143)	80.6 (63 - 105)	0.34
Dob	67 (61 - 76)	71 (64.5 - 74)	70 (64.3 - 74)	71.5 (63.3 - 76)	73 (62.5 - 79)	0.89
Volumen prostate	44.2 (31 - 58)	35 (29.8 - 48)	75.5 (27.3 - 128)	44.5 (32.5 - 51)	62.5 (45 - 67)	0.49
PSA <sup>†</sup>	6.48 (5.4 - 10)	7.33 (5.6 - 16)	14.1 (8.2 - 18)	17 (9.5 - 55)	28 (18.8 - 73)	<b>&lt;0.001</b>
f/t PSA	16 (8.5 - 22)	15 (n=1)	20 (n=1)	23 (n=1)	10 (n=1)	-

\*Kruskal Wallis test; <sup>†</sup> uz značajnost P < 0.05 značajne su usporedbe gradusa: I vs. III, I vs. IV, I vs. V, II vs. III, II vs. IV i II vs. V (Post-Hoc Conover test)



Slika 3. Vrijednost PSA u odnosu na ISUP klasifikaciju ( $p < 0.001$ )

Ispitanike kojima je biopsijom dokazan KP smo podijelili u tri skupine prema riziku. U skupinu niskog rizika su uvršteni ispitanici ISUP gradusa 1 i sa vrijednostima PSA  $< 10$  ng/ml ( $n = 31$ ). U skupinu srednje rizičnih su uvršteni ispitanici ISUP gradusa od 2 do 3 ili vrijednostima PSA od 10 do 20 ng/ml ( $n = 34$ ). U treću, visoko rizičnu skupinu su uvršteni ispitanici kojima je dodjeljen ISUP gradus 4 i 5 ili sa vrijednostima PSA većim od 20 ng/ml ( $n = 21$ ). Prema riziku nije bilo značajnih razlika u vrijednosti CXCL13, dobi ispitanika te volumenu prostate (Tablica 19).

Tablica 19. Volumen prostate, dob i serumska koncentracija kemokina CXCL13 u odnosu na skupinu bolesnika s karcinomom prostate prema riziku

	Medijan (interkvartilni raspon) u odnosu na rizik			P*
	Niskorizični	Srednje rizični	Visoko rizični	
CXCL13 (n – 31:30:21)	87.6 (69.8 – 100.5)	89.8 (63.8 – 121.6)	102.7 (77.2 – 139.8)	0.35
Dob (n – 31:34:21)	67 (61 – 76)	68,5 (64.8 – 74)	72 (63.5 – 74.5)	0.65
Volumen prostate (n – 9:13:7)	39 (30.5 – 57.5)	40 (30 – 60)	52 (40 – 65)	0.38

\*Kruskal Wallis test (Post-hoc Conover)

Koeficijentom korelacije (Kendall  $\tau$ ) ocijenili smo povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13 i PSA kod bolesnika s KP, s GZ i ISUP gradusom, i uočili da CXCL13 nije značajno povezan s GZ niti s ISUP gradusom. S druge strane, vrijednost PSA je u značajnoj pozitivnoj korelaciji s GZ i s ISUP gradusom; kod viših vrijednosti PSA prisutne su i više vrijednosti GZ, te su ispitanici i većeg gradusa prema ISUP klasifikaciji. Najizraženija pozitivna korelacija je ona PSA s ISUP gradusom (Kendall  $\tau = 0.409$   $p < 0.001$ ) (Tablica 20).

Tablica 20. Povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13 i PSA s prvom i drugom Gleasonovom vrijednosti u GZ te s GZ i ISUP klasifikacijom kod ispitanika s potvrđenim KP.

	Kendallov $\tau$   (P vrijednost)	
	CXCL13	PSA
Gleasonova prva vrijednost u GZ	0.080 (0.37)	<b>0.382 (&lt;0.001)</b>
Gleasonova druga vrijednost u GZ	0.036 (0.68)	<b>0.253 (0.003)</b>
GZ	0.110 (0.20)	<b>0.382 (&lt; 0.001)</b>
ISUP gradus	0.105 (0.21)	<b>0.409 (&lt; 0.001)</b>

#### 5.4.1. Utjecaj serumske koncentracije kemokina CXCL13 i PSA na vjerojatnost većeg rizika (gradus veći od I) (regresijska analiza)

Regresijskom analizom (logistička regresija) ocijenjen je utjecaj serumske koncentracije kemokina CXCL13 i tumorskog biljega za prostatu PSA te rezultat digitorektalnog pregleda (kao prediktora) na vjerojatnost da će bolesnici imati veći rizik (ISUP klasifikacija veća od I (zavisna varijabla)), i uočeno je da PSA ima utjecaj na vjerojatnost većeg rizika (Tablica 21).

Tablica 21. Predviđanje vjerojatnosti većeg rizika (ISUP gradus veći od I) (univarijatna regresijska analiza)

Parametar	$\beta$	Standardna pogreška	Wald	P	Omjer vjerojatnosti (Exp $\beta$ )	95% CI za Exp $\beta$
Serumska koncentracija kemokina CXCL13	0.0004	0.005	0.007	0.93	1.0	0.99 – 1.01
PSA	0.38	0.11	13.35	<b>&lt;0.001</b>	1.47	1.20 – 1.80
DRP - suspekti	0.64	0.48	1.78	0.18	1.90	0.74 – 4.86

$\beta$  – regresijski koeficijent

Ako promatramo kao model serumsku koncentraciju kemokina CXCL13 zajedno s PSA i rezultat DRP-a, primijenjena je multivarijatna logistička regresija. Model je u cijelosti statistički značajan ( $\chi^2 = 36.85$ ,  $p < 0.001$ ), i u cjelini objašnjava između 38.4 % (po Cox & Snell) i 52.8 % (po Negelkerke) varijance, te točno klasificira 64.47 % slučajeva. Jedini značajan prediktor je PSA (omjer vjerojatnosti 1.54) (Tablica 22).

Tablica 22. Predviđanje vjerojatnosti pozitivnog nalaza biopsije (multivarijatna regresijska analiza)

Parametar	$\beta$	Standardna pogreška	Wald	P	Omjer vjerojatnosti (Exp $\beta$ )	95% CI za Exp $\beta$
Serumska koncentracija kemokina CXCL13	0.002	0.007	0.06	0.81	1.002	0.99 – 1.02
PSA	0.43	0.12	12.74	<b>&lt; 0.001</b>	1.54	1.21 – 1.95
DRP- suspekti	0.59	0.64	0.84	0.36	1.80	0.51 – 6.32
Konstanta	-3.71	1.27	8.61	0.003		

$\beta$  – regresijski koeficijent

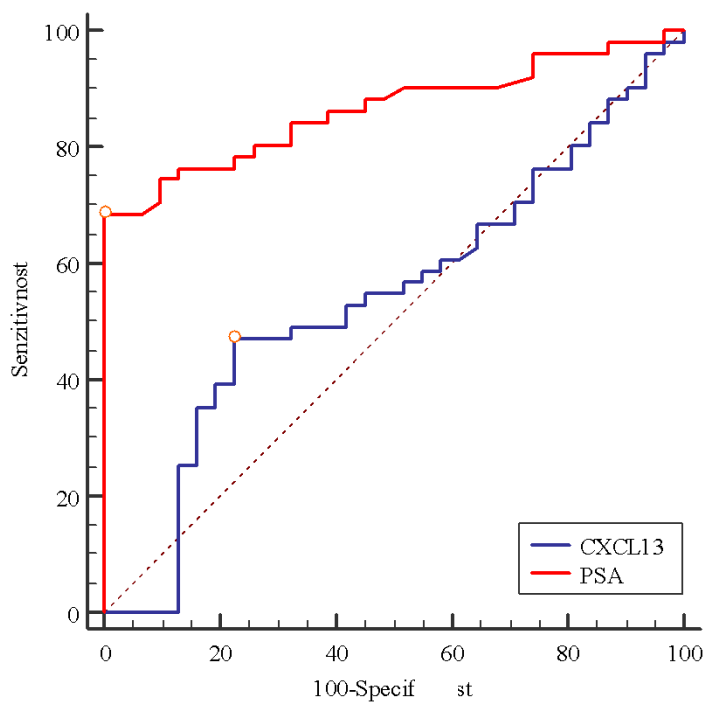
#### 5.4.2. Uloga PSA i kemokina CXCL13 kod ispitanika s većim rizikom (ISUP gradus veći od I) u skupini s karcinomom prostate (ROC analiza)

Metoda ROC-krivulje odabrana je kao jednostavan način određivanja većeg rizika (gradus veći od I), a određuje se temeljem specifičnosti i senzitivnosti. Mijenjana je točka razlučivanja za pojedinu skupinu ispitanika (*engl. cut-off point*), kako bi se stvaranjem ROC-krivulje moglo objektivno utvrditi koja vrijednost najbolje razlučuje uspoređene skupine. Kod ispitanika jedino se vrijednost PSA mogla prikazati kao dijagnostički pokazatelj većeg rizika kod oboljelih od KP (senzitivnost = 65.45, specifičnost = 100,  $p < 0.001$ ), s graničnom vrijednosti  $> 9.9$  (Tablica 23 i Slika 4).

Tablica 23. Parametri ROC krivulje promatranih parametara s obzirom na veći rizik (gradus veći od I) kod oboljelih od KP.

Parametar	AUC*	95% CI	Senzitivnost	Specifičnost	Točka razlučivanja (cut off)	P	Youden index
PSA	0.841	0.746 – 0.911	65.45	100.00	> 9.9	<b>&lt;0.001</b>	0.65
CXCL13	0.543	0.429 – 0.654	47.06	77.42	> 100.5	0.51	0.24

\*površina ispod krivulje



Slika 4. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za PSA i CXCL13, s obzirom na veći rizik (gradus veći od I) kod oboljelih od KP.



## 6. RASPRAVA

Nekoliko studija probira na KP koje su provedene kasnih 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća dokazalo je da PSA može otkriti veći broj muškaraca sa KP u klinički lokaliziranom stadiju u usporedbi s do tada jedinom dostupnom metodom detekcije (DRP). Navedene studije su postavile temelj masovnoj upotrebi PSA u probiru na KP, posebno u SAD-u. To je rezultiralo brzim porastom incidencije KP (92). Probir na KP može izazvati mnoge neželjene učinke, uključujući tjeskobu zbog viših vrijednosti PSA uzrokovanih benignim stanjima kao i komplikacije od daljnjih postupaka, prvenstveno vezanih uz biopsiju prostate. Najveći problem probira na KP koristeći PSA je dijagnoza indolentnog, sporo rastućeg KP koji inače ne bi bio dijagnosticiran tijekom života muškarca, odnosno nebi ugrozio bolesnika (93). Probir na KP pomoću PSA i njegov utjecaj na smanjenje smrtnosti je proučavan u nekoliko velikih randomiziranih prospektivnih studija u kojima su se uspoređivali ishodi kod muškaraca u dobi između 50 i 70 godina koji su podijeljeni u dvije skupine, jednoj je rađen redoviti probir sa PSA u razmacima od 2 do 4 godine dok muškarci u kontrolnoj skupini nisu pozivani na testiranje. Europska randomizirana studija probira na KP (engl. European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, ERSPC) je izvjestila o smanjenju smrtnosti od KP za 20% (omjer stope [RR] 0,80, 95% CI 0,72–0,89,  $p < 0,001$ ) nakon 16 godina praćenja u korist probira. U ovoj studiji je zaključeno da kako bi se spriječio jedan smrtni slučaj potrebno je na probir pozvati 570 muškaraca dok se biopsijom mora dokazati 18 slučajeva KP (94). Švedska studija Göteborg-1 nakon 18 godina praćenja je publicirala rezultate u kojima je smanjenje smrtnosti od KP kroz probir 35% (RR 0,65, 95% CI 0,49–0,87,  $p = 0,003$ ). Kako bi se spriječio jedan smrtni slučaj od KP kroz vrijeme praćenja od 18 godina, broj muškaraca koji je morao biti pozvan na probir bio je 231, dok je biopsijom trebalo dijagnosticirati 10 slučajeva (95). Nasuprot tome, nakon 17 godina praćenja u studiji Prostata, Pluća, Kolorektum i Jajnik (engl. Prostate, Lung, Colorectal, Ovarian, PLCO), u ruci studije koja je analizirala probir na KP nije bilo značajne razlike u smrtnosti od KP između skupine koja je bila podvrgnuta probiru u usporedbi s onom koja nije (RR 0,93, 95% CI 0,81–1,08,  $p = 0,4$ ) (PLCO). Navedeno je posljedica naknadnog PSA testiranja kojem je bilo podvrgnuto više od 50% ispitanika iz kontrolne skupine (96). Statistički modeli korišteni su za usklađivanje razlika u provedbi i postavkama dviju najvećih studija (ERSPC i PLCO) te je ustanovljeno da oba ispitivanja dokazuju da probir smanjuje smrtnost od KP između 25% i 31% u ERSPC i 27% do 32% u PLCO (97). Također, postoje dokazi izvedeni iz velikih prospektivnih opservacijskih studija

koje su pokazale korisnost određivanja osnovne vrijednosti PSA u srednjovječnih muškaraca kao prediktora rizika za nastanak agresivnog KP u budućnosti (98). Poznato je da je uvođenje probira na KP koristeći PSA dovelo do povećanja broja dijagnosticiranih indolentnih karcinoma. Ono što je manje poznato je da najveći udio muškaraca kojima je dijagnosticiran indolentni KP u starijoj dobnoj skupini (preko 50% ih je starije od 70 godina) (99). Optimalan raspon dobi za probir na KP prema ERSPC studiji je između 50 i 70 godina starosti. Kako bi se smanjio udio onih kojima bi biopsijom bio dokazan indolentan KP, u kliničku praksu su uvedeni i drugi testovi poput indeksa zdravlja prostate (engl. Prostate Health Index (PHI)), 4K zbroja, PC3 te druge metode kao što je multiparametrijska magnetska rezonanca prostate. Nažalost navedeni testovi uz svoju visoku cijenu koja je limitirajući faktor, nisu široko dostupni, pogotovo u zemljama u razvoju. Usprkos preporukama o optimalnom vremenu probira, upotrebi dodatnih testova s kojima se nastoji prepoznati muškarce sa agresivnom formom karcinoma, i dalje se dijagnosticira veliki broj onih sa indolentnim KP. U tijeku je potraga za cijenovno prihvatljivim i široko dostupnim tumorskim markerom koji bi sa visokim stupnjem osjetljivosti i specifičnosti predviđao rizik od agresivne forme KP.

Iako je kemokin CXCL13 od svog prvog opisa najviše povezan s multiplom sklerozom (MS), nije za nju specifičan jer i pacijenti sa virusnim ili bakterijskim infekcijama imaju čak i više koncentracije ovog kemokina. Njegova povišena koncentracija opisana je i u različitim malignim (tumor dojke, NK/T-stanični limfom, karcinom kolona, karcinom pluća ne-malih stanica, limfomi CNS-a), ali i autoimunim te kroničnim upalnim bolestima (69)(71)(73)(77)(79)(100-104). Kemokini i njihovi receptori su ključne molekule koje posreduju u kemotaktičnoj migraciji leukocita. Postoje dokazi da abnormalna ekspresija kemotaktičnih faktora u zloćudnim bolestima možda pridonosi progresiji tumora, no također može potaknuti limfocitnu infiltraciju tumorskih tkiva te poticati specifični antitumorski imuni odgovor. Predklinički modeli su pokazali da B limfociti igraju značajnu ulogu u nastanku kastracijski rezistentnog KP. Androgena ablacija u mišjem modelu dovodi do apoptoze gotovo svih stanica KP što posljedično dovodi do oštećenja stromalnih stanica u tumorskom mikrookolišu. Navedeno oštećenje stromalnih stanica uzrokuje produkciju kemokina CXCL13 i posljedičnu kemotaktičnu infiltraciju tumora sa B limfocitima što u konačnici uzrokuje nastanak kastracijski rezistentnog KP. U njegovu nastanku važnu ulogu imaju B limfociti u tumorskom mikrookolišu koji proizvode limfotoksin (heterotrimerički citokin koji pripada TNF porodici), što dovodi do aktivacije I $\kappa$ B kinaze (enzimatskog kompleksa koji je uključen u propagaciju staničnog odgovora na upalu) te transduktora signala i aktivatora transkripcije 3 (engl. signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)) koji promoviraju

preživljavanje i proliferaciju stanica KP (103). U zadnjih 15 godina, publicirano je više studija koje su proučavale ulogu CXCL13/CXCR5 osovine u karcinogenezi i napredovanju malignih bolesti. Del Grosso i sur. su dokazali ulogu osovine CXCL13/CXCR5 u komunikaciji između stromalnih stanica i malignih stanica u neuroblastomu koja pridonosi daljnjoj malignoj alteraciji i propagaciji bolesti (105). Meijer i sur. su dokazali prisutnost CXCR 5 receptora u malignim stanicama karcinoma kolona kao i njegovu ulogu u procesu metastaziranja u jetru(106). Studija Singh i sur. je pokazala kako su kemokini i kemokinski receptori uključeni u metastatski proces kod KP. Ekspresija CXCR5 je bila značajno viša ( $p < 0.001$ ) u KP u usporedbi s tkivom prostate zdravih kontrola. CXCR5 je također pozitivno korelirao sa GZ. Tkiva KP sa  $GZ \geq 7$  su izražavala predominantno nuklearni CXCR5, dok su uzorci KP sa  $GZ \leq 6$  izražavali membransku i citoplazmatsku ekspresiju navedenog kemokinskog receptora i bili po tome usporedivi s BHP(83). I u drugim su studijama ovi autori ukazali kako stanične linije KP ekspimiraju CXCR5. Ukazali su također u prvoj (i do sada jedinoj) studiji na kliničkom uzorku na povišenu koncentraciju CXCL13 (i IL-6) u serumu pacijenata s KP u usporedbi s pacijentima s BHP ili intraepitelnom neoplazijom visokog stupnja, kao i u odnosu na zdrave kontrole. Serumske koncentracije CXCL13 su pozitivno korelirale sa vrijednošću PSA, a serumske razine IL-6 su značajno ( $p < 0.0003$ ) korelirale sa serumskim CXCL13. CXCL13 se pokazao čak kao bolji prediktor KP od PSA. Ova je studija također pokazala kako je CXCL13 (produciran od strane stanica endotela koštane srži) sposoban inducirati invaziju stanica KP u koštano tkivo. Sve ovo ukazuje na značajnu ulogu osovine CXCL13-CXCR5 za progresiju i nastanak metastaza u KP (84). El Haibi i sur. u svom radu u kojem su proučavali utjecaj stimulacije CXCL13 na dvije najčešće proučavane i komercijalno dostupne stanične linije KP od kojih je jedna androgen osjetljiva a druga rezistentna (LNCaP i PC3) predložili su da bi taj kemokin mogao biti medijator proliferacije stanica KP putem aktivacije c-Jun N-terminalnih kinaza (JNK) koje imaju središnju ulogu u signalnim putovima uključenim u ekspresiju gena koji reguliraju staničnu regeneraciju i programiranu staničnu smrt (apoptozu). Također su pokazali da CXCL13 može putem aktivacije vanstaničnim signalom regulirane kinaze (engl. extracellular-signal-regulated kinase (ERK)), odnosno njezine signalne kaskade, potaknuti lokalnu invaziju zloćudnih stanica KP(107). U drugoj studiji isti autori su istraživali koja kombinacija podjedinica G proteina, koji je vezan za CXCR5 receptor sudjeluje u aktivaciji kaskadnog niza signalnih molekula koje posreduju između stanične membrane i jezgre u staničnim linijama KP (RWPE-1, LNCaP, C4-2B i PC3), je specifična za androgen osjetljive kao i za androgen rezistentne stanice. U navedenom istraživanju su došli do otkrića da je specifična kombinacija komponenti G proteina prisutna u androgen osjetljivim stanicama KP

(Gαq/11/Gβ3/Gγ9) kao i u onim koje su androgen rezistentne (Gαi2/Gβ3/Gγ9). U zaključku je navedeno kako bi blokada osovine CXCL13/CXCR5 te specifičnih kombinacija trimeričkog G proteina povezanog sa navedenim receptorom mogla biti osnova za razvoj terapije u liječenju metastatskog KP (108). U studiji Yang i sur. je utvrđena niska ekspresija receptora CXCR1, CXCR3 u CXCR5 u staničnim kulturama zdravih ispitanika, niska ili umjerena u onih sa BHP i visoka kod ispitanika sa dokazanim KP, dok je proliferacija i rast stanica KP bio inhibiran nakon blokade CXCR5 (109)(110). U našem istraživanju, koje je uključivalo pacijente upućene na biopsiju prostate na temelju DRP-a i/ili povišenih razina PSA, mjerili smo serumsku koncentraciju CXCL13 kako bismo ustanovili možemo li razlučiti one ispitanike koji imaju veći rizik od KP. S obzirom na dob ispitanika u obje skupine nije nađena statistički značajna razlika (tablica 1). DRP u našoj studiji se nije pokazao kao dijagnostički značajan (tablice 1 i 9) što podupire i nedavna meta analiza koju su proveli Naji i sur. koji su u zbirnoj analizi 7 studija zaključili da je DRP učinjen od strane liječnika primarne medicine imao slabe rezultate u smislu uspjeha za probir na KP. Osjetljivost DRP-a koju su izvodili liječnici primarne medicine bila je 0.51 (95% CI, 0.36-0.67; I<sup>2</sup> = 98.4%), a specifičnost 0.59 (95% CI, 0.41-0.76; I<sup>2</sup> = 99.4%) (111). Činjenicu da su ispitanici s urednim nalazom biopsije prostate značajno češće koristili alfa-blokatore i inhibitore 5 alfa-reduktaze u odnosu na bolesnike s dokazanim KP (Tablica 4), se može objasniti time da je navedena terapija indicirana kod muškaraca s BHP u sklopu liječenja opstruktivno-iritativnih tegoba mokrenja. Veći volumen prostate smanjuje vjerojatnost da će se sa standardiziranom biopsijom od ukupno 12 cilindara otkriti KP, pogotovo ako je volumen tumora u prostati malen (112). Od ukupnog broja ispitanika u obje skupine samo manji dio je imao nalaz f/t PSA (17 u grupi sa negativnom biopsijom te 13 u grupi sa pozitivnom biopsijom (tablica 6)). Izostanak statistički značajne razlike u omjeru slobodnog u odnosu na vezani PSA između dvije grupe je posljedica malog uzorka. Vrijednost serumske koncentracije kemokina CXCL13 u odnosu na nalaz biopsije prostate između dviju grupa također nije pokazao statistički značajnu razliku (tablica 6). Naša studija je pokazala da u obje skupine ispitanika koncentracija kemokina CXCL13 raste sa dobi što se može objasniti većom učestalošću degenerativnih promjena u organizmu kod starijih ispitanika koje su praćene kroničnim upalnim procesima koje mogu povisiti njegovu razinu u serumu (tablica 10). U obje skupine ispitanika serumska koncentracija PSA korelira sa volumenom prostate što je potvrđeno u više velikih prospektivnih studija (113)(114). Serumske koncentracije PSA u skupini ispitanika kojima je dokazan KP su u negativnoj korelaciji sa f/t PSA(115). Učinjenom univarijantnom i multivarijantnom regresijskom analizom ocijenjen je utjecaj serumske koncentracije kemokina CXCL13 i PSA te rezultat DRP kao prediktora na vjerojatnost

pozitivnog nalaza biopsije (zavisna varijabla), i uočeno je da PSA ima, a CXCL13 i DRP nemaju utjecaj na vjerojatnost dijagnoze KP (Tablice 11 i 12). Pozitivna korelacija između serumske koncentracije PSA i vjerojatnosti postojanja KP je osnova za primjenu ovog markera u probiru na KP zadnjih 30 godina što je dovelo do smanjenja udjela bolesnika sa uznapredovalim stadijem bolesti u ukupnom broju novodijagnosticiranih, ali isto tako i do povećanja udjela onih sa biološki indolentnim karcinomom (116)(117). Metodom ROC-krivulje procijenjena je uloga PSA i CXCL13 između dvije skupine ispitanika s obzirom na nalaz biopsija u kojima je otkriven KP. Jedino se PSA mogao prikazati kao dijagnostički pokazatelj pozitivnog nalaza biopsije (senzitivnost = 61.6, specifičnost = 58,7,  $p = 0.02$ ), s graničnom vrijednosti  $> 7.35$  ug/L (tablica 13). Distribucija GZ u biopstatima prostate u grupi muškaraca kojima je dokazan KP je pokazala da je najzastupljeniji GZ 6 (3+3=6), dok je drugi po zastupljenosti bio GZ 7 (3+4=7 i 4+3=7). Prema ISUP klasifikaciji najviše ispitanika (njih 45.3%) je bilo u skupini gradusa 1, 20.9 % ih je u skupini gradusa 2 (3 + 4), po 12 (14 %) ispitanika je bilo u skupini gradusa 3 (4 + 3) ili 4 (8), dok u skupini gradusa 5 (GZ 9 do 10) je bilo 5 (5.8 %) ispitanika (Tablica 17). S obzirom na rezultat DRP-a u skupini ispitanika kojima je biopsijom dokazan KP, kod onih sa suspektnim DRP-om značajno je viši GZ te su značajno više vrijednosti kemokina CXCL13 u odnosu na ispitanike s nesuspektnim DRP-om. Više studija je pokazalo da je udio histološki agresivnih tumora ( $GZ \geq 7$ ) te onih koji su ISUP stadija  $\geq 3$ , veći kod bolesnika kojima je KP dokazan na osnovu suspektnog DRP-a u odnosu na one ispitanike kojima je biopsija rađena na osnovu povišenog PSA. Gosselaar i sur. su pokazali da je u skupini ispitanika sa vrijednostima PSA između 2 i 4 ug/L, kojima je na osnovu suspektnog DRP-a biopsijom dokazan KP udio onih sa  $GZ \geq 7$  46.9% u odnosu na ispitanike kojima je biopsija učinjena samo na osnovu PSA (vrijednost između 2 i 3.9 ug/L) gdje je pak udio KP sa  $GZ \geq 7$  tek 15.0% u ukupnom broju dijagnosticiranih bolesnika (117). Onisuru i sur. su pokazali da među ispitanicima kojima je biopsijom dokazan KP nakon indikacije za biopsiju samo na osnovu suspektnog DRP-a u 20% slučajeva je utvrđen  $GZ \geq 7$  te da je u 20% slučajeva na patohistološkom preparatu nakon radikalne prostatektomije nađeno ekstraprostatično širenje bolesti(118). Povezanost između suspektnog nalaza DRP-a, agresivne histološke slike KP te povišenih vrijednosti CXCL13 ukazuje da bi se navedeni kemokin mogao upotrijebiti u svrhu probira KP višeg GZ u nižem stadiju kada je bolest još ograničena na prostatu te samim time ima veće izgleda za izlječenjem. No, rezultat usporedbe serumskih koncentracija kemokina CXCL13 u grupi ispitanika kojima je biopsijom dokazan KP i koji su podijeljeni u skupine prema ISUP klasifikaciji, gdje se nije pokazala povezanost koncentracije CXCL13 i histološke slike KP je u suprotnosti sa ranijim zaključkom o eventualnoj koristi navedenog kemokina u

probiru bolesnika sa klinički značajnim KP. Vrijednost PSA sa druge strane, dobro korelira sa GZ odnosno sa višim ISUP gradusom. Koeficijentom korelacije (Kendall  $\tau$ ) ocijenili smo povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13 i PSA kod ispitanika kojima je biopsijom dokazan KP i uočili da CXCL13 nije značajno povezan s GZ niti s ISUP gradusom. Kod viših vrijednosti PSA prisutne su i više vrijednosti GZ a samim time ispitanici spadaju u viši gradus prema ISUP klasifikaciji (tablica 19). Regresijskom analizom (logistička regresija) ocijenjen je utjecaj serumske koncentracije kemokina CXCL13 i PSA te nalaz DRP-a na vjerojatnost da će ispitanici kojima je biopsijom dokazan KP spadati u skupinu višeg rizika (ISUP klasifikacija  $\geq 2$ ) i uočeno je da PSA ima utjecaj na vjerojatnost većeg rizika (Tablica 20) dok za DRP i CXCL13 nije utvrđena pozitivna korelacija. Palsdottir i sur. su u svojoj studiji, provedenoj na 6083 muškarca između 50 i 69 godina starosti kojima je učinjena biopsija prostate radi povišenih vrijednosti PSA, dokazali da niti PSA niti dob nisu prediktivni za KP koji je ISUP gradusa 1 što je u suprotnosti sa prediktivnom vrijednošću PSA za KP ISUP gradusa  $\geq 2$  (119). Primjenom multivarijantne logističke regresije učinjena je analiza vjerojatnosti pozitivnog nalaza biopsije kada se u obzir uzmu CXCL13, PSA i nalaz DRP-a. Jedini značajan prediktor je PSA (omjer vjerojatnosti 1.54) (Tablica 21). Prema modificiranom Gleasonovom sustavu histološke gradacije iz 2005. godine, histološki gradus 3 ima dobro razvijene i ograničene žlijezde te luminalnu diferencijaciju uz zadržan polaritet tumorskih stanica koje proizvode PSA. U Gleasonovom gradusu 4 postoji samo djelomična diferencijacija žlijezda s ponekim gubitkom staničnog polariteta. Tumorske stanice ne uspijevaju formirati potpune žlijezde i agregiraju se u loše formirane, poremećene agregate, spojene žlijezde i kribriiformne uzorke koji su slabije razgraničeni od strome (120). To sugerira da stanice s Gleasonovim gradusom 4 propuštaju PSA kroz poremećenu staničnu membranu dok stanice s Gleasonovim gradusom 3 ne, ili barem ne u istoj mjeri. Stoga je povezanost između PSA i KP ISUP gradusa 1 različita od povezanosti između PSA i KP ISUP gradusa  $\geq 2$ . Također je utvrđeno da ne postoji donja granica serumske vrijednosti PSA koja bi sa visokom specifičnošću i osjetljivošću razlikovala biološki agresivan KP od onog koji je indolentan (121). Dobro je poznato da PSA pozitivno korelira s Gleasonovim gradusom 4 i višim ISUP gradusom kao i dugoročnim rizikom od smrti od raka prostate (122).

Kao treći specifični cilj ovog istraživanja postavljeno je utvrđivanje uloge serumske koncentracije CXCL13 i/ili multimarkerskog pristupa (kombinacija CXCL13 i PSA) u predviđanju agresivnije forme KP. Dobiveni rezultati su pokazali da PSA možemo prikazati kao pokazatelj većeg rizika za agresivniju formu KP u skupini ispitanika kod kojih je bolest dokazana biopsijom (senzitivnost = 65.45, specifičnost = 100,  $P < 0.001$ ), s graničnom

vrijednosti  $> 9.9$  ug/L za razliku od CXCL13 (senzitivnost 47.06 i specifičnost 77.42, P 0.51) (tablica 21). Relativna ograničenost ove studije je što su sve biopsije učinjene po principu uzimanja standardiziranih 12 cilindara iz PZ, šest iz lijevog te šest iz desnog lobusa što je do nedavno bila rutina u našoj ustanovi. Uvođenje mpMR i naknadnih ciljanih biopsija prostate uz standardnih dvanaest uzoraka, koja je kod selektiranih pacijenata uvedena kao algoritam dijagnostičke obrade na Klinici za urologiju KBC Zagreb nakon što je naša studija završila, je dovelo do višeg postotka pozitivnih biopsija. Drugi nedostatak ove studije je izostanak treće kohorte mladih i zdravih ispitanika, no s obzirom na invazivnost dijagnostike KP koja uključuje biopsiju prostate što sa sobom nosi i određene rizike, takva studija nebi bila etički prihvatljiva.

## 7. ZAKLJUČCI

- Serumski određen CXCL13 kod muškaraca kod kojih se vrši probir na KP ne pruža dodatnu dijagnostičku vrijednost.
- Serumska koncentracija CXCL13 u skupini ispitanika kod kojih je biopsijom dokazan KP nije statistički značajno viša od kontrolne skupine kojima biopsijom nije dokazan KP.
- Serumska koncentracija kemokina CXCL13 u skupini ispitanika kojima je biopsijom dokazan KP nije viša kod onih sa agresivnijom formom bolesti (viši GS i ISUP gradus) te se ne može koristiti kao alat u probiru muškaraca na klinički značajan KP u svrhu smanjenja udjela onih kojima se dokaže indolentna varijanta bolesti.
- Serumska koncentracija CXCL13 kao niti multimarkerski pristup (kombinacija CXCL13 i PSA) nisu bolji prediktori agresivnije forme KP u odnosu na PSA.
- Granična vrijednost serumske koncentracije CXCL13 nema dovoljnu specifičnost niti osjetljivost da bi bila dobar prediktor za KP.



## 8. SAŽETAK

Cilj našeg istraživanja je bio utvrditi visinu serumske koncentracije kemokina CXCL13 i njenu dijagnostičku vrijednost u bolesnika s KP. U istraživanje su bili uključeni muškarci kojima je vodeći urolog na osnovu povišenih vrijednosti PSA i/ili sumnjivog nalaza DRP indicirao biopsiju prostate. Istraživanje je osmišljeno kao prospektivna opservacijska studija, ukupno je uključen 161 ispitanik. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine, oni kojima je biopsijom dokazan KP (86 ispitanika) te oni kojima u bioptatu prostate nije dokazan karcinom (75 ispitanika). Kriterij za isključenje iz studije su bili akutna infektivna bolest, autoimuna bolest te drugi malignom. Sve biopsije su učinjene koristeći transrektalnu ultrazvučnu sondu nakon primjene lokalnog anestetika što je u vrijeme provođenja studije bio zlatni standard. Od svih ispitanika je venepunkcijom na dan biopsije prostate uzeto 5 ml seruma radi dokaza kemokina. Navedeni uzorci su spremljeni na  $-20^{\circ}\text{C}$  tijekom predviđenog vremena trajanja studije. Biopati prostatičnog tkiva su pohranjeni u formalin te poslani u Zavod za patologiju Kliničkog Bolničkog Centra Zagreb radi patohistološke analize. Za određivanje koncentracije serumskog PSA korišten je Alinity i® test (Abbott Laboratories, IL, USA) dok je serumski CXCL13 određivan pomoću standardiziranih kvantitativnih enzimskih imunotestovia Quantikine Human CXCL10/IP-10 ELISA test, Quantikine Human CXCL11/I-TAC ELISA test i Quantikine Human CXCL13/ BLC/BCA-1 ELISA test (R&D Systems, Minneapolis, SAD).

Naša studija je potvrdila od ranije poznatu činjenicu da su serumske vrijednosti PSA kod ispitanika sa dokazanim KP više u odnosu na one kojima biopsijom nije dokazana maligna bolest prostate. Za razliku od drugih studija koje su pokazale da je CXCL13 značajno povišen u serumu pacijenata s KP, da pozitivno korelira sa serumskim PSA te da je čak i bolji prediktor agresivnije forme KP od PSA, naša studija nije uspjela potvrditi moguću korisnost serumskih razina CXCL13 za selekciju pacijenata za biopsiju prostate. Moguće je da bi studija na većem broju ispitanika koji bi uključivala i veći raspon kliničkih stadija, odnosno patohistoloških nalaza s obzirom na GZ, potvrdila ulogu kemokina CXCL13, zbog toga su potrebna daljnja istraživanja kemokina CXCL13 kod bolesnika s KP. Zbog nedovoljne osjetljivosti i specifičnosti PSA kao dosadašnjeg „zlatnog standarda“ u dijagnostici KP potrebne su nove molekule, odnosno novi biomarkeri koji bi bolje usmjeravali dijagnostiku, obradu i liječenje bolesnika s KP.

## 9. SUMMARY

Diagnostic value of serum chemokine CXCL13 concentration in patients with prostate cancer

Marjan Marić, 2022.

The aim of our study was to determine the level of serum chemokine CXCL13 concentration and its diagnostic value in patients with PCa. The study included men who had a prostate biopsy based on elevated PSA and/or a suspicious DRE finding. The study was designed as a prospective observational study, with a total of 161 subjects included. Subjects were divided into two groups, those whose biopsy showed PCa (86 subjects) and those whose prostate biopsy did not show cancer (75 subjects). Criteria for exclusion from the studies were acute infectious disease, autoimmune disease and other malignancies. All biopsies were performed using a transrectal ultrasound probe after administration of a local anesthetic which was the gold standard at the time of the study. Of all subjects, 5 ml of serum was taken by venipuncture on the day of prostate biopsy for chemokine measurement. Alinity i® test (Abbott Laboratories, IL, USA) was used to determine serum PSA concentrations, while serum CXCL13 was determined using standardized quantitative enzyme immunoassays Quantikine Human CXCL10 / IP-10 ELISA test, Quantikine Human CXCL11 / Id CACn test BLC / BCA-1 ELISA test (R&D Systems, Minneapolis, USA). Our study confirmed the previously known fact that the serum PSA values in subjects with proven PCa are higher than those in whom biopsy did not prove malignant prostate disease. Unlike other studies that showed that CXCL13 was significantly increased in the serum of patients with PCa, positively correlated with serum PSA, and that it was an even better predictor of more aggressive forms of PCa than PSA, our study failed to confirm the potential utility of serum CXCL13 levels for selection of patients for prostate biopsy. It is possible that a study with a larger number of subjects, which would include a wider range of clinical stages, ie pathohistological findings with respect to GS, would confirm the role of chemokine CXCL13, therefore further research on chemokine CXCL13 in patients with PCa is needed. Due to the insufficient sensitivity and specificity of PSA as the current "gold standard" in the diagnosis of PCa, new molecules are needed, ie new biomarkers that would better guide the diagnosis and treatment of patients with KP.

## 10. LITERATURA

1. Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: Role of protein kinases. *Asian J Androl*. 2012;14(6):816–21.
2. de Lamirande E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost*. 2007;33(1):60-8.
3. Sikaris K. Prostate specific antigen. *Aust Prescr*. 2011;34(6):186–8.
4. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology*. 2003;62(6 SUPPL. 1):3–12.
5. Fenton JJ, Weyrich MS, Durbin S, Liu Y, Bang H, Melnikow J. Prostate-specific antigen-based screening for prostate cancer evidence report and systematic review for the us preventive services task force. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2018;319(18):1914–31.
6. Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40(3):565–75.
7. Ittmann M. Anatomy and histology of the human and murine prostate. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(5).
8. Hayward SW, Cunha GR. The prostate: Development and physiology. *Radiol Clin North Am*. 2000;38(1):1–14.
9. Butler W, Huang J. Neuroendocrine cells of the prostate: Histology, biological functions, and molecular mechanisms. *Precis Clin Med*. 2021;4(1):25–34.
10. Risbridger GP, Taylor RA. Physiology of the male accessory sex structures: The prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. Third Edit. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Elsevier Inc.; 2006. 1149–1172 p.
11. Gilany K, Minai-tehrani A, Savadi-shiraz E, Rezadoost H, Lakpour N. Exploring the Human Seminal Plasma Proteome: An Unexplored Gold Mine of Biomarker for Male Infertility and Male Reproduction Disorder. 2015;16(2):61–71.
12. Ramio L, Medrano A, Ferna JMA. Utilization of Citrate and Lactate Through a Lactate Dehydrogenase and ATP-Regulated Pathway in Boar Spermatozoa. 2006;378(September 2005):369–78.
13. Franklin RB, Milon B, Feng P, Costello LC. Zinc and zinc transporters in normal prostate and the pathogenesis of prostate cancer. *Front Biosci*. 2005;10:2230-9.
14. Anamthathmakula P, Winuthayanon W. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception†. *Biol Reprod*. 2020;103(2):411-426.
15. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: Structure,

- function, and association to disease. *Endocr Rev.* 2001;22(2):184–204.
16. Young CYF, Andrews PE, Montgomery BT, Tindall DJ. Tissue-Specific and Hormonal Regulation of Human Prostate-Specific Glandular Kallikrein. *Biochemistry.* 1992;31(3):818–24.
  17. Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest.* 1987;80(2):281–5.
  18. Wang MC, Papsidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Prostate antigen: A new potential marker for prostatic cancer. *Prostate.* 1981;2(1):89–96.
  19. Christensson A, Lilja H. Complex formation between protein C inhibitor and prostate-specific antigen in vitro and in human semen. *Eur J Biochem.* 1994;220(1):45–53.
  20. Lilja H, Cockett ATK, Abrahamsson P-A. Prostate specific antigen predominantly forms a complex with alpha1-antichymotrypsin in blood. Implications for procedures to measure prostate specific antigen in serum. *Cancer.* 1992;70(1 S):230–4.
  21. Filella X, Alcover J, Molina R, Rodríguez A, Carretero P, Ballesta AM. Free and total PSA in the diagnosis of prostate cancer. *Tumour Biol.* 1997;18(6):332–40.
  22. Abrahamsson PA, Kuriyama M. Molecular forms of serum prostate-specific antigen: The clinical usefulness of percent free psa to discriminate prostate cancer from BPH. *Acta Urol Jpn.* 1998;44(4):223–32.
  23. Roehrborn CG, Gregory A, McConnell JD, Sagalowsky AI, Wians FH. Comparison of three assays for total serum prostate-specific antigen and percentage of free prostate-specific antigen in predicting prostate histology. *Urology.* 1996;48(6 SUPPL.):23–32.
  24. Lim K Bin. Epidemiology of clinical benign prostatic hyperplasia. *Asian J Urol.* 2017;4(3):148–51.
  25. Skinder D, Zacharia I, Studin J, Covino J. Benign prostatic hyperplasia: A clinical review. *J Am Acad Physician Assist.* 2016;29(8):19–23.
  26. DiBello JR, Ioannou C, Rees J, Challacombe B, Maskell J, Choudhury N, i sur. Prevalence of metabolic syndrome and its components among men with and without clinical benign prostatic hyperplasia: a large, cross-sectional, UK epidemiological study. *BJU Int.* 2016;117(5):801-8.
  27. Aaron LT, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 2016;43(3):279–88.
  28. Madersbacher S, Sampson N, Culig Z. Pathophysiology of Benign Prostatic Hyperplasia and Benign Prostatic Enlargement: A Mini-Review. *Gerontology.* 2019;65(5):458–64.

29. Timms BG, Hofkamp LE. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*. 2011;82(4–5):173–83.
30. Marberger M, Roehrborn CG, Marks LS, Wilson T, Rittmaster RS. Relationship among serum testosterone, sexual function, and response to treatment in men receiving dutasteride for benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1323–8.
31. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 2019;10(2):63-89.
32. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: International comparisons. *BJU Int*. 2002;90(2):162–73.
33. Panigrahi GK, Praharaj PP, Kittaka H, Mridha AR, Black OM, Singh R, i sur. Exosome proteomic analyses identify inflammatory phenotype and novel biomarkers in African American prostate cancer patients. *Cancer Med*. 2019;8(3):1110-1123.
34. SEER Cancer Stat Facts. [cited 2021 Dec 6]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/>
35. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int*. 2002;90(2):162–73.
36. JRC Publications Repository - Epidemiology of prostate cancer in Europe. [cited 2021 Dec 6]. Available from: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC101382>
37. Kheirandish P, Chingwundoh F. Ethnic differences in prostate cancer. *Br J Cancer* 2011 1054;105(4):481–5.
38. Chu LW, Ritchey J, Devesa SS, Quraishi SM, Zhang H, Hsing AW. Prostate Cancer Incidence Rates in Africa. *Prostate Cancer*. 2011;2011:1–6.
39. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
40. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 2018;00(00):1–31.
41. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, i sur. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-1953.
42. Grossman DC, Curry SJ, Owens DK, Bibbins-Domingo K, Caughey AB, Davidson KW, i sur. Screening for Prostate Cancer: US Preventive Services Task Force

- Recommendation Statement. *JAMA*. 2018 May 8;319(18):1901-1913.
43. Negoita S, Feuer EJ, Mariotto A, Cronin KA, Petkov VI, Hussey SK, *i sur*. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part II: Recent changes in prostate cancer trends and disease characteristics. *Cancer*. 2018;124(13):2801-2814.
  44. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, *i sur*; EUROCARE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):23-34.
  45. Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK. Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Oncologist*. 2003;8(6):541-52.
  46. Grivennikov SI, Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(1):65-71.
  47. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol*. 2012;2:98.
  48. Chai EZP, Siveen KS, Shanmugam MK, Arfuso F, Sethi G. Analysis of the intricate relationship between chronic inflammation and cancer. *Biochem J*. 2015;468(1):1-15.
  49. Caruso C, Balistreri CR, Candore G, Carruba G, Colonna-Romano G, Di Bona D, *i sur*. Polymorphisms of pro-inflammatory genes and prostate cancer risk: a pharmacogenomic approach. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(12):1919-33.
  50. Gronberg H, Damber L, Damber JE, Walsh PC, Gann PH. Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol*. 1994;152:1484-7.
  51. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, *i sur*. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000;343(2):78-85.
  52. Eeles R, Goh C, Castro E, Bancroft E, Guy M, Al Olama AA, *i sur*. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol*. 2014;11(1):18-31.
  53. Zheng SL, Sun J, Wiklund F, Smith S, Stattin P, Li G, *i sur*. Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(9):910-9.
  54. Sundararajan S, Ahmed A, Goodman OBJ. The relevance of BRCA genetics to prostate cancer pathogenesis and treatment. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2011;9(10):748-55.
  55. Gleason DF, Mellinger GT, Ardring LJ. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*.

- 1974;111(1):58–64.
56. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(2):244–52.
  57. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol*. 2016;69(3):428-35.
  58. Chant J, Lai A, Illing M, Daniel F. Citokini i kemokini. *Imunologija*. 2004;(95):409.
  59. Citokini i kemokini - CROSBI. [cited 2021 Dec 14]. Available from: <https://www.bib.irb.hr/166155>
  60. Ljøstad U, Mygland Å. CSF B-lymphocyte chemoattractant (CXCL13) in the early diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol*. 2008;255(5):732–7.
  61. De Haas AH, Van Weering HRJ, De Jong EK, Boddeke HWGM, Biber KPH. Neuronal chemokines: Versatile messengers in central nervous system cell interaction. *Mol Neurobiol*. 2007;36(2):137–51.
  62. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(1):129–35.
  63. Müller M, Carter S, Hofer MJ, Campbell IL. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity - A tale of conflict and conundrum. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2010;36(5):368–87.
  64. Locati M, Bonecchi R, Corsi MM. Chemokines and their receptors: roles in specific clinical conditions and measurement in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol*. 2005 Jun;123 Suppl(Suppl 1):S82-95.
  65. Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol*. 2008;9(9):949–52.
  66. Proudfoot AEI. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):106–15.
  67. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(12):907–18.
  68. Citokini i kemokini - CROSBI [Internet]. [cited 2021 Dec 16]. Available from: <https://www.bib.irb.hr/166155>
  69. Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14(2):540–

- 51.
70. Kakinuma T. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol.* 2006;79(4):639–51.
  71. Payne AS, Cornelius LA. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol.* 2002;118(6):915–22.
  72. Kulbe H, Hagemann T, Szlosarek PW, Balkwill FR, Wilson JL. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(22):10355–62.
  73. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of Interleukin 8 Correlates with the Metastatic Potential of Human Melanoma Cells in Nude Mice. *Cancer Res.* 1994;54(12).
  74. Varney ML, Li A, Dave BJ, Bucana CD, Johansson SL, Singh RK. Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different metastatic potential and their role in interleukin-8 (CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(8):723–31.
  75. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(7):540–50.
  76. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(3):171–9.
  77. Singh R, Lillard JW Jr, Singh S. Chemokines: key players in cancer progression and metastasis. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011;3(1):1569.
  78. Mantovani A, Allavena P, Sozzani S, Vecchi A, Locati M, Sica A. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(3):155–60.
  79. Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J cancer.* 2003; 105(2):186–9.
  80. Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(3):195–200.
  80. Homey B, Müller A, Zlotnik A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):175–84.
  82. Mantovani A, Wang Ji Ming, Balotta C, Abdeljalil B, Bottazzi B. Origin and regulation of tumor-associated macrophages: the role of tumor-derived chemotactic factor. *Biochim Biophys Acta.* 1986;865(1):59–67.
  83. Singh S, Singh R, Singh UP, i sur. Clinical and biological significance of CXCR5 expressed by prostate cancer specimens and cell lines. *Int J cancer.* 2009;125(10):2288–



- 95.
84. Singh S, Singh R, Sharma PK, Singh UP, Rai SN, Chung LW, i sur. Serum CXCL13 positively correlates with prostatic disease, prostate-specific antigen and mediates prostate cancer cell invasion, integrin clustering and cell adhesion. *Cancer Lett.* 2009;283(1):29-35.
85. Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JW. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Lab Invest.* 2004;84(12):1666–76.
86. Koo KM, Wee EJH, Mainwaring PN, Trau M. A simple, rapid, low-cost technique for naked-eye detection of urine-isolated TMPRSS2:ERG gene fusion RNA. *Sci Rep.* 2016;6.
87. Richardsen E, Ness N, Melbø-Jørgensen C, Johannesen C, Grindstad T, Nordbakken C, i sur. The prognostic significance of CXCL16 and its receptor C-X-C chemokine receptor 6 in prostate cancer. *Am J Pathol.* 2015;185(10):2722-30.
88. Singh S, Singh UP, Stiles JK, Grizzle WE, Lillard JW. Expression and functional role of CCR9 in prostate cancer cell migration and invasion. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8743–50.
89. Tsaor I, Noack A, Makarevic J, Oppermann E, Waaga-Gasser AM, Gasser M, i sur. CCL2 Chemokine as a Potential Biomarker for Prostate Cancer: A Pilot Study. *Cancer Res Treat.* 2015 Apr;47(2):306-12.
90. Izumi K, Mizokami A, Lin HP, Ho HM, Iwamoto H, Maolake A, i sur. Serum chemokine (CC motif) ligand 2 level as a diagnostic, predictive, and prognostic biomarker for prostate cancer. *Oncotarget.* 2016;7(7):8389-98.
91. Wedel SA, Raditchev IN, Jones J, Juengel E, Engl T, Jonas D, i sur. CXC chemokine mRNA expression as a potential diagnostic tool in prostate cancer. *Mol Med Rep.* 2008;1(2):257-62.
92. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate. *N Engl J Med.* 1987;317(15):909–16.
93. Loeb S, Bjurlin MA, Nicholson J, Tammela TL, Penson DF, Carter HB, i sur. Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. *Eur Urol.* 2014;65(6):1046-55.
94. Hugosson J, Roobol MJ, Månsson M, Tammela TLJ, Zappa M, Nelen V, i sur; ERSPC investigators. A 16-yr Follow-up of the European Randomized study of Screening for Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2019;76(1):43-51.

95. Hugosson J, Godtman RA, Carlsson SV, Aus G, Grenabo Bergdahl A, Lodding P, i sur. Eighteen-year follow-up of the Göteborg Randomized Population-based Prostate Cancer Screening Trial: effect of sociodemographic variables on participation, prostate cancer incidence and mortality. *Scand J Urol*. 2018;52(1):27-37.
96. Shoag JE, Mittal S, Hu JC. Reevaluating PSA Testing Rates in the PLCO Trial. Vol. 374, *The New England journal of medicine*. United States; 2016. p. 1795–6.
97. Tsodikov A, Gulati R, Heijnsdijk EAM, Pinsky PF, Moss SM, Qiu S, i sur. Reconciling the Effects of Screening on Prostate Cancer Mortality in the ERSPC and PLCO Trials. *Ann Intern Med*. 2017;167(7):449-455.
98. Kovac E, Carlsson SV, Lilja H, Hugosson J, Kattan MW, Holmberg E, i sur. Association of Baseline Prostate-Specific Antigen Level With Long-term Diagnosis of Clinically Significant Prostate Cancer Among Patients Aged 55 to 60 Years: A Secondary Analysis of a Cohort in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *JAMA Netw Open*. 2020;3(1):e1919284.
99. Vickers AJ, Sjoberg DD, Ulmert D, Vertosick E, Roobol MJ, Thompson I, i sur. Empirical estimates of prostate cancer overdiagnosis by age and prostate-specific antigen. *BMC Med*. 2014;12:26.
100. Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KE, Machtens S, Mengel M, i sur. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer*. 2002;86(8):1250-6.
101. Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, Geboers K, Van Marck E, Scharpé S, i sur. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*. 2004;10(21):7157-62.
102. Martínez-Pérez C, Kay C, Meehan J, Gray M, Dixon JM, Turnbull AK. The IL6-like Cytokine Family: Role and Biomarker Potential in Breast Cancer. *J Pers Med*. 2021;11(11).
103. Zhu D, Ye W, Jiang J. Clinical significance of CXCL13/CXCR5 axis in human cancers. *Transl Cancer Res*. 2018;7(6):1737–42.
104. Ammirante M, Shalapour S, Kang Y, Jamieson CAM, Karin M. Tissue injury and hypoxia promote malignant progression of prostate cancer by inducing CXCL13 expression in tumor myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(41):14776–81.
105. Del Grosso F, Coco S, Scaruffi P, Stigliani S, Valdora F, Benelli R, i sur. Role of CXCL13-CXCR5 crosstalk between malignant neuroblastoma cells and Schwannian

- stromal cells in neuroblastic tumors. *Mol Cancer Res.* 2011;9(7):815-23.
106. Meijer J, Zeelenberg IS, Sipos B, Roos E. The CXCR5 chemokine receptor is expressed by carcinoma cells and promotes growth of colon carcinoma in the liver. *Cancer Res.* 2006;66(19):9576–82.
  107. El-Haibi CP, Singh R, Sharma PK, Singh S, Lillard JW. CXCL13 mediates prostate cancer cell proliferation through JNK signalling and invasion through ERK activation. *Cell Prolif.* 2011;44(4):311–9.
  108. El-Haibi CP, Sharma P, Singh R, Gupta P, Taub DD, Singh S, i sur. Differential G protein subunit expression by prostate cancer cells and their interaction with CXCR5. *Mol Cancer.* 2013;12:64.
  109. Yang L, Gao L, Chen Y, Tang Z, Zhu Y, Han P, i sur. The Differential Expression and Function of the Inflammatory Chemokine Receptor CXCR5 in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. *Int J Med Sci.* 2015;12(11):853-61.
  110. Naji L, Randhawa H, Sohani Z, Dennis B, Lautenbach D, Kavanagh O, i sur. Digital Rectal Examination for Prostate Cancer Screening in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Fam Med.* 2018;16(2):149-154.
  111. Gökhan Doluoğlu Ö, Volkan Öztekin Ç, Karabakan M, Özgür Akdemir A, Çetinkaya M. Prostat iğne biyopsisinde prostat volümünün önemi. *Turk Urol Derg.* 2013;39(2):74–7.
  112. Pinsky PF, Kramer BS, Crawford ED, Grubb RL, Urban DA, Andriole GL, i sur. Prostate volume and prostate-specific antigen levels in men enrolled in a large screening trial. *Urology.* 2006;68(2):352-6.
  113. Mochtar CA, Kiemeny LA, van Riemsdijk MM, Barnett GS, Laguna MP, Debruyne FM, i sur. Prostate-specific antigen as an estimator of prostate volume in the management of patients with symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol.* 2003;44(6):695-700.
  114. Van Cangh P, Nayer P, de Vischer L, Sauvage P, Tombal B. Free To Total Prostate-Specific Between Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia (Bph) in the Diagnostic Gray. *Urology.* 1996;48(6A):67–70.
  115. Welch HG, Albertsen PC. Reconsidering Prostate Cancer Mortality — The Future of PSA Screening. *N Engl J Med.* 2020;382(16):1557–63.
  116. Ilic D, Djulbegovic M, Jung JH, Hwang EC, Zhou Q, Cleves A, i sur. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: a systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2018;362:k3519.

117. Gosselaar C, Roobol MJ, Roemeling S, van der Kwast TH, Schröder FH. Screening for prostate cancer at low PSA range: the impact of digital rectal examination on tumor incidence and tumor characteristics. *Prostate*. 2007;67(2):154-61.
118. Okotie OT, Roehl KA, Han M, Loeb S, Gashti SN, Catalona WJ. Characteristics of Prostate Cancer Detected by Digital Rectal Examination Only. *Urology*. 2007;70(6):1117-20.
119. Palsdottir T, Nordström T, Aly M, Lindberg J, Clements M, Egevad L, i sur. Are Prostate Specific-Antigen (PSA) and age associated with the risk of ISUP Grade 1 prostate cancer? Results from 72 996 individual biopsy cores in 6 083 men from the Stockholm3 study. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218280.
120. Miah S, Ahmed HU, Freeman A, Emberton M. Does true Gleason pattern 3 merit its cancer descriptor? *Nat Rev Urol*. 2016;13(9):541-8.
121. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Lucia MS, Goodman PJ, Crowley JJ, i sur. Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *JAMA*. 2005;294(1):66-70.
122. Ørsted DD, Nordestgaard BG, Jensen GB, Schnohr P, Bojesen SE. Prostate-specific antigen and long-term prediction of prostate cancer incidence and mortality in the general population. *Eur Urol*. 2012;61(5):865-74.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Mostaru (BiH) 01.12.1980. godine, a osnovnu školu i opću gimnaziju sam pohađao u Čitluku (BiH). Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu sam diplomirao u rujnu 2006. godine te stekao naslov doktora medicine. Pripravnički staž sam odradio na Klinici za psihijatriju "Vrapče", a na KBC Zagreb sam 2008. godine započeo specijalizaciju iz urologije. U sklopu specijalizacije sam pohađao i specijalistički poslijediplomski studij, a specijalistički ispit sam položio 2013. godine i postao specijalist urolog zaposlen na Zavodu za onkološku i rekonstruktivnu urologiju Klinike za urologiju KBC Zagreb. Od 2015.-2018. sam pohađao posdiplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2018. sam položio subspecijalistički ispit iz Urolitijaze čime se najviše i bavim u svom profesionalnom radu. Objavio sam devet stručnih i znanstvenih radova te sudjelovao na mnogim domaćim i međunarodnim kongresima. Oženjen sam i otac troje djece.

## **PRILOZI - POPIS TABLICA I SLIKA**

Tablica 1. Razlika u dobi bolesnika u odnosu na skupine

Tablica 2. Osnovna obilježja bolesnika u odnosu na nalaz biopsije prostate

Tablica 3. Komorbiditeti i liječenje antibioticima u odnosu na nalaz biopsije prostate

Tablica 4. Primjena alfa-blokatora i inhibitora 5 alfa-reduktaze u odnosu na nalaz biopsije prostate

Tablica 5. Vrijednosti tumorskog biljega za prostatu (PSA) u odnosu na nalaz biopsije prostate

Tablica 6. Razlika u omjeru f/t PSA i serumske koncentracije kemokina CXCL13 u odnosu na nalaz biopsije prostate

Tablica 7. Bolesnici prema riziku omjera f/t PSA u odnosu na nalaz biopsije prostate

Tablica 8. Razlike u volumenu prostate, vrijednosti PSA, omjeru f/t PSA i serumskoj koncentraciji kemokina CXCL13 u odnosu na prijašnje liječenje antibiotikom

Tablica 9. Razlike u volumenu prostate, vrijednosti tumorskog biljega za prostatu (PSA), omjeru f/t PSA i serumskoj koncentraciji kemokina CXCL13 u odnosu na rezultat digitorektalnog pregleda (DRP)

Tablica 10. Povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13, dobi bolesnika, volumena prostate, te vrijednosti PSA i f/t PSA

Tablica 11. Predviđanje vjerojatnosti pozitivnog nalaza biopsije (univarijatna regresijska analiza)

Tablica 12. Predviđanje vjerojatnosti pozitivnog nalaza biopsije (multivarijatna regresijska analiza)

Tablica 13. Parametri ROC krivulje promatranih parametara s obzirom na nalaz biopsije

Slika 1. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za PSA i CXCL13, s obzirom na pozitivan/ negativan nalaz biopsije prostate

Tablica 14. Ispitanici u odnosu na Gleasonov 1. i 2. scor

Slika 2. Raspodjela bolesnika s karcinomom prostate prema Gleasonovu zbroju

Tablica 15. Povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13, dobi bolesnika, volumena prostate, te vrijednosti PSA i omjera f/t PSA u skupini oboljelih od Ca prostate

Tablica 16. Razlike u volumenu prostate, vrijednosti tumorskog biljega za prostatu (PSA), omjeru f/t PSA i serumskoj koncentraciji kemokina CXCL13 u odnosu na rezultat digitorektalnog pregleda (DRP) u skupini oboljelih od KP

Tablica 17. Raspodjela pacijenata prema ISUP klasifikaciji

Tablica 18. Volumen prostate, vrijednost tumorskog biljega za prostatu (PSA), omjer f/t PSA i serumska koncentraciji kemokina CXCL13 u odnosu na ISUP klasifikaciju

Slika 3. Vrijednost tumorskog markera za prostatu (PSA) u odnosu na ISUP klasifikaciju (International Society for Urological Pathology) ( $p < 0,001$ )

Tablica 19. Volumen prostate, dob i serumska koncentracija kemokina CXCL13 u odnosu na skupinu bolesnika s karcinomom prostate prema riziku

Tablica 20. Povezanost serumske koncentracije kemokina CXCL13 s Gleason zbrojem i ISUP klasifikacijom kod bolesnika s potvrđenim karcinomom prostate

Tablica 21. Predviđanje vjerojatnosti većeg rizika (gradus veći od I) (univarijatna regresijska analiza)

Tablica 22. Predviđanje vjerojatnosti pozitivnog nalaza biopsije (multivarijatna regresijska analiza)

Tablica 23. Parametri ROC krivulje promatranih parametara s obzirom na veći rizik (gradus veći od I) kod oboljelih od karcinoma prostate

Slika 4. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za PSA i CXCL13, s obzirom na veći rizik (gradus veći od I) kod oboljelih od karcinoma prostate