

Metilacija nestanične DNA gena RASSF1A i PRSS21 u krvi i ejakulatu bolesnika s neseminomskim tumorima zametnih stanica testisa

Krasić, Jure

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:873523>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-27**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jure Krasić

**Metilacija nestanične DNA gena
RASSF1A i PRSS21 u krvi i ejakulatu
bolesnika s neseminomskim tumorima
zametnih stanica testisa**

DISERTACIJA



Zagreb, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jure Krasić

**Metilacija nestanične DNA gena
RASSF1A i PRSS21 u krvi i ejakulatu
bolesnika s neseminomskim tumorima
zametnih stanica testisa**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u okviru Znanstvene grupe za istraživanje epigenetičkih biomarkera (epiMark).

Ovu disertaciju je financirala Europska unija putem Europskog fonda za regionalni razvoj, konkurentnost i koheziju, prema sporazumu o dodjeli bespovratnih sredstava br. KK.01.1.1.01.0008, „Regenerativna i reproduktivna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala“.

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Nino Sinčić, dr. med.

Suvoditelj rada: dr. sc. Tomislav Kuliš, dr. med.

Zahvale:

Zahvaljujem mentorima izv. prof. dr. sc. Ninu Sinčiću i dr. sc. Tomislavu Kulišu na pomoći i usmjeravanju u izradi doktorske disertacije te na strpljenju.

Zahvaljujem supruzi, kćerci, roditeljima, bratu i sestrama na potpori.

Zahvaljujem kolegicama na pomoći tijekom godina.

KRATICE

AFP - α -fetoprotein

BSA - goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)

cfDNA - nestanična slobodnocirkulirajuća DNA (engl. *cell-free DNA*)

DNMT - DNA-metiltransferaza

EK - embrionalni karcinom

GCNIS - neoplazija zametnih stanica *in situ* (engl. *germ cell neoplasia in situ*)

gDNA - genomska DNA

HE - hemalaun-eozin

KO - koriokarcinom

LDH - laktat dehidrogenaza

MTZST - miješani tumor zametnih stanica testisa

NSE - neseminom

OZT - okolno zdravo tkivo

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

POST-EK - postoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom

POST-MTZST - postoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa

POST-OP - postoperativni uzorci pacijenata s NSE

POST-TE - postoperativni uzorci pacijenata s teratomom

PRE-EK - predoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom

PRE-MTZST - predoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa

PRE-OP - predoperativni uzorci pacijenata s NSE

PRE-TE - predoperativni uzorci pacijenata s teratomom

qPCR - kvantitativna lančana reakcija polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

RPLND - sekcija retroperitonealnog limfnog čvora (engl. *retroperitoneal lymph node dissection*)

rpm - obrtaji po minuti (engl. *revolutions per minute*)

SE - seminom

STM - serum tumorski markeri

TBS - Tris puferirana otopina

TE - teratom

TZST - tumor zametnih stanica testisa

TŽV - tumor žumanjčane vreće

ZD - zdravi dobrovoljci

β -hCG - β -humani korionski gonadotropin

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Testis.....	1
1.2.	Spermatogeneza.....	2
1.3.	Tumori zametnih stanica testisa.....	2
1.3.1.	Tumori.....	2
1.3.2.	Incidencija tumora testisa.....	3
1.3.3.	Klasifikacija tumora testisa.....	5
1.3.4.	Histološki podtipovi TZST.....	7
1.3.5.	Etiologija i rizični faktori.....	8
1.3.6.	Razvoj TZST.....	10
1.3.7.	Genske i epigenetičke promjene kod TZST.....	10
1.4.	Klinička slika.....	12
1.5.	Dijagnostika TZST.....	12
1.5.1.	Biomarkeri.....	13
1.5.2.	Tkivni biomarkeri kod TZST.....	13
1.5.3.	Serumski biomarkeri kod TZST.....	14
1.6.	Liječenje TZST.....	15
1.7.	Nestanična DNA.....	16
1.8.	Metilacija cfDNA.....	17
1.9.	<i>RASSF1A</i>	19
1.10.	<i>PRSS21</i>	20
2.	HIPOTEZA.....	21
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	22
4.	ISPITANICI I METODE.....	23

4.1.	Ispitanici.....	23
4.2.	Metode.....	24
4.2.1.	Prikupljanje i obrada uzoraka.....	24
4.2.2.	Prikupljanje i obrada tumorskog tkiva.....	24
4.2.3.	Imunohistokemijsko bojenje.....	26
4.2.4.	Morfološka analiza imunohistokemijske reakcije.....	27
4.2.5.	Izolacija gDNA iz parafinskih blokova tkiva.....	27
4.2.6.	Izolacija i kvantifikacija cfDNA iz krvne i sjemene plazme.....	28
4.2.7.	Bisulfitna konverzija izolirane gDNA i cfDNA.....	30
4.2.8.	Početnice za PCR i pirosekvenciranje.....	31
4.2.9.	PCR (lančana reakcija polimerazom).....	33
4.2.10.	Pirosekvenciranje.....	34
4.2.11.	Analiza podataka dobivenih pirosekvenciranjem.....	35
4.2.12.	Statistička obrada podataka.....	35
5.	REZULTATI.....	37
5.1.	Pacijenti i dobrovoljci.....	37
5.2.	Ekspresija gena <i>RASSF1A</i> i <i>PRSS21</i> na proteinskoj razini u tkivu.....	37
5.2.1.	Ekspresija gena <i>RASSF1A</i>	38
5.2.2.	Ekspresija gena <i>PRSS21</i>	39
5.3.	Metilacija gDNA promotorske regije gena <i>RASSF1A</i> i <i>PRSS21</i> u tkivu.....	41
5.3.1.	Metilacija gDNA gena <i>RASSF1A</i>	41
5.3.2.	Metilacija gDNA gena <i>PRSS21</i>	43
5.4.	Korelacija metilacije gDNA promotorske regije gena <i>RASSF1A</i> i <i>PRSS21</i> u tkivu s ekspresijom na proteinskoj razini.....	44
5.5.	Analiza metilacije cfDNA promotorske regije gena <i>RASSF1A</i> u tekućinskim biopsijama.....	45

5.6.	Analiza metilacije cfDNA promotorske regije gena <i>PRSS21</i> u tekućinskim biopsijama.....	52
6.	RASPRAVA.....	59
6.1.	Stopa metilacije gDNA i ekspresija na proteinskoj razini gena <i>RASSF1A</i> i <i>PRSS21</i> u tkivima pacijenata s NSE.....	59
6.2.	Metilacija cfDNA gena <i>RASSF1A</i> u tekućinskim biopsijama pacijenata s NSE.....	61
6.3.	Metilacija cfDNA gena <i>PRSS21</i> u tekućinskim biopsijama pacijenata s NSE.....	63
6.4.	Potencijal metilacije cfDNA gena <i>PRSS21</i> i <i>RASSF1A</i> kao biomarkera kod NSE.....	64
7.	ZAKLJUČAK.....	67
8.	SAŽETAK.....	68
9.	ABSTRACT.....	69
10.	POPIS LITERATURE.....	70
11.	ŽIVOTOPIS.....	81

1. UVOD

1.1. Testis

Sjemenik (lat. *testis*) je muški parni spolni organ ovalnog oblika smještena unutar mošnjice (lat. *scrotum*), lociran iza penisa i ispred anusa. U testisu se proizvode muške spolne stanice tj. sjeme te se također sintetiziraju muški spolni hormoni. Ima masu 20-25 g, čineći sveukupnu masu oko 50 g. Testis je dužine 4-5 cm i promjera 2-3 cm (1,2). Testis se sastoji od: medijalne (lat. *facies medialis*) i lateralne strane (lat. *facies lateralis*), prednjeg (lat. *margo anterior*) i stražnjeg ruba (lat. *margo posterior*) te gornje (lat. *polus superior*) i donje polutke (lat. *polus inferior*). Dok je prednji rub testisa gladak i konveksan, stražnji rub je prekriven pasjemenikom (lat. *epididimis*). Epididimis prelazi u hilus, početni dio sjemenog tračka tj. funikulusa te kroz njega prolaze sjemenovod, krvne i limfne žile te živci. Svaki testis je prekriven kapsulom koju sačinjavaju tunika vaginalis (lat. *tunica vaginalis*), tunika albuginea (lat. *tunica albuginea*) i tunika vaskuloza (lat. *tunica vasculosa*). Tunika albuginea je debela vezivna čahura odgovorna za bijelu boja testisa te njegov integritet. Tunika vaskuloza je prožeta krvnim žilama, dok je tunika vaginalis serozna vreća podrijetlom iz potrbušnice. Sastoji se od parijetalnog (lat. *lamina parietalis tunicae vaginalis testis*) i visceralnog sloja (lat. *lamina visceralis tunicae vaginalis testis*). Na prednjoj i lateralnim stranama testisa prekriva tuniku albugineu (2).

Medijastinum (lat. *mediastinum testis*) je zadebljanje tunike albugine na stražnjoj strani testisa iz kojega se kroz tkivo testisa protežu septe, uske pregrade, koje dijele parenhim testisa na 200 do 300 piramidalnih odjeljaka tj. režnjića (lat. *lobuli testis*). Septe nisu potpune pregrade te su režnjići međusobno povezani. Režnjići testisa sadrže između jednog do četiri sjemeni kanalića, koji su zavijenog oblika i uloženi u vezivno tkivo. U vezivnom tkivu testisa nalaze se limfne i krvne žile te živci. U testisu se nalaze i potporne Sertolijeve stanice kao i Leydigove stanice. Uloga Leydigovih stanica je ranije navedena sinteza androgenih hormona, koja se odvija pod kontrolom luteinizirajućeg hormona iz hipofize (1,2). Režnjić testisa je orijentiran tako da mu je baza okrenuta prema površini testisa a vrh prema medijastenumu, gdje se savijeni sjemeni kanalići spajaju u jedan ravni kanalić (lat. *tubuli seminiferi recti*). Kanalići režnjeva se zatim u medijastinumu povezuju u rete testis, koje su s 10 do 20 odvodnih kanalića (lat. *ductuli efferentes*) povezane s epididimisom, čija je uloga pohrana i dozrijevanje spermija. Iz epididimisa izlazi sjemenovod (lat. *ductus deferens*) koji se zatim spaja s kanalom sjemenog

mjehurića (lat. *vesicula seminalis*) u ejakulatorni kanalić (lat. *ductus ejaculatorius*) koji prolazi kroz bazu prostate i otvara se u uretru (2,3).

1.2. Spermatogeneza

Spermatogeneza je proces formiranja muških spolnih stanica, spermija. Odvija se u sjemenim kanalićima, koji čine oko 90 % mase testisa te su sačinjeni od vezivno-mišićne ovojnice, zametnog epitela i bazalne membrane. Zametni epitel pak čine dva tipa stanica, potporne Sertolijeve stanice i stanice spermatogenetske loze. Spermatogeneza kreće sa spermatogonijama, primitivnim spolnim stanicama, koje su smještene uz bazalnu membranu. Mitozom održavaju svoju populaciju. U određenim uvjetima spermatogonije se diferenciraju u primarne spermatocyte koje se potom, procesom mejoze, diferenciraju u sekundarne spermatocyte. Iz sekundarnih spermatocita se razvijaju spermatide koje sazrijevaju u spermije. Spermatogeneza završava kada formirani spermiji napuštaju zametni epitel (2).

Stanice spermatogenetske loze nastaju diferencijacijom iz embrionalnih spolnih prastanica, tj. primordijalnih zametnih stanica (engl. *primordial germ cells*) i gonocita. Primordijalne zametne stanice prolaze proces epigenetičkog reprogramiranja demetilacijom DNA kako bi se mogle diferencirati u spolne stanice. Prolaskom epigenetičkog reprogramiranja primordijalne zametne stanice diferenciraju se u gonocyte, koje se zatim reguliranim procesima proliferacije, diferencijacije, migracije i apoptoze razvijaju u spermatogonijske matične stanice (4,5).

1.3. Tumori zametnih stanica testisa

1.3.1. Tumori

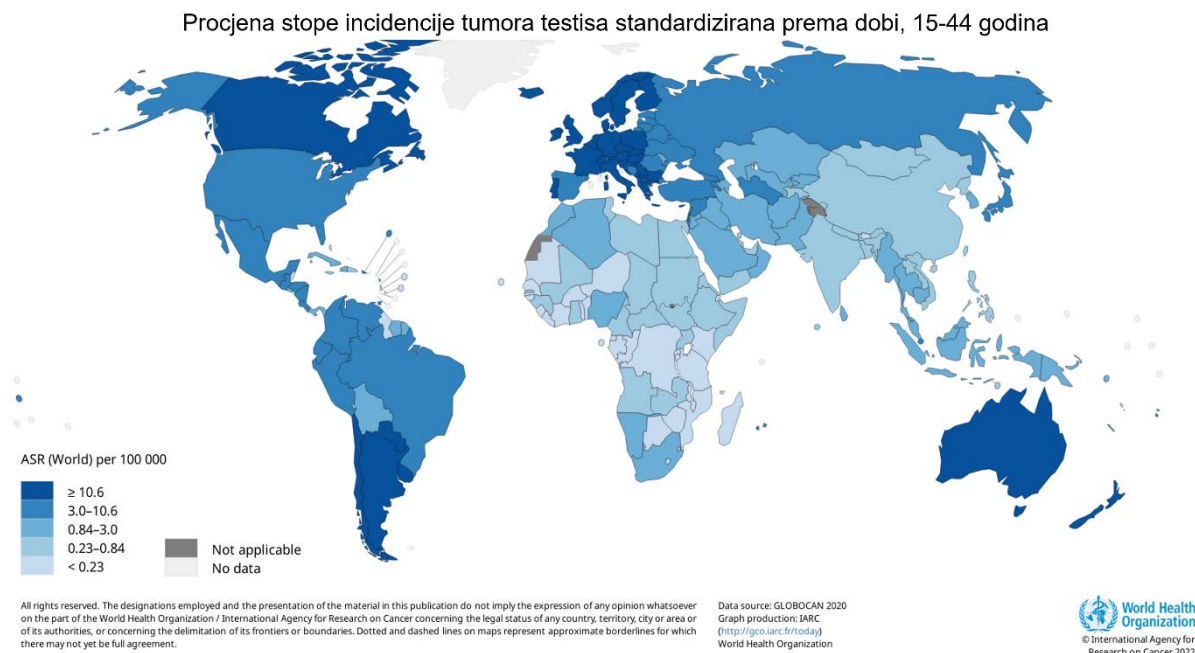
Tumori ili neoplazije su abnormalne tvorevine tkiva uzrokovane greškama u mehanizmima koji reguliraju rast i razvoj stanica. Tumori su monoklonalnog porijekla, odnosno oni nastaju iz jedne inicijacijske stanice tj. prekursorske lezije, koja može biti bilo koja stanica u tijelu. Neovisno o tipu tumora, sve tumorske stanice ispoljavaju određene karakteristike: 1. selektivan rast i proliferativnu prednost, 2. promijenjen odgovor na stres koji favorizira

preživljavanje, 3. angiogeneza, 4. sposobnost invazije i metastaze, 5. promjena metabolizma, 6. prilagođavanje mikrookoliša te 7. imunomodulacija (6,7).

Tumori imaju snažnu nasljednu komponentu ali na njihov nastanak može utjecati i okoliš te su i genetska i epigenetička komponenta bitne za njihov nastanak i rast. Uzroci samog tumora su brojni i variraju od mutacija u određenim genima koje dovode do poremećaja ključnih staničnih mehanizama pa do vanjskih podražaja, poput virusa, kemikalija te radijacije. Kako tumori nastaju iz jedne početne stanice, jedan genetski ili epigenetički poremećaj nije dostatan da zdravu stanicu pretvori u tumorsku, on je tek inicijacijski korak. Nakon njega je potreban slijed od nekoliko oštećenja tj. promotorskih koraka u fazi transformacije stanice (6). Najčešće, to je proces koji traje godinama.

1.3.2. Incidencija tumora testisa

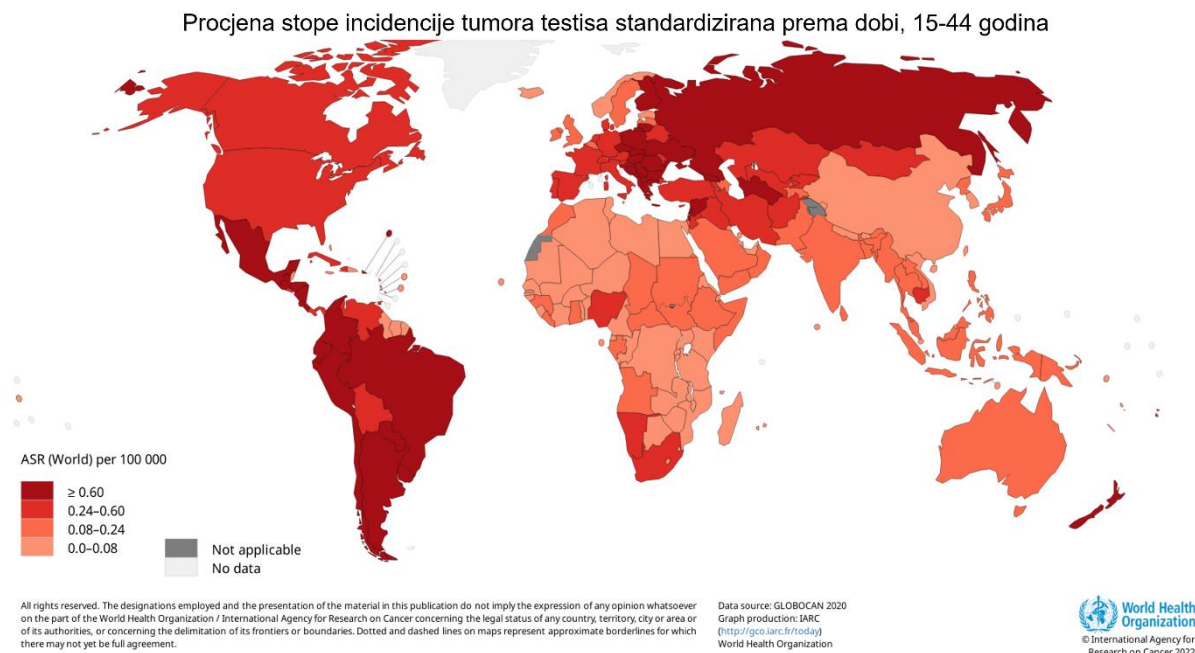
Prema podacima GLOBOCAN-a (engl. *Global Cancer Observatory*) procijenjeno je da je tijekom 2020. godine u svijetu bilo dijagnosticirano 19.292.789 slučajeva raka a 9.958.133 ljudi je preminulo kao posljedica bolesti. U Hrvatskoj je pak u 2020. godini bilo dijagnosticirano 26.092 slučajeva raka a 14.326 ljudi je preminulo kao posljedica bolesti. Tijekom 2020. godine diljem svijeta dijagnosticirano je 74.500 slučajeva tumora testisa, čineći ga 20. najčešćim tipom raka, ali prvim po incidenciji među muškarcima u dobi od 15 do 44 godina europskog porijekla (Slika 1) (8,9). To je 3.500 slučajeva više no 2018. godine i stalno je u porastu. Konkretnije rečeno, porast incidencije tumora zametnih stanica testisa (TZST) kroz proteklih 20 godina je bio oko 70 % (10-13). U populacijama afričkog porijekla incidencija je značajno niža (14). Rastuća incidencija među populacijama europskog porijekla bilježi se od uvođenja registara za rak 1950-ih, s tim da je u zemljama najbrže rastuće incidencije stanovito usporavanje primijećeno od 2000-ih. Hrvatska je trenutno s razinom incidencije od 9,6 pacijenata na 100.000 ljudi šesta zemlja svijeta po razini incidencije, dok je susjedna Slovenija s incidencijom od 10,8 pacijenata na 100.000 ljudi druga zemlja po razini incidencije u svijetu. Otprilike 95 % svih tumora testisa čine TZST-a, čija se patogeneza preklapa s genitalnim malformacijama, kriptorhizmom, smanjem plodnosti te drugim patologijama „sindroma testikularne disgeneze“ (8).



Slika 1. Globalna incidencija tumora testisa. Stopa incidencije tumora testisa u svijetu po 100.000 stanovnika, među muškarcima raspona dobi između 15 i 44 godina starosti. Svjetliji tonovi plave boje označavaju nisku stopu incidencije dok tamniji tonovi plave boje označavaju visoku incidenciju. (Preuzeto i prilagođeno s <https://gco.iarc.fr/> (15))

Etiologija raka testisa unatoč brojnim saznanjima iz genetike i povezanosti s ranije navedenim stanjima većinom nije razjašnjena. Doduše, brzo rastuća incidencija kod populacije europskog podrijetla upućuje na utjecaj okoliša i životnih navika. Izloženost endokrinim disruptorima je pretpostavljeni rizični faktor kako *in utero* tako i u ranim životnim stadijima, ali su kao skupine spojeva slabo istraženi. Izloženost majki tijekom trudnoće spojevima organohalogenima i organoklorina je povezana uz rizik TZST, kao što je i konzumacija kanabisa potvrđena kao rizični faktor. Konzumacija kanabisa je od posebnog interesa kako sve veći broj zemalja legalizira prodaju i konzumaciju (8).

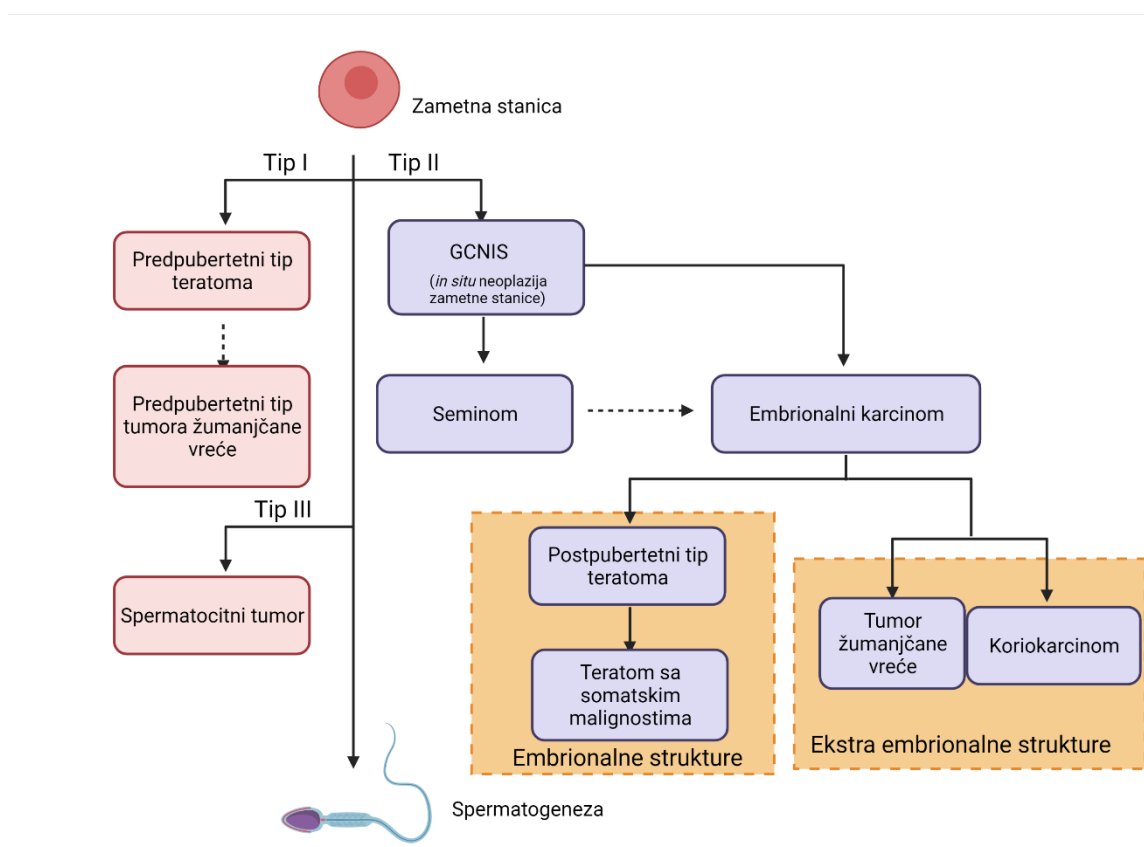
U razvijenim zemljama zapada, uz porast incidencije odvijao se i pad mortaliteta od 1970-ih i uvođenja kemoterapije na temelju platine. U zemljama slabe ili srednje razvijenosti stopa mortaliteta je 5 do 10 puta viša. Po mortalitetu je Hrvatska s razinom od 0,6 iznad regionalnog i Europskog prosjeka, dok Slovenija s razinom od 0,2 na 100 000 je daleko ispod oba (Slika 2) (8).



Slika 2. Globalni mortalitet tumora testisa. Stopa mortaliteta tumora testisa u svijetu po 100.000 stanovnika, među muškarcima raspona dobi između 15 i 44 godina starosti. Svjetliji tonovi crvene boje označavaju nisku stopu mortaliteta dok tamniji tonovi crvene boje označavaju visoku incidenciju. (Preuzeto i prilagođeno s <https://gco.iarc.fr/> (15))

1.3.3. Klasifikacija tumora testisa

Po klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) tumori testisa se dijele na tumore koji potječu od neoplazije zametnih stanica *in situ* (engl. *germ cell neoplasia in situ*, GCNIS) i tumore koji ne potječu od GCNIS-a. Različiti tipovi TZST-a su pogreške u različitim fazama razvoja zametne stanice u procesu spermatogeneze. Iz navedenog proizlaze njihove molekularne i histološke različitosti, konkretnije, postoje tri tipa TZST-a. Tip I su predpubertetski teratomi (TE) i predpubertetski tumori žumanjčane vreće (TŽV), tip II čine seminomi (SE) i neseminomi (NSE) a tip III je spermatocitni tumor. Tip I i tip III nisu porijeklom iz GCNIS-a. Tip I se primarno javlja kod djece dok se tip III primarno javlja u starijoj dobi. Tip I i tip III zajedno čine oko 5 % incidencije svih tumora testisa. TZST tipa II su porijeklom iz GCNIS-a, javljaju se primarno u dobi od 15 do 45 godina starosti (Slika 3) (14). Istraživanje opisano u ovoj disertaciji je fokusirano na njih i sav spomen TZST-a će se odnositi isključivo na TZST tipa II.



Slika 3. WHO klasifikacija TZST. Po klasifikaciji WHO-a TZST se klasificiraju u tri tipa, sukladno tome imaju li ishodište iz premaligne lezije *in situ* (GCNIS) ili ne. Od tri tipa TZST najčešći su tipa II koji ishodište imaju u GCNIS-u. (Preuzeto i prilagođeno prema Raos D, (16))

TZST tipa II su klinički i histološki najraznolikija skupina TZST-a. Mogu se sastojati od svih histoloških elemenata, kako embrionalnih tako ekstraembrionalnih. Histološki elementi koji svoje porijeklo vuku iz zametnih stanica mogu se vidjeti kod podtipa SE, dok se histološki elementi koji svoje porijeklo vuku iz linija ili matičnih stanica ili somatskih stanica mogu vidjeti u podtipu u NSE. TZST tipa II vuku porijeklo iz inicijalnih stanica, GCNIS-a. GCNIS nalikuje embrionalnim zametnim stanicama, konkretnije, primordijalnim zametnim stanicama (spolnim prastanicama) u fazi njihove migracije iz epiblasta u gonadni greben i prije prve faze njihovog dozrijevanja u njemu. GCNIS odgovara gonocitama spriječenim u daljnjem dozrijevanju u spermatogonije. Kao rezultat toga, GCNIS karakterizira ekspresija embrionalnih molekularnih markera i ne može se odrediti smjer diferencijacije prema SE ili NSE (9,14).

1.3.4. Histološki podtipovi TZST

Kako je ranije navedeno, TZST su histološki vrlo heterogena grupa koja se dijeli na dvije skupine: SE i NSE. 55 % TZST-a čini čisti SE, čija je karakteristika da se javlja u kasnijoj životnoj dobi nego NSE, s vrhuncem incidencije oko 35. godine života. SE je građen od homogene populacije nediferenciranih stanica (9,17). SE ima dobru prognozu izlječenja jer jako dobro reagira na liječenje cisplatinom što dovodi do visoke stope izlječenja (9). Morfološki, stanice SE su jednolične s uvećanom jezgrom. U stanicama SE prisutna je jezgrica te blijeda citoplazma. Također je u tkivu SE-a često prisutna infiltracija limfocita (18). Udio SE-a se kroz godine povećao s 31 % 1990. godine na 55 % 2014. godine a uz udio se i vrhunac incidencije pomicao s ranih u srednje pa čak i kasne 30-e (19). NSE pak ima udio od 45 %, koji je pao s 69 % 1990. godine. Vrhunac incidencije mu je oko 30-e godine života, dok je 1990. bio oko 25-e godine (11,19,20). Četiri različita podtipa sačinjavaju NSE: 1. embrionalni karcinom (EK), 2. postpubertalni TE, 3. postpubertalni TŽV i 4. koriokarcinom (KO). Podtipovi NSE se u većini slučajeva pojavljuju u različitim kombinacijama navedenih komponenti, tada se nazivaju mješoviti tumor zametnih stanica testisa (MTZST), a vrlo rijetko kao čiste forme pojedinih histoloških podtipova. MTZST-a u otprilike 10 % sadržava i formu SE (21,22).

EK se sastoji od primitivnih tumorskih matičnih stanica bez vidljivih znakova diferencijacije, koje svojim izgledom nalikuju embrionalnim matičnim stanicama iz embrioblasta koji je dio blastociste skupa s trofoblastom (9,22). Za EK su karakteristične velike pleomorfne jezgre, ili više velikih jezgara, gusta amfofilna citoplazma kao i brojne mitotičke figure i apoptotička tjelešca te su prisutni nekroza i krvarenje (9,23). Također, EK karakterizira sposobnost brzog širenja. EK recidivira u 33 % posto slučajeva nakon operativnog zahvata i tretmana kemoterapijom. Ovisno o liniji diferencijacije, iz EK se može razviti TE diferencijacijom prema strukturama zametka, TŽV nastankom stanica ekstraembrionalnog endoderma i mezoderma te KO nastankom elemenata trofoblasta (22). Za TE je karakteristična heterogenost, kako patološki tako i klinički. Iako se diferencijacija TE-a može u drugim dijelovima tijela može smatrati benignim, u testisu on zadržava svoju sposobnost malignosti te je TZST-a koji najčešće razvije rezistenciju na cisplatinu, kako cisplatina djeluje na stanice u proliferaciji kojih je manje u tkivu diferenciranog TE (17). TE sadrži tkiva porijeklom iz sva tri zametna listića te je kod njega moguće uočiti sva somatska tkiva u različitim stadijima

diferencijacije (9). TE se makroskopski pojavljuje kao mješavina čvrste mase s cistama (24). TŽV sačinjavaju uglavnom jednolične stanice, bez velike polimorfije ili izražene mitotske aktivnosti. Karakteristike stanica TŽV mogu biti velika razlika u arhitekturnim karakteristikama, prisutnost glomeruloidnih i žljezdolikih struktura te solidnih nakupina, kao i mucinozna kao i mikrocistična pozadina (25). Karakteristično se stanice redaju oko lumena krvnih žila i čine tzv. „Schiller-Duvalova“ tjelešca (26). TŽV se zbog različitosti morfološke prezentacije može diferencijalnodijagnostički zamijeniti za SE ili EK. TŽV, za razliku od drugih TZST-a, sadržava izvanembrionalna tkiva (27). KO je veoma agresivan podtip NSE čija dijagnoza zahtijeva rano i agresivno liječenje tumora kemoterapijom. Stanice KO-a dolaze u dva morfološka oblika, mononuklearni trofoblasti te višejezgreni sinciciotrofoblasti (28). KO karakteriziraju strukture tipa sincicio- i citotrofoblasta te velika žarišta krvarenja i nekroze, opsežna limfovaskularna invazija uz razvoj ranih i opsežnih metastaza. TZST s dominantom komponentom KO-a imaju najniže izgleda izliječenja (28,29).

1.3.5. Etiologija i rizični faktori

Etiologija TZST-a još nije dovoljno razjašnjena unatoč rastućoj incidenciji diljem svijeta. Tri su primarna razloga za to: 1. epidemiološke studije na TZST-u je teško provoditi jer je njihov nastanak pretpostavljen u fazama ranog razvoja organizma, 2. velika je heterogenost histoloških oblika TZST-a te 3. nedostatak prikladnih animalnih modela. Epidemiološka istraživanja i kliničke studije ukazuju na to da su TZST uzrokovani poremećajem ranog razvoja testisa te da izloženost ksenobioticima u koje spadaju i endokrini disruptori ima ulogu u patogenezi tih tumora. Drugi poremećaji plodnosti poput kriptorhizma, hipospadije te subfertilnosti su povezane s poremećajem ranog razvoja testisa te uz TZST spadaju u širi sindrom testikularne disgeneze (30). Kriptorhizam je konkretno najveći rizični čimbenik za razvoj TZST-a. Kriptorhizam rezultira degeneracijom kako Sertolijevih tako i Leydigovih stanica što rezultira atrofijom testisa i abnormalnom spermatogenezom. Kriptorhizam dovodi do 40 puta većeg rizika za razvijanje TZST-a. Ukoliko se orhidopeksijom testisi spuste iz abdominalne šupljine ili ingvinalnog kanala prije 10. godine života rizik za razvoj TZST-a se može umanjiti (21,31). Geni povezani sa subfertilnosti su također geni za koje se pokazalo da su uključeni u razvojni proces TZST-a. Od velikog interesa je gr/gr delecija, mikrolecija na Y kromosomu, koja se može prenijeti s oca na sina i za koju je potvrđena poveznica kako s

razvojem TZST-a tako i sa subfertilnosti (32). Studije su pokazale značajan utjecaj mikrookoliša na razvoj TZST-a, koji je iznimno kompleksan kod razvoja muških zametnih stanica. Prepoznati faktori utjecaja na mikrookoliš muških zametnih stanica u razvoju spadaju kriptorhizam, hipospadija, krvarenje tijekom trudnoće, izloženost estrogenu tijekom trudnoće, visoka dob majke, niska porođajna težina te prijevremeni porod (33).

Unatoč pronađenim faktorima rizika, većina TZST-a se pojavljuje spontano bez identificiranih genetskih regija rizika. Obavljene genomske studije pretpostavljaju vrlo visoku nasljednu komponentu kod TZST-a od oko 40 %, od koje je svega 9 % objašnjeno prisutnošću SNP-ova. Nasljedna komponenta od 40 % je treći po redu najveći utjecaj kod tumora, odmah iza tumora štitnjače i drugih endokrinih žlijezda. Posljedično, braća ili djeca oboljelih imaju znatno viši rizik oboljenja, braća osam do deset puta, sinovi šest puta veći rizik od razvijanja TZST. Također, kod TZST-a je prisutna i etnička komponenta gdje je europsko podrijetlo rizičan faktor dok afričko podrijetlo ima najniži rizik oboljenja. Mutacije u genima su korelirane s rizikom oboljenja, posebice u genima *KITLG*, *SPRY4*, *BAK1*, *TERT*, *DMRT1*, *PRDM14*, *DAZL* i *HPGDS*. Navedeni geni su uključeni u procese razvoja gonada i zametnih stanica. Unatoč navedenoj genetskoj pozadini, njome nije moguće objasniti rastuću incidenciju koja pokazuje korelaciju s utjecajem okoliša i životnih navika. Među životne navike dovedene u korelaciju s incidencijom TZST-a spadaju: konzumacija marihuane, koja nepovoljno djeluje i na spermatogenezu, izloženost trudnica velikim koncentracijama dietilstilbestrola kao i dugotrajno izlaganje polivinil-kloridu (9,20,30,32).

Među utjecaje okoliša spadaju i ranije navedeni endokrini disruptori, tvari koje mijenjaju endogene razine hormona i njihovu sintezu, efekt, metabolizam te procese eliminacije. Endokrini disruptori se koriste u industrijaliziranim zemljama, primarno u procesima industrije uključujući i farmaceutsku te agronomsku (pesticidi). Unatoč dokazanoj poveznici endokrinih disruptora s urogenitalnim abnormalnostima kao kriptorhizmom, hipospadijom i neplodnosti, direktan učinak na razvoj TZST-a još nije dokazan. To je donekle zato što je faktore inicijacije teško razlučiti, ali i djelomično zato što endokrini disruptori primarno djeluju na Sertolijeve i Leydigove stanice. Njihov učinak bi mogao biti više indirektan, utječući na testikularni mikrookoliš, koji zatim utječe na razvoj TZST-a (33). Konzumacija kanabisa je dovedena u odnos s brojnim urološkim poremećajima, uključujući i TZST-a. Kanabis smanjuje koncentraciju sjemena te je zasad jedan od rijetkih prepoznatih direktnih rizičnih faktora za razvoj TZST. Procjenjuje se da će 10 % korisnika kanabisa razviti poremećaj vezan uz uporabu kanabisa (34).

1.3.6. Razvoj TZST

Razvoj TZST-a je poligenski, a sastoji se od više koraka. Početak razvoja TZST-a kreće već tijekom embrionalnog razvoja osobe. Nakon inicijalnog početka, slijedi mirovanje do puberteta kada hormonalna stimulacija vezana uz spermatogenezu pokreće daljnji niz događaja koji rezultiraju u manifestaciji TZST-a (30).

Kako je ranije spomenuto, svi TZST-i nastaju iz prekursorske lezije GCNIS-a, koja je rezultat bloka diferencijacije primordijalne zametne stanice/gonocyte i zadržavanja ranog embrionalnog molekularnog profila. Razlozi bloka diferencijacije nisu potpuno jasni ali pretpostavlja se kako suboptimalan mikrookoliš zbog izloženosti ksenoestrogenima i antiandrogenima utječe na funkciju Sertolijevih i Leydigovih stanica, što dovodi do razvoja GCNIS-a. Također, poremećaj puta *KIT/KITLG* koji regulira preživljenje, migraciju i proliferaciju primordijalnih zametnih stanica/gonocita ključan je za razvoj GCNIS-a. Ta teorija o međudnosu genetskih i epigenetičkih faktora u razvoju TZST-a se naziva genokolišna hipoteza (engl. *genvironmental hypothesis*) (11,30).

1.3.7. Genske i epigenetičke promjene kod TZST

Unatoč velikoj heterogenosti podtipova TZST-a, svi imaju svoje ishodište u premalignoj leziji GCNIS. Genetika samog GCNIS-a je slabo istražena ali je primijećena učestalost mutacija gena *KIT* (20).

TZST na genetskoj razini reflektira svoje embrionalno porijeklo, ima nisku incidenciju mutacija i karakterističan profil metilacije DNA. Stanice SE-a i GCNIS-a su tipično hipotriploidne dok su stanice NSE-a hipotriploidne. Dok drugi adultni tumori imaju incidenciju mutacija od 8 - 11 mutacija/megabazi, TZST imaju incidenciju od 0,5 mutacija/megabazi (20).

Prvi opisani genetski marker TZST-a je bio dodatan izokromosom 12 identificiran analizom kariotipa. FISH analize su potvrdile dodatak 12p kromosoma kod svih analiziranih pacijenata s TZST-om. Nije potpuno jasno na koji način dodatak 12p dovodi do TZST-a, ali na njemu se nalaze različiti geni bitni za tumorigenezu kao što su protonkogeni *CCND2* i *KRAS* te

faktori rasta i geni vezani uz matičnost poput *TNFRSF1A*, *GLUT3*, *REA*, *FLJ22028*, *NANOG*, *STELLAR/DPPA3* i *GDF3* (20).

Iako mutacije nisu učestale kod TZST-a neke su ipak značajne, poput mutacije u genu *KIT*. Mutacije u genu *KIT*, koji sadržava upute za protonkogeni receptorski protein i ima bitnu ulogu u preživljenju stanica i proliferaciji, najčešća su mutacija kod TZST-a s učestalošću od 19 % u SE-u i 2 % NSE-u. Slijedeće po učestalosti su mutacije u genima *KRAS/NRAS*, koji također sadržavaju upute za protoonkogeni receptorski protein koji je aktivator brojnih puteva poput *Raf/MEK/ERK*, prisutne u 7 % SE i 0 % NSE. *BRAF* gen koji sadržava upute za protein koji regulira *MAP/ERK* ciklus i ima važnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji stanica, mutiran je u 1 % SE i 2 % NSE. *TP53* gen, koji sadržava upute za p53 protein, regulator staničnog ciklusa koji je važan u odgovoru na stres kao što je oštećenje DNA, mutiran je u 7 % SE i 0 % NSE (20). Mutacija u genu *CHEK2* je pronađena u 4% pacijenata s TZST-a, ali prisutnost genetskih promjena u *CHEK2* dovodi do povećanja rizika za njegov razvoj 4 do 6 puta, što je jedina mendelska predispozicija zasad detektirana kod TZST-a (35).

Istraživanja ekspresije gena kod TZST-a nije jednostavno provoditi iz nekoliko razloga:

1. TZST-a predstavljaju rijetku bolest te su sve studije rađene na relativno malom broju uzoraka,
2. TZST-a se veoma često prezentiraju kao MTZST-a, kod kojih svaka komponenta ima kako drukčiju histologiju tako i molekularni profil i
3. kao kontrole se najčešće koristi okolno netumorsko tkivo (OZT) testisa, bez neoplastičnih promjena. Iako se OZT uzima kao zdravo kontrolno tkivo, u njemu se ipak mogu pronaći stanice GCNIS-a jednako kao što se unutar njega mogu nalaziti premaligne promjene na molekularnoj razini, ili pak ono može biti kontaminirano prilikom disekcije s tumorskim tkivom oko kojeg se nalazi (20). Ipak, prema našem prethodnom istraživanju, veće studije pokazuju da postoje geni čija ekspresija može razlikovati TZST-a od zdravih testisa, na primjer proteini *POU5F1* i *NANOG* (22). Zbog navedenih razloga ekspresija gena kod TZST-a je više istražena na proteinskoj razini, koja je pokazala jasnu razliku među podtipovima TZST. Kod SE je karakteristična ekspresija *OCT3/4*, *cKIT*, *SALL4*, *D2-40* i *SOX17*, prisutnost izokromosoma 12p te nedostatak ekspresije *SOX2*, *CD30*, *LCA*, *AFP* i *bHCG*. NSE pokazuju drukčiji obrazac ekspresije, pa je tako za EK karakteristična ekspresija *CD30*, *SOX2*, *OCT3/4* te nedostatak ekspresije *cKIT*, *GPC3* i *AFP*. Kod TE je najveća varijacija ekspresije zbog histološke raznolikosti prisutnih tkiva, ali konzistentna je ekspresija *SALL4*. U podtipu TŽV je prisutna ekspresija *GPC3*, *AFP*, *GATA3* te keratina, dok nema ekspresije *OCT3/4*. Naposljetku, u podtipu KO je prisutna ekspresija *CK7*, *GATA3* i *bHCG*. Kod svih NSE je također karakterističan izokromosom 12p (25).

Epigenetičke modifikacije su prepoznate kao bitan faktor razvoja TZST, njihove progresije i razvijanja otpornosti na cisplatinu. Tri su glavna epigenetička mehanizma: posttranslacijske modifikacije histona, interferencija nekodirajućim RNA i metilacija DNA. Utjecaj histonskih modifikacija i nekodirajućih RNA se tek krenuo istraživati kod TZST-a, pa mehanizmi i njihov utjecaj nisu potpuno razjašnjeni. Ipak, dosadašnja istraživanja upućuju da oba mehanizma imaju značajnu ulogu u razvoju TZST-a. Najviše istraživanja epigenetičkih modifikacija kod TZST se provodilo na metilaciji DNA. Metilacija DNA kod TZST-a je povezana s brojnim ključnim procesima poput tumorigeneze, održavanja pluripotencije, diferencijacije u podtipove TZST-a te razvoja otpornosti na cisplatinu (20).

1.4. Klinička slika

TZST se u većini slučajeva prezentiraju kao bezbolna tvorba tj. uvećanje u jednom testisu. Bol je rjeđi simptom koji se prezentira u oko 30 % slučajeva, a jaka bol tek u 10 % slučajeva. U 11 % slučajeva bol se prezentira ne u testisu već u leđima i lumbalnom području te pregled pacijenta sa sumnjom na TZST mora uključivati i pregled abdomena, toraksa i supraklavikularnog područja (36,37). Ukoliko je TZST u uznapređovalom stadiju, što karakterizira inicijacija tumorske invazije i prisutnost metastaza, prisutni su i drugi simptomi poput gubitka tjelesne težine, bol u vratu i kostima te problemi s disanjem (38).

TZST mogu oponašati druga stanja, poput orhiepididimitisa, što otežava dijagnozu. Također, stanja poput subfertilnosti dovode do slučajne detekcije TZST-a prilikom ultrazvučne pretrage. Ukratko, standardna procedura upućuje na to da svaka otkrivena izraslina u testisu zahtijeva daljnju obradu kojom se dijagnostičkim postupcima isključi ili potvrdi dijagnoza tumora testisa (38,39).

Nije u potpunosti razjašnjen mehanizam aktivacije GCNIS-a kao premaligne lezije niti je sasvim jasna njena učestalost u populaciji. Doduše, u otprilike 5 % pacijenata s TZST-om u kontralateralnom testisu je detektiran GCNIS, što je i povezano s njihovim povećanim rizikom za pojavljivanje TZST-a u kontralateralnom testisu (40).

1.5. Dijagnostika TZST-a

Trenutno ne postoji metoda probira pacijenata s TZST-om, već je početna točka pacijentov samopregled testisa. Ukoliko pri pregledu testisa pacijent napipa kvržicu, liječnik nakon potvrdnog fizikalnog pregleda upućuje osobu na pregled ultrazvukom kako bi se utvrdila prisutnost lezije (engl. *mass forming lesion*). Ultrazvukom se radi pregled oba testisa, kako bi se odmah i isključila mogućnost mase u kontralateralnom testisu. Ukoliko je potvrđena njena prisutnost, standardna procedura je pacijenta čim prije podvrgnuti radikalnoj orhidektomiji. Iako je uobičajena procedura kod pacijenata sa sumnjom na prisutnost tumora obavljanje tkivne biopsije u svrhu postavljanja dijagnoze prije samog kirurškog zahvata, pacijenti sa sumnjom na TZST slijede drugačiju proceduru. Naime, tkivna biopsija kod pacijenata sa sumnjom na TZST ne obavlja se zbog vrlo visokog rizika i nuspojava. U slučaju sumnje na prisustvo TZST-a u kontralateralnom testisu provodi se zahvat eksploracije testisa uz hitnu patohistološku dijagnostiku, kako pacijent ne bi bez potrebe bio podvrgnut operativnom zahvatu na oba testisa (38,41,42). Nakon obavljene orhidektomije odstranjena izraslina se analizira patohistološki pomoću metoda klasične histologije i imunohistokemije kako bi se postavila definitivna dijagnoza (22,43).

1.5.1. Biomarkeri

Biomarkere čine stanične, molekularne ili biokemijske karakteristike koje mogu biti objektivno mjerene. Prisustvo, ili rjeđe odsustvo, biomarkera u tkivu od interesa služi identifikaciji tkiva, postavljanju dijagnoze te pomaže u odabiru terapije (44-47). Konkretnije, biomarkeri se dijele na molekularne/biokemijske, fiziološke i anatomske. Biomarkeri su po strukturi molekule DNA, RNA, proteini, šećeri, lipidi, metaboliti te cijele stanice. Biomarkeri su prisutni u tkivima od interesa, ili se nalaze u tjelesnim tekućinama i izlučevinama poput krvi, urina, sline itd. (46,48,49).

1.5.2. Tkivni biomarkeri kod TZST-a

Tkivne biopsije su zlatni standard u dijagnostici i prognostici tumora, osobito TZST-a (50-52). Standardna procedura je uzimanje bioptata primarnog tumora gdje svaka biopsija predstavlja molekularno stanje dijela tumora koji je bioptiran u vremenu kada je biopsija

obavljena. Tu je važno za naglasiti kako su tumori, osobito TZST, heterogeni te postoji realna mogućnost da biopsija ne zahvati dio tumora s agresivnijim subklonovima, ili da je obavljena prije nego ih je moguće detektirati (42). Biopsija je sama po sebi invazivna procedura koja uvijek sa sobom nosi mogućnost diseminacije tumorskog tkiva, koja je u slučaju TZST-a toliko visoka da se biopsija osim u iznimnim slučajevima ne provodi (38,41,42). Tkivni biomarkeri kod TZST-a se detektiraju nakon provedene orhidektomije za identifikaciju prisutnih podtipova u odstranjenom tumoru. To su ranije navedeni: OCT3/4, cKIT, SALL4, D2-40 i SOX17, izokromosom 12p te nedostatak ekspresije SOX2, CD30, LCA. AFP i bHCG kod podtipa SE, CD30, SOX2, OCT3/4 te nedostatak ekspresije cKIT, GPC3 i AFP kod EK, SALL4 kod TE, GPC3, AFP, GATA3 te keratina i nedostatak ekspresije OCT3/4 kod TŽV i konačno CK7, GATA3 i bHCG kod KO. Opet, kod svih NSE je karakteristično prisustvo izokromosoma 12p (25).

1.5.3. Serumski biomarkeri kod TZST-a

Tekućinske biopsije su alternativa tkivnim biopsijama i predstavljaju manje invazivan i manje rizičan postupak dolaženja do biomarkera za stanje od interesa. Kako u tekućinskim biopsijama biomarker slobodno cirkulira heterogenost tumora je manji problem, a i lakše je kroz vrijeme pratiti bilo progresiju bilo učinak liječenja. Te karakteristike čine tekućinske biopsije od posebnog interesa kod pacijenata s TZST-om, pa je praćenje serumskih tumorskih markera (STM) rutinski klinički proces čije praćenje kreće prije same orhidektomije (52-54). U dijagnozi TZST-a se koriste primarno α -fetoprotein (AFP), β -humani korionski gonadotropin (β -hCG) i laktat dehidrogenaza (LDH) (55). Nažalost, kod preko 40 % svih pacijenata s TZST-om nema povišenih STM. Ovo je osobito problematično kod pacijenata sa SE kod kojih se povišene vrijednosti STM-a detektiraju u svega 30 - 40 % pacijenata (42,56). Povišene vrijednosti STM-a su ipak češće kod dijagnoze NSE i njihove vrijednosti se vežu uz prisutnost određenih podtipova. Tako su visoke vrijednosti β -hCG-a indikacija prisutnosti KO, dok pak povišeni AFP indicira na prisutnost EK ili TŽV (9,29). LDH pak nije specifičan marker, tj. njegova prisutnost uvijek upućuje na neoplastičnu promjenu ali nije specifičan samo za TZST (18). Kod TE-a je veoma rijetko specifično povišenja vrijednosti STM-a pa njegova detekcija predstavlja izazov (17,55). Vrijednosti STM-a su od velike koristi kod procijene stadija te odgovora na liječenje, jer bi se trebale normalizirati pri završetku uspješnog liječenja (55).

AFP je jednolančani glikoprotein od 70 kDa prisutan u ljudskom fetusu tijekom trudnoće. Sintetizira se u žumanjčanoj vreći, crijevima i jetri fetusa (42). Njegova uloga tijekom fetalnog razvoja je supresija majčinog imunog sustava kako ne bi došlo do odbacivanja fetusa te mu je koncentracija najviša između 12. i 14. tjedna. Godinu dana nakon rođenja, koncentracija AFP-a značajno opada. AFP nije jednako eksprimiran kod svih podtipova TZST-a. On je primarno povišen kod podtipova TŽV i EK dok se u oko 20 - 25 % slučajeva detektira i kod podtipa TE. AFP se pak uopće ne izlučuje u podtipu SE. AFP je povišen i u drugim tumorima i ne-tumorskim stanjima, poput hepatocelularnog karcinoma, karcinoma pluća te bolestima jetre. Poluvrijeme života AFP-a je od 5 do 7 dana (42,57).

hCG je protein kojeg proizvode stanice sinciotrofoblasta placente, a veličina mu je 38 kDa. Sastavljen je od α i β podjedinice. hCG ima različite uloge tijekom trudnoće poput poticanja diferencijacije fetalnih organa te održavanja žutog tijela. TZST-a proizvodi ili cijeli hCG ili samo njegovu β podjedinicu. Visoka razina β -hCG indikator je prisutnosti KO a umjerena razina kod prisutstva EK u 40 - 60 % pacijenata. Kod pacijenata sa SE, 10 - 20 % pacijenata I. stadija ima povišene razine β -hCG, dok se u 30 - 50 % pacijenata viših stadija detektira povišenje. Poluvrijeme života β -hCG je između 12 i 36 sati (42,58).

LDH je stanični enzim veličine 134 kDa prisutan u svim tkivima s najvećom koncentracijom u jetri, mozgu i mišićima. Ima pet izoformi od kojih je LDH-1 najviše povezana s TZST. Kako je LDH općenito eksprimiran u tkivima njegova prisutnost u krvi je marker tkivnih oštećenja koja su dovela do njegovog otpuštanja. Kao rezultat toga specifičnost LDH kao markera za TZST je niža ali njegova ekspresija je povišena u otprilike 40 - 60 % pacijenata s TZST, kako NSE tako i SE (42,58).

Iako bitni u kliničkoj primjeni, nedostatak specifičnosti i relativno niska osjetljivost dovode do potrebe za boljim markerima za ranu dijagnostiku TZST-a.

1.6. Liječenje TZST-a

Liječenje TZST-a počinje s predoperativnom obradom pacijenta pri kojoj se određuje stadij bolesti, a nakon toga slijedi ranije spomenuta radikalna orhidektomija (59). TZST-a imaju tri stadija bolesti. U stadiju I tumor je lokaliziran unutar testisa, kod stadija II tumor se širi u retroperitonealne limfne čvorove a u stadiju III tumor je metastazirao u udaljene organe (60).

Većina pacijenata dolazi na prvi pregled kada je tumor bezbolna masa unutar mošnje testisa, tj. u stadiju I (60). Daljnji koraci obrade pacijenta poduzimaju se sukladno njegovom stadiju bolesti. Ukoliko je bolest u I stadiju, što je većinski slučaj, nakon obavljene orhidektomije nije potrebna daljnja obrada, pa se pacijent samo redovito prati. Pokazalo se da bi u oko 70 % slučajeva kod pacijenata u stadiju I daljnje liječenje nakon obavljene orhidektomije dovelo samo do nuspojava bez poboljšanja prognoze liječenja (55,60). Ukoliko je bolest uznapredovala do stadija s metastazama nakon orhidektomije, tj. stadija II, primjenjuje se kemoterapija bazirana na cisplatinu i/ili radioterapija. Ovisno o indikaciji moguće je u odabranim slučajevima učiniti retroperitonealnu limfadenektomiju (engl. *retroperitoneal lymph node dissection*, RPLND) prije ili nakon kemoterapije (24,61). U stadiju III nakon orhidektomije odmah slijedi liječenje kemoterapijom (24,60,62). Posebnu iznimku predstavlja liječenje pacijenata s visokim brojem metastaza. Naime kod pacijenta s nedijagnosticiranom masom u testisu, razinom β -hCG > 50 000 mIU/mL te visokim brojem metastaza mora se odmah s liječenjem kemoterapijom kako bi se pacijentu osigurala šansa za preživljavanje. Standardni postupci orhidektomije, postavljanja patohistološke dijagnoze te krioprezervacija sjemena odgađaju početak terapije što je u takvim teškim slučajevima neprihvatljivo. Navedeno stanje često je kod pacijenata s KO. Uz liječenje kroz četiri ciklusa kemoterapije prate se vrijednosti STM-a, tj. visina β -hCG (29).

1.7. Nestanična DNA

Nestaničnu slobodnocirkulirajuću DNA (cfDNA) su Mandel i Metai otkrili 1948. godine u ljudskoj krvnoj plazmi te je kroz vrijeme postala jedna od najistraženijih molekula u tekućinskim biopsijama (51,63,64). Potječe iz više izvora od kojih su najznačajniji apoptoza stanica, nekroza stanica te direktna sekrecija iz stanica (65,66). Također, cfDNA se luči tijekom fizioloških procesa (povećano lučenje tijekom trudnoće i vježbanja) te uslijed patoloških stanja, kako malignih (tumori) tako i ne-malignih (upala, oštećenja tkiva) (51,67). Detektirana je u raznim tjelesnim tekućinama uključujući krv, urin, slinu, cerebrospinalnu tekućinu, ejakulat itd. (68-70). Molekula cfDNA je dvolančana te varijabilne duljine od 100 pa do 10 000 pb. Velika većina fragmenata cfDNA je duljine 180 pb, što odgovara duljini DNA u nukleosomu te je rezultat apoptotičkih procesa (64,71-73). Koncentracija cfDNA u krvi zdravih ljudi varira od 1 do 44 ng/mL te je primarno podrijetla iz hematopoietskih stanica (63,68,71,74). U slučaju

bolesti koncentracija cfDNA je povišena, osobito kod onkoloških pacijenata ali i u stanjima sepse, upale, ozljeda itd. (63,75-77). Svojstvo cfDNA je da reflektira genetske i epigenetičke karakteristike svojeg izvorišnog tkiva, poput mutacija i stupnja metilacije DNA (78). To svojstvo čini cfDNA tumorskog podrijetla perspektivnim biomarkerom (79,80). Povećanje količine cfDNA kod pacijenata s tumorima rezultat je povećanja frakcije cfDNA tumorskog podrijetla. Znajući to, razvijene su analitičke metode kako bi se sa što većom sigurnošću detektirala tumorska frakcija cfDNA i njeno povećanje. Najpreciznije i najpouzdanije metode detekcije tumorske frakcije cfDNA su analiza somatskih mutacija cfDNA, analiza strukturnih varijacija cfDNA te analiza epigenetičkih promjena cfDNA (42,81,82). Molekularno profiliranje genetskih varijanti cfDNA je već našlo kliničku primjenu kod raka pluća, dojke i jajnika (83,84) dok je analiza stupnja metilacije cfDNA našla kliničku primjenu kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom (85).

Većina istraživanja cfDNA je rađena na krvi kao izvoru cfDNA iako su studije pokazale da nisu sve tekućine jednako pogodne za istraživanje svih patoloških stanja ili tumora. Krv kao tekućinska biopsija nije se pokazala kao dobar izvor cfDNA za tumore prostate i mozga zbog postojanja krvnomoždane barijere te krvnoprostatne barijere koje smanjuju količinu otpuštene cfDNA tumorskog podrijetla u krvotok (66,86,87). Kako je testis također od općeg krvotoka odvojen barijerom, moguće je da i ova barijera rezultira istim efektom, tj. da krv neće biti prigodan odabir za tekućinsku biopsiju za pacijente s TZST-a (88). Kod tumora prostate sjemena plazma se pokazala kao dobar izvor cfDNA i u njoj je detektirano povećanje količine cfDNA kod pacijenata (75,81,86). Za potrebe ove disertacije i krv i ejakulat bit će istraženi kao izvor cfDNA pacijenata s TZST.

1.8. Metilacija DNA

Metilacija DNA je epigenetička modifikacija, tj. nasljedna promjena koja regulira strukturu kromatina. Kromatin može biti prisutan u obliku rahlog eukromatina koji je povoljan za transkripciju ili zgusnutog metiliranog heterokromatina koji se ne prepisuje, pa metilacija DNA utječe na ekspresiju gena koja nije rezultat promjene u sekvenci DNA za razliku od genetskih modifikacija poput mutacija. Kako je ranije spomenuto, metilacija DNA, modifikacije histona i nekodirajuća RNA su glavni epigenetički mehanizmi, od kojih je metilacija DNA najistraženiji. Promijenjen obrazac metilacije DNA doveden je u vezu s

brojnim patološkim stanjima, osobito tumorima. Naime, promjene u obrascu metilacije DNA povezane s tumorigenezom mogu dovesti do poremećaja i inaktivacije regulatora staničnog ciklusa, apoptotskih mehanizama, mehanizama za popravak DNA i drugih (89,90).

Metilacija DNA je katalitička adicija metilne skupine posredovana enzimom DNA-metiltransferazom (DNMT) s D-adenozilmetionina na ugljikov atom na petoj poziciji citozinskog prstena u CpG dinukleotidu što rezultira u nastanku 5-metil citozina. Enzimi DNMT3a i DNMT3b su zaduženi za *de novo* metilaciju DNA tijekom embrionalnog razvoja, kojom nastaju tkivno specifični obrasci metilacije DNA (91). Metilacija DNA se odnosi na citozine unutar dinukleotidnog CpG slijeda, a oko 80 % sveukupnih CpG mjesta u genomu je metilirano. Ukoliko je genomska regija duža od 200 pb te sadrži visok udio CpG dinukleotida, tj. ukoliko je sadržaj gvanina i citozina u regiji veći od 55 %, ta regija se naziva CpG otokom. To su transkripcijski regulatorni elementi u genomu koji kontroliraju ekspresiju gena te su uključeni u razvoj organizma ili i bolesti. CpG otoci su prisutni u promotorskim regijama kod barem 50 % gena te metilacija unutar njih čini 90 % metilacije DNA (92,93).

Sama metilacija DNA regulira transkripciju tako što njena prisutnost onemogućava pristup transkripcijskih faktora molekuli DNA, što dovodi do izostanka formiranja inicijacijskog transkripcijskog kompleksa. Stupanj metilacije DNA unutar CpG otoka je također bitan za uspostavljanje genetskog utiska (engl. *genomic imprinting*) određenih gena koji se eksprimiraju (prepisuju) jedino s majčinog ili s očevog alela. Nakon nastanka zigote većina gena, posebno onih snažno metiliranog spermija prolazi kroz proces demetilacije DNA. Ipak, u tom procesu demetilacije DNA nema demetilacije utisnutih gena već zaostaje roditeljem (majkom ili ocem) određen obrazac metilacije DNA. Daljnja remetilacija DNA (reprogramiranje metilacije) pokreće diferencijaciju (90,93,94). Kod stanica raka karakteristična je globalna hipometilacija s lokalnom hipermetilacijom DNA u promotorskim regijama tumor supresorskih gena. Globalna hipometilacija aktivira kako protoonkogene tako i općenito proliferacijsku mašineriju stanice (89). Nadalje, metilacija DNA je stabilna modifikacija koja dobro podnosi obradu potrebnu za biomedicinske analize. To ju zajedno s lako dostupnim preciznim analitičkim metodama i pogodnosti svih vrsta biopsija za analize (kako tkivnim tako i tekućih uključujući i nestaničnu DNA) čini vrlo pogodnim kandidatom za biomarker raznih patoloških stanja (51). Dapače, metilacija DNA se u onkologiji zbog njene važnosti u tumorigenezi počela nazivati „univerzalnim biomarkerom tumora“ (95).

1.9. RASSF1A

Gen *RASSF1A* (engl. *Ras association domainfamily 1 isoform A*) je tumor supresorski gen čija inaktivacija je ključan događaj u tumorigenezi brojnih tumora (96). Inaktivacija *RASSF1A* se može dogoditi kroz točkaste mutacije, vezanje proteina p53 na promotorsku regiju gena *RASSF1A*, histonske modifikacije te, najvažnije metilacijom DNA promotorske regije (41,43,96-98). Postoji osam izoformi tog proteina ovisno o alternativnom izrezivanju prilikom njegove sinteze. Izoforme *RASSF1A* i *RASSF1C* su najčešće, prisutne su u svim stanicama, lokaliziraju mikrotubule i reguliraju rast stanica (99).

Gen *RASSF1A* se nalazi na kromosomu 3p21.3, unutar regije podložne brojnim genetskim i epigenetičkim promjenama koje dovode do brojnih patologija i tumora. Gubitak heterozigotnosti je karakterističan za tu regiju (100). Ipak, najistraženiji mehanizam inaktivacije *RASSF1A* je preko metilacije DNA. Gen *RASSF1A* posjeduje dva CpG otoka, otok A i otok C. Otok A je zadužen za regulaciju izoforme A, dok je otok C zadužen za regulaciju izoforme C. Hipermetilacija otoka A dovodi do gubitka ekspresije *RASSF1A* pa dolazi do vezanja *RASSF1C* za efekte *RASSF1A*, što pospješuje tumorigenezu (101,102).

RASSF1A se aktivira mitogenim podražajem te djeluje nizvodno na KRAS i regulira stanični ciklus, apoptozu, proliferaciju i stabilnost mikrotubula (103). *RASSF1C* je uključen u odgovor na oštećenja DNA. Nalazi se usidren na proteinu DAXX (engl. *death domain associated protein*) i lokaliziran je u jezgri. Prilikom oštećenja DNA, protein DAXX se degradira što dovodi do otpuštanja *RASSF1C* iz jezgre u citoplazmu, gdje aktivira JNK signalni put. U tumorigenezi *RASSF1A* ima supresorsku ulogu, a *RASSF1C* djeluje kao protoonkogen (99).

RASSF1A protein je skelni protein koji stvara proteinske komplekse, tj. nema enzimatsku funkciju već svoj biološki utjecaj ostvaruje kroz interakcije s efektorskim proteinima. Skelni proteini imaju optimalne koncentracije pri kojima se omjer skelnih proteina i njihovih efektor podudara, čime se optimizira brzina biokemijskih reakcija. Ukoliko je koncentracija skelnog proteina iznad ili pak ispod optimuma dolazi do suboptimalnih reakcija ili čak inhibicije reakcije, što može rezultirati razvojem patoloških stanja poput, u slučaju *RASSF1A*, kardiovaskularnih bolesti i tumora (104,105). Opisana je smanjena ekspresija *RASSF1A* u tkivu TZST-a (96), a hipermetilacija promotorske regije je opisana kako u tkivu

TZST-a, tako i u punoj krvi pacijenata uključujući i u cfDNA izolirane iz krvi pacijenata s TZST (41,43,105,106).

1.10. *PRSS21*

Gen *PRSS21* se nalazi na kromosomu 16p13.3, unutar regije koja je kod brojnih tumora sklona mutacijama i delecijama. Kodira za protein testisin, serinsku proteazu koja spada u podgrupu tripsinu-nalik serinskih proteaza uz prostasin, murin i pankreasin. One su posttranslacijski modificirane s glikozilfosfatidilinozitolskim membranskim sidrom. Pretežito se nalaze usidrene u plazma membrani, a izlučene se mogu pronaći ukoliko se otpuste sa sidra. *PRSS21* se sastoji od šest egzona te pet introna. CpG otok gena *PRSS21* se sastoji od 50 CpG dinukleotida koji se protežu od promotorske regije do regije inicijacije transkripcije i regije inicijacije translacije. Također kod gena *PRSS21* postoji još regija s 50 CpG dinukleotida koja se proteže od egzona I do egzona III (107,108).

Testisin je u zdravom testisu eksprimiran u stanicama koje prolaze kroz mejozu. Kako je u tkivu TZST-a zapažena supresija testisina pretpostavlja se da on posjeduje tumor supresorski učinak, iako njegova sama fiziološka uloga još nije u potpunosti razjašnjena (109). Taj učinak je potvrđen reaktivacijom ekspresije testisina dodavanjem cDNA u staničnu kulturu čime se usporava rast staničnih linija TZST-a. Istraživanja su pokazala kako je ekspresija gena *PRSS21* pod epigenetičkom kontrolom, točnije modifikacija histona i metilacija DNA su se pokazale glavnim regulatorima ekspresije gena *PRSS21*. Iako, studije su pokazale kako se glavnina regulacije ekspresije gena *PRSS21* odvija mehanizmom metilacije DNA unutar CpG otoka koji se nalazi u promotorskoj regiji gena (107,110).

2. HIPOTEZA

Neseminomski tumori zametnih stanica testisa iskazuju povećanje stupnja metilacije slobodne DNA za gene *RASSF1A* i *PRSS21* u krvi i ejakulatu pacijenata s neseminomskim tumorima testisa.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

OPĆI CILJ:

Utvrđiti mogućnost promjene obrasca metiliranosti cfDNA promotorskih regija gena *RASSF1A* i *PRSS21* u ejakulatu i krvi bolesnika kao biološkog molekularnog biljega neseminoma testisa.

SPECIFIČNI CILJEVI:

- 1.) Prikupiti i usporediti relevantne anamnestičke i ostale kliničke podatke zdravih dobrovoljaca i bolesnika te prikupiti biološke uzorke.
- 2.) Izolirati cfDNA iz uzoraka krvi i ejakulata zdravih dobrovoljaca i bolesnika, te staničnu DNA iz tumorskog tkiva bolesnika najboljim uspostavljenim protokolima.
- 3.) Odrediti i usporediti obrazac i stupanj metiliranosti DNA promotorskih regija gena *RASSF1A* i *PRSS21* zdravih dobrovoljaca i bolesnika.
- 4.) Kvantificirati i usporediti ekspresiju gena *RASSF1A* i *PRSS21* na proteinskoj razini u patohistološkim preparatima tumorskog tkiva bolesnika u komparaciji s okolnim zdravim tkivom te korelirati ekspresiju sa statusom metilacije DNA.
- 5.) Zaključiti o potencijalu stupnja metiliranosti slobodne DNA u krvi, odnosno ejakulatu, kao biomarkeru u bolesnika sa neseminomom testisa.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

Tijekom perioda od 2018. do 2021. godine među pacijentima koji su zbog sumnje na TZST bili podvrgnuti radikalnoj orhidektomiji u Klinikama za urologiju KBC-a Zagreb i KBC-a Sestre milosrdnice te kojima je patohistološkom dijagnostikom utvrđena dijagnoza NSE testisa 27 pacijenata je uključeno u istraživanje. Kriterij za uključivanje u istraživanje je bila sumnja na TZST prema kliničkom protokolu za procjenu bolesnika, koji uključuje „nalaz čvrste opipljive mase unutar skrotuma, nalaz ultrazvuka o intratestikularnoj masi s ili bez povišenih serumskih biljega (AFP, β -HCG, LDH)“. Isključni kriterij je bila svaka patohistološka dijagnoza koja nije uključivala NSE testisa. Za potrebe kontrolne skupine u istraživanje je uključeno 27 muškaraca bez dijagnoze TZST te koji nemaju povijest TZST-a iz opće zdrave populacije.

Svim sudionicima uključenima u istraživanje, prije prikupljanja uzoraka, je objašnjena svrha istraživačkog rada, tajnost njihovih podataka, namjensko korištenje njihovog genetičkog i biološkog materijala te mogućnost svojevrijednog izlaska iz istraživanja u bilo kojem trenutku. Svi uključeni sudionici su potom potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, u sklopu Centra za reproduktivnu i regenerativnu medicinu „Epigenetika tumora zametnih stanica testisa“. Etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Klasa: 643-03-01-18, Broj: 380-59-10106-18-340/4), KBC-a Zagreb (Klasa: 8.1-18/72-2, Broj: 02/21 AG) i KBC-a Sestre milosrdnice (Broj:EP-18327/17-3) izdala su dopusnicu za provođenje istraživanja.

Svim pacijentima su uzeti uzorci krvi i ejakulata prije orhidektomije tj. predoperativni uzorak krvi i ejakulata te su označeni. Zatim u periodu od osam dana do tri mjeseca nakon orhidektomije i prije mogućeg započinjanja kemoterapije, tijekom kontrolnog pregleda u Klinikama za urologiju KBC-a Zagreb i KBC Sestre milosrdnice su uzimani postoperativni uzorci krvi i ejakulata. Zdravim dobrovoljcima, koji su u istraživanju sudjelovali unutar okvira kontrolne skupine, u KBC-u Zagreb i KBC-u Sestre milosrdnice su uzeti uzorci krvi i ejakulata.

Ukupno je za potrebe istraživanja prikupljeno 81 uzoraka krvi, od kojih 27 uzoraka zdravih dobrovoljaca, 27 predoperativnih uzoraka pacijenata s dijagnozom NSE testisa te 27 postoperativnih uzoraka tih istih pacijenata. Također, za potrebe istraživanja od istih sudionika

je prikupljeno 81 uzoraka ejakulata, od kojih 27 uzoraka zdravih dobrovoljaca, 27 predoperativnih uzoraka pacijenata s dijagnozom NSE testisa te 27 postoperativnih uzoraka od tih istih pacijenata.

Prikupljeni su i klinički podaci o dobi pacijenata, veličini tumora i stadiju bolesti prema TNM klasifikaciji.

4.2. Metode

4.2.1. Prikupljanje i obrada uzoraka

Uzimanje periferne venske krvi provelo je stručno medicinsko osoblje poštujući nacionalne preporuke za uzorkovanje venske krvi. 12 mL periferne venske krvi prikupljano je u dvije vakuum epruvete od 6 mL koje su sadržavale antikoagulans K_2EDTA (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH/ Becton Dickinson, NJ, USA). Nakon vađenja, krv je odmah obrađena dvostrukim centrifugiranjem, prvo centrifugiranje na $1.400 \times g$ u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim drugo centrifugiranje na $4.500 \times g$ u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Dvostruko centrifugiranje je rađeno kako bi se dobila nestanična krvna plazma i minimalizirao rizik pucanja krvnih stanica pri obradi te kontaminacija s njihovom genomskom DNA.

Uzorci ejakulata su prikupljeni nakon perioda seksualne apstinencije od tri do pet dana, masturbacijom u sterilnu čašicu za urin. Uzorci ejakulata su prvo ostavljeni sat vremena na sobnoj temperaturi kako bi se likveficirali, zatim su obrađivani trostrukim centrifugiranjem, prvo centrifugiranje na $400 \times g$ u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi zatim drugo centrifugiranje na $12.000 \times g$ u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi i konačno treće centrifugiranje na $20.000 \times g$ u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Trostruko centrifugiranje je rađeno kako bi se dobila nestanična sjemena plazma i minimalizirao rizik pucanja stanica pri obradi te kontaminacija s njihovom genomskom DNA, kao i eliminirali raspadnuti dijelovi stanica i ostali detritus koji može smetati tijekom daljnje obrade uzoraka.

Svi uzorci krvne i sjemene plazme pohranjeni su na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje obrade.

4.2.2. Prikupljanje i obrada tumorskog tkiva

Tkivo NSE testisa dobiveno orhidektomijom obrađeno je prema standardnoj histološkoj metodi u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb i u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ KBC-a Sestre Milosrdnice. Obrada uključuje 24-satnu fiksaciju u 10 % puferiranom formalinu, zatim slijedi dehidracija tkiva u etilnom alkoholu rastućih koncentracija (70 %, 80 %, 96 % i 100 %) u trajanju po 1 sat u svakoj koncentraciji. Tkivo je zatim stavljeno u ksilol na 30 minuta i onda prebačeno u čisti ksilol na 30 minuta te zatim uklopljeno u tekućem parafinu na +60 °C. Blokovi su potom hlađeni na +4 °C. Nakon hlađenja, parafinski blokovi pacijenata s NSE testisa su priređeni za potrebe daljnjih analiza. Blokovi pacijenata s NSE testisa su na kliznom mikrotomu narezani kako bi se dobili parafinski rezovi tkiva debljine 4 µm za potrebe histoloških i imunohistokemijskih metoda i na rezove tkiva debljine 10 µm za potrebe izolacije genomske DNA koji su zatim fiksirani na silanizirana predmetna stakalca zagrijavanjem na +37 °C 30 minuta.

Po jedan rez svakog bloka je obojan hemalaun-eozin (HE) metodom. Rezovi su prvo inkubirani u termostatu na +55 °C kroz 60 minuta, zatim su deparafinirani u ksilolu I kroz 10 minuta i u ksilolu II kroz 10 minuta. Rezovi su potom rehidrirani u nizu etilnog alkohola u sljedećim uvjetima: 100 % etilni alkohol I kroz 5 minuta, 100 % etilni alkohol II kroz 5 minuta, 96 % etilni alkohol I kroz 5 minuta, 96 % etilni alkohol II kroz 5 minuta, 70 % etilni alkohol kroz 5 minuta i na kraju kroz 5 minuta u destiliranoj vodi. Rezovi su zatim inkubirani u hemalaunu kroz 50 sekundi te su isprani prvo u destiliranoj vodi, zatim u vodovodnoj vodi kroz 5 minuta i potom opet u destiliranoj vodi kroz 5 minuta. Rezovi su potom inkubirani u eozinu kroz 40 sekundi, nakon čega su dehidrirani u sljedećem nizu: 70 % etilni alkohol I kroz 5 sekundi, 70 % etilni alkohol II kroz 5 sekundi, 96 % etilni alkohol I kroz 5 sekundi, 96 % etilni alkohol II kroz 5 sekundi, 100 % etilni alkohol I kroz 30 sekundi i 100 % etilni alkohol II kroz 30 sekundi. Rezovi su potom inkubirani u ksilolu I kroz 30 sekundi, u ksilolu II kroz 30 sekundi i zatim u ksilolu III kroz 15 minuta nakon čega su uklopljeni u sintetičku smolu (BioMount DPX Low, BioGnost, Hrvatska) i pokriveni pokrovnicom.

Tako dobivene HE preparati analizirao je klinički patolog pod svjetlosnim mikroskopom na povećanju x 100 i x 400, s ciljem analize morfološke građe tkiva, identifikacije prisutnih komponenti i označivanja NSE tkiva i okolnog zdravog tkiva. Okolno zdravo tkivo je definirano kao sjemeni kanalići s održanom spermatogenezom.

4.2.3. Imunohistokemijsko bojenje

Rezovi tkiva testisa pacijenata s NSE na predmetnim stakalcima inkubirani su u termostatu na +55 °C kroz 60 minuta, zatim su deparafinizirani u ksilolu I kroz 10 minuta i u ksilolu II kroz 10 minuta. Rezovi su potom rehidrirani u nizu etilnog alkohola u sljedećim uvjetima: 100 % etilni alkohol I kroz 5 minuta, 100 % etilni alkohol II kroz 5 minuta, 96 % etilni alkohol I kroz 5 minuta, 96 % etilni alkohol II kroz 5 minuta, 70 % etilni alkohol kroz 5 minuta i na kraju kroz 5 minuta u destiliranoj vodi. Idući korak je bio otkrivanje antigena što je postignuto inkubacijom na +99 °C u trajanju od 60 minuta u Tris-EDTA puferu (pH 9, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.05 % Tween 20). Nakon inkubacije uslijedilo je hlađenje u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi i zatim ispiranje u Tris puferiranoj otopini (TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) u trajanju od 5 minuta. Tkiva su potom opcertana PAP markerom, kako bi se otopine predviđene protokolom zadržale na tkivu. Korak blokiranja je izveden inkubacijom od 20 minuta na sobnoj temperaturi s 5 % goveđim serumskim albuminom (engl. *bovine serum albumin*, BSA, Sigma-Aldrich, SAD) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Zatim je BSA uklonjen i naneseo je primarno protutijelo (anti-RASSF1, HPA040735, Atlas Antibodies; anti-PRSS21, HPA008477, Atlas Antibodies) razrijeđeno u otopini 0.1 % Tween 20, 1 % BSA i 1X TBS u odnosu 1:225 za anti-RASSF1 i 1:100 za anti-PRSS21. Tkiva s nanesenim primarnim protutijelima su inkubirana na +4 °C preko noći. Idućeg dana otopine primarnih protutijela s tkiva su isprane u TBS-u pet puta po 5 minuta na miješalici. Kako bi se inaktivirale endogene peroksidaze koje mogu stvoriti nespecifičan signal, na tkiva je naneseo otopina 3 % H₂O₂ i tkiva su tako inkubirana tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Tkiva su zatim isprana tri puta po 5 minuta u otopini TBS-a. Na tkiva je potom naneseo otopina sekundarnog protutijela (Dako REAL EnVision Detection System, K5007, Agilent Technologies, Njemačka), što je inkubirano 60 minuta u termostatu na +37 °C. Tkiva su potom isprana u TBS-u tri puta po 5 minuta. Kako bi se vizualizirala reakcija antigen-protutijelo na tkiva je potom naneseo otopina 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorida (DAB, Dako REAL EnVision Detection System, K5007, Agilent Technologies, Njemačka) u trajanju od 6 minuta. DAB je potom ispiran s tkiva u destiliranoj vodi 5 minuta. Tkiva su potom obojana hemalaunom (BioGnost, Hrvatska) u trajanju od 10 sekundi, radi dobivanja kontrastnog obojenja. Tkiva su potom isprana destiliranom vodom, zatim vodovodnom vodom u trajanju od 8 minuta i zatim destiliranom vodom u trajanju 5 minuta. Slijedila je dehidracija tkiva u otopinama etilnog alkohola: 70 % etilni alkohol kroz 1 minutu, 96 % etilni alkohol kroz 1

minutu, 100 % etilni alkohol I kroz 1 minutu, 100 % etilni alkohol II kroz 2 minute. Zatim su tkiva inkubirana u ksilolu I kroz 5 minuta i zatim u ksilolu II kroz 5 minuta. Tkiva su potom uklopljena u sintetičku smolu (BioMount DPX Low, BioGnost, Hrvatska) i pokrivena pokrovnicom.

Pri svakoj izvedbi imunohistokemijskog bojanja korištene su odgovarajuće pozitivne kontrole (debelo crijevo za anti-RASSF1 i testis za anti-PRSS21) i negativne kontrole (karcinom bubrega za anti-RASSF1 i debelo crijevo za anti-PRSS21).

4.2.4. Morfološka analiza imunohistokemijske reakcije

Morfološka analiza imunohistokemijske reakcije na tkivima pacijenata s NSE testisa provedena je od strane dva nezavisna klinička patologa koristeći svjetlosni mikroskop (Olympus, Bx51) pod povećanjem x 40 za određivanje traženog područja i x 400 za samu analizu.

Pozitivnim signalom smatrano je smeđe obojanje u citoplazmi. Kvantificiran je postotak imunohistokemijske reakcije (postotak komponente s pozitivnim signalom, 0 % - 100 %) i intenzitet imunohistokemijske reakcije (0 - nema reakcije, 1 - blaga reakcija, 2 - umjerena reakcija i 3 - snažna reakcija). Umnoškom postotka i intenziteta reakcije je dobivena H mjera sa skalom od 0 do 300, koja predstavlja ekspresiju gena na proteinskoj razini. H mjera je izračunata za sve prisutne tumorske i netumorske komponente tkiva.

4.2.5. Izolacija gDNA iz parafinskih blokova tkiva

Iz tri prethodno pripremljena reza tkiva pacijenata s NSE testisa debljine 10 µm izolirana je genomska DNA (gDNA). Korišten je protokol razvijen od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*) u suradnji s Medicinskim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu (111). Rezovi tkiva testisa NSE pacijenata na predmetnim stakalcima inkubirana su u termostatu na +55 °C, kroz 60 minuta, zatim su deparafinizirani u ksilolu I kroz 10 minuta i u ksilolu II kroz 10 minuta. Rezovi su potom rehidrirani u nizu etilnog alkohola u sljedećim uvjetima: 100 % etilni alkohol I kroz 5 minuta, 100 % etilni alkohol II kroz 5 minuta, 96 % etilni alkohol I kroz 5 minuta, 96 % etilni alkohol II kroz 5 minuta, 70 % etilni alkohol kroz 5 minuta, destilirana voda kroz 5 minuta i na kraju su prebačeni u TBS u kojem su inkubirani 72 sata na sobnoj temperaturi.

Prema HE preparatima na kojima su klinički patolozi označili dijelove tkiva na kojima je NSE i na kojima je OZD su disecirani OZT i NSE tkivo. Sterilnim skalpelom su tkiva sastrugana i odvojeno stavljena u plastične tubice od 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka) u koje je prethodno stavljeno 500 μ L TES pufera (50 mM Tris-HCl pH8; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl). U tubice je dodano 100 μ L proteinaze K i zatim su uzorci stavljeni na termoblok na +56 °C preko noći kako bi se izolirala DNA iz tkiva. Zatim je u uzorke dodano 200 μ L 6 M NaCl kako bi se pročistili uzorci od proteina. Uzorci su na termobloku na sobnoj temperaturi treseni pet minuta i zatim centrifugirani na 13.000 rpm (engl. *revolutions per minute*) u trajanju od 10 minuta. Dobiveni supernatant je prebačen u novu plastičnu tubicu od 1,5 mL u koju je dodan jednak volumen izopropanola. Uzorci su zatim protreseni na termobloku pri sobnoj temperaturi u trajanju dvije minute i centrifugirani na 13.000 rpm u trajanju 15 minuta kako bi se istaložio DNA. Pažljivo je odbačen supernatant te je u tubicu dodan 1 mL 70 % etilnog alkohola što je vorteksirano kroz 10 sekundi i zatim centrifugirano na 13.000 rpm u trajanju 15 minuta kako bi se isprao talog DNA. Supernatant je pažljivo odbačen i otvorene tubice su stavljene na termoblok na +56 °C kroz 30 minuta kako bi se talog potpuno osušio. U tubice je potom dodano 100 μ L TE pufera i zatim su uzorci stavljeni u termoblok na 40 °C u trajanju 60 minuta kako bi se istaložen DNA u potpunosti otopio. Pomoću spektrofotometra Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, SAD) je izmjerena koncentracija i čistoća izoliranog DNA u triplikatu, izražena kao prosječna vrijednost triplikata.

4.2.6. Izolacija i kvantifikacija cfDNA iz krvne i sjemene plazme

Za potrebe izolacije cfDNA iz uzoraka krvne i sjemene plazme korišten je *NucleoSnap cfDNA* kit (Macherey-Nagel, Njemačka) po uputama proizvođača uz modifikaciju da je korištena duplo veća količina proteinaze K te da je inkubacija trajala preko noći. Modifikacije su uvedene tijekom ranije optimizacije protokola radi optimiziranja izolacije cfDNA (51).

Uzorci plazme su prebačeni u plastične tube od 50 mL (Eppendorf, Njemačka) te je za svaki mL plazme dodano 30 μ L proteinaze K. Uzorak je lagano promiješan i ostavljen na sobnoj temperaturi 5 minuta. U plastične tube je zatim za svaki mL plazme dodan jedan mL pufera VL. Uzorak je zatim vorteksiran kroz 20 sekundi. Uzorci su stavljeni na termoblok na +50 °C preko noći. U plastične tube je za svaki mL plazme dodan jedan mL 100 % etilnog alkohola te su uzorci vorteksirani kroz 10 sekundi. Za vrijeme inkubacije uzoraka na sobnoj temperaturi

sastavljena je usisna stanica (*QIAvac 24 Plus* vakuum stanica, Qiagen, Njemačka; *VacValves*, Qiagen, Njemačka) te su na nju montirane kolone za pročišćavanje cfDNA. Na kolone je nanoseno 500 μ L *column conditioner-a* i provučeno pod tlakom, kako bi se cfDNA što uspješnije vezala za kolone. Dvije minute nakon prolaska *column conditioner* kroz kolone, dodani su uzorci iz plastičnih tuba na kolone te su provučeni pod tlakom. Na kolone je zatim prvo dodano 1 mL pufera VW1 i provučeno je pod tlakom, pa onda i 500 μ L pufera WB te je provučeno pod tlakom, oboje kako bi se s kolone uklonile nečistoće i ostala vezana samo cfDNA. Kolone su zatim skinute s usisne stanice i prebačene u kolekcijske tubice i centrifugirane na 20 000 x g tri minute kako bi zaostala tekućina bila uklonjena s kolone. Kolone su potom prebačene u nove plastične tubice od 1,5 mL (Ependorf, Njemačka) te je na membrane kolona dodano 50 μ L pufera za eluciju i inkubirano tri minute na sobnoj temperaturi. Kolone su potom centrifugirane na 20.000 x g jednu minutu, korak elucije je ponovljen još jednom, pa je krajnji volumen elutirane cfDNA bio 100 μ L. Izolirana cfDNA je pohranjena na -80 °C do daljnjih analiza.

Za kvantifikaciju uzoraka cfDNA korištena je metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze (engl. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) koristeći kit kemikalija SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Njemačka) po uputama proizvođača te početnice za umnažanje fragmenta repetitivne (ponavljajuće) regije DNA *LINE-1*.

Reakcijska smjesa je napravljena po tablici 1, a 19 μ L je stavljeno u jažice ploče s 96 jažica (Bio-Rad, Njemačka). Po 1 μ L eluirane cfDNA pojedinog uzorka je stavljen u svaku jažicu, s time da je svaki uzorak analiziran u triplikatu. Uz uzorke je također korišten komercijalni DNA standard (Promega, SAD), serijski diluiran (150 ng, 15 ng, 1,5 ng, 0,15 ng, 0,015 ng i samo pufer) u TE puferu za potrebe apsolutne kvantifikacije. Dobivene koncentracije su analizirane u CFX Maestro računalnom programu (Bio-Rad, Njemačka).

Tablica 1. Početnice za analizu koncentracije cfDNA i uvjeti kvantitativne lančane reakcije polimeraze. Tablica prikazuje komponente qPCR reakcijske smjese i njene uvjete. F - forward početnica, R - reverse početnica.

Gen	Komponente	Volumen (μL)
Line-1	Supermix	10
	F početnica 250 nM	0.5
	R početnica 250 nM	0.5
	miliQ voda	8

Ciklusi	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Aktivacija polimeraze	98 °C	3 minute	1
Denaturacija	98 °C	10 sekundi	40
Prijanjanje/ekstenzija + očitavanje	60 °C	30 sekundi	

4.2.7. Bisulfitna konverzija izolirane gDNA i cfDNA

Za potrebe analize metilacije DNA metodom pirosekvenciranja izolirana gDNA i cfDNA morala je biti bisulfitno konvertirana, kako bi se nemetilirani citozini pretvorili u uracile a metilirani citozini ostali nepromijenjeni. Korišten je EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača.

U PCR tubice (Isolab, Španjolska) je dodana voda bez RNaza (engl. *RNase free water*), uzorak izolirane DNA i DNA zaštitni pufer (engl. *DNA protect buffer*). Najveća količina DNA pojedinog uzorka koja je stavljena u reakciju bisulfitne konverzije bila je 500 ng. Ta količina od 500 ng DNA je odabrana sukladno uputama proizvođača kako bi bili sigurni da je sva DNA u reakciji bila bisulfitno konvertirana. PRC tubice su zatim vorteksirane, centrifugirane i stavljene u uređaj C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Njemačka). Reakcija je pokrenuta prema sljedećim uvjetima: denaturacija kroz 5 minuta na +95 °C, inkubacija kroz 25 minuta na +60 °C, denaturacija kroz 5 minuta na +95 °C, inkubacija kroz 85 minuta na +60 °C, denaturacija kroz 5 minuta na +95 °C, inkubacija kroz 175 minuta na +60 °C te hlađenje na +20 °C do započinjanja pročišćavanja. Pri završetku reakcije uzorci su vorteksirani i centrifugirani te prebačeni u nove tubice od 1,5 mL. Uzorcima je potom dodano 310 μL BL pufera u koji je bila dodana *carrier RNA*, kako bi poboljšala vezanje DNA na kolone. Uzorcima

je potom dodano 250 μ L 100 % etilnog alkohola te su vorteksirani kroz 10 sekundi i kratko centrifugirani. Uzorci su potom prebačeni u kolone umetnute u koleksijske tubice te centrifugirani na 20.000 x g kroz jednu minutu. Filtrat je izbačen iz koleksijskih tubica te je napravljen korak čišćenja dodavanjem 500 μ L pufera BW na kolone, centrifugiranja na 20.000 x g kroz jednu minutu i odbacivanja filtrata. Desulfonacijski pufer BD je zatim dodan u kolone te je inkubiran na sobnoj temperaturi 15 minuta nakon čega je centrifugirano na 20.000 x g kroz jednu minutu. Zatim je dvaput napravljen korak čišćenja dodavanjem 500 μ L pufera BW na kolone, centrifugiranja na 20.000 x g kroz jednu minutu i odbacivanja filtrata. Na kolone je dodano 250 μ L 100 % etilnog alkohola te su kolone centrifugirane na 20.000 x g kroz jednu minutu i odbačen je filtrat. Kolone su potom prebačene u nove kolekcije tubice i centrifugirane na 20 000 x g kroz jednu minutu, kako bi zaostala tekućina bila uklonjena s kolone. Kolone su zatim prebačene u nove tubice od 1,5 mL i na njih je dodano 20 μ L elucijskog pufera, koji je ostavljen jednu minutu na sobnoj temperaturi. Potom su uzorci centrifugirani na 15.000 x g kroz jednu minutu. Eluirani bisulfitno konvertirani uzorci su zatim pohranjeni na -80 °C do daljnjih analiza.

4.2.8. Početnice za PCR i pirosekvenciranje

Početnice za umnažanje fragmenata *RASSF1A* lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) i sekvenciranje metodom pirosekvenciranja pronađene su pregledom literature, dok su početnice za *PRSS21* dizajnirane *de novo*. Sekvence početnica, analizirana regija, broj analiziranih CpG mjesta i dužina umnoženog fragmenta prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Početnice za analizu metilacije DNA gena *RASSF1A* i *PRSS21* u ovoj studiji. Tablica prikazuje početnice i njihove sekvence, analiziranu sekvencu te broj CpG mjesta. F - *forward* početnica, R - *reverse* početnica, Seq - početnica za sekvenciranje.

Gen	Početnica	Sekvenca početnice	CpG mjesta
<i>RASSF1A</i>	F	5'-AGTTTGGATTTTGGGGGAGG-3'	9
	R	biotin-5'-CAACTCAATAAACTCAAACCTCCCC-3'	
	Seq	5'-GGGTTAGTTTGTGGTTT-3'	
	Analizirana sekvenca	5'- YGTTYGGTTYGYGTTTGTTAGYGTAAAGTT AGYGAAGTAYGGGTTTAATYGGGTTATGTYG -3'	
<i>PRSS21</i>	F	5'-GTAGATAAGAAAGGGATTGTG-3'	3
	R	5'-CCCAAAAACCTATTTAAAACCTCTCAT-3'	
	Seq	5'-GGATTGTGGGGTTTA-3'	
	Analizirana sekvenca	5'-TYGGGTTTGG GTTATATTAA GAAGTGTGGT TGAAGATTYG TTTTAGGGG TTGAAAGTTA GGGYGTTGTT AGGTATGAGA GGTTTTAAA-3'	

PCR početnice optimizirane su na uzorcima najmanje i najveće koncentracije eluirane bisulfitno konvertirane DNA uzoraka, za 1 µL eluiranog uzorka po reakciji. Temperatura vezanja početnica optimizirana je gradijentnim PCR-om u rasponu temperatura od +56 °C do +65 °C i vizualizacijom PCR produkta gel elektroforezom. 5 µL optimizacijskog uzorka različitih temperatura prijanjanja i DNA standard (SimplyLoad™ 100 pb DNA Ladder, Lonza, Švicarska) nanoseni su na 2 %-tni agarozni gel s dodatkom otopine boje za vezanje na DNA (GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain, Lonza, Švicarska) u 1 x TAE puferu (Tris-acetat-EDTA), pod naponom od 80 V u trajanju od 10 minuta i zatim od 120 V u trajanju od 30 minuta. Pri završetku gel-elektroforeze, vizualiziran je gel na UV transiluminatoru i uspoređena je veličina dobivenih fragmenata s DNA standardom, kao i intenzitet fragmenata. Optimizirani uvjeti PCR reakcija prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Optimizirani uvjeti PCR reakcija za amplificiranje fragmenata gena *RASSF1A* i *PRSS21* za analizu metilacije DNA metodom pirosekvenciranja. Tablica prikazuje komponente s odgovarajućim volumenima te temperaturu prijanjanja i broj ciklusa same PCR reakcije.

Gen	Komponente	Volumen (μL)	Temperatura prijanjanja (°C)	Broj ciklusa
<i>RASSF1A</i>	Master Mix	12,5	+65	50
	CoralLoad	2,5		
	MgCl ₂	1		
	F početnica 10 μM	0,5		
	R početnica 10 μM	0,5		
	Uzorak DNA	1		
	miliQ voda	7		
<i>PRSS21</i>	Master Mix	12,5	+56	50
	CoralLoad	2,5		
	F početnica 10 μM	0,5		
	R početnica 10 μM	0,5		
	Uzorak DNA	1		
	miliQ voda	8		

4.2.9. PCR (lančana reakcija polimerazom)

Bisulfitno konvertiranim uzorcima DNA PCR reakcijom umnoženi su fragmenti *RASSF1A* i *PRSS21*. Za PCR reakcije korišten je kit kemikalija PyroMark® PCR kit (Qiagen, Njemačka), prema uputama proizvođača i sukladno prethodno navedenim optimiziranim protokolima. DNA komercijalnih bisulfitno konvertiranih potpuno metiliranih i nemetiliranih kontrola (EpiTect PCR Control DNA Set, Qiagen, Njemačka) je također umnožena PCR reakcijama, za potrebe kontrole kvalitete pirosekvenciranja.

Za potrebe PCR reakcija korišten je uređaj C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Njemačka). Svi uzorci pri završetku PCR reakcije i prije analize pirosekvenciranjem pohranjeni su na +4 °C maksimalno do 5 dana.

4.2.10. Pirosekvenciranje

Za potrebe analize metilacije gDNA i cfDNA pirosekvenciranjem, korišten je uređaj Pyromark Q24 Advanced (Qiagen, Njemačka), računalni program PyroMark Q24 Advanced Software (Qiagen, Njemačka) i kemikalije PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen, Njemačka) sukladno uputama proizvođača.

Koristeći PyroMark Q24 Advanced Software i prema sekvencama za analizu, konstruirani su esaji za pirosekvenciranje gena *RASSF1A* i *PRSS21*, koji određuju redosljed dispenzacije nukleotida unutar reakcije pirosekvenciranja.

Sukladno uputama proizvođača, svi uređaji potrebni za pirosekvenciranje su upaljeni 30 minuta prije početka rada, dok su kemikalije inkubirane kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi prije početka rada. Radna postaja PyroMark® Q24 Vacuum Workstation je pripremljena, napunjene su posudice 70 %-tnim etilnim alkoholom, destiliranom vodom te proizvođačevom denuracijskom otopinom (engl. *denaturation buffer*) i puferom za ispiranje (engl. *wash buffer*). Pripremljena je otopina za vezanje DNA, koja sadrži streptavidinom obložene sefarozne kuglice (Streptavidin Sepharose® High Performance, GE Healthcare, Švedska) te reakcijska smjesa za pirosekvenciranje (Tablica 4).

Tablica 4. Komponente i volumeni otopine za vezanje biotiniliranog PCR produkta na sefarozne kuglice te reakcijske smjese za pirosekvenciranje.

Smjesa	Komponente	Volumen (μL)
Otopina za vezanje DNA	Sefarozne kuglice	1
	Pufer za vezanje	40
	miliQ voda	19
	PCR produkt	20
Reakcijska smjesa za pirosekvenciranje	Pufer za prijanjanje	19,25
	početnice za sekvenciranje	0,75

60 μL otopine za vezanje DNA dodano je u jažice PCR ploče s 24 jažice (Eppendorf, Njemačka), zatim je dodano 20 μL PCR produkta. PCR ploča je potom zatvorena samoljepljivom folijom i stavljena na treskalicu na 1.400 rpm kroz 10 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi se omogućilo vezanje PCR produkata na sefarozne kuglice. Zatim je prema

uputama proizvođača pripremljen spremnik za pirosekvenciranje (PyroMark® Q24 Cartridge, Qiagen, Njemačka) dodavanjem otopina enzima (DNA polimeraze, ATP sulfurilaze, luciferaze i apiraze), supstrata (adenozin 5' fosfosulfat i luciferin) i nukleotida, s volumenima prema ranije spomenutim esejima. Jažicama PyroMark Q24 ploče je dodano 20 µL reakcijske smjese za pirosekvenciranje. Dovršetkom trešnje PCR ploče s PCR produktom prebačena je na radnu postaju te su pomoću sonda pod tlakom provučeni uzorci tijekom 30 sekundi. Sonde na vrškovima sadrže filtere koji onemogućavaju prolazak sefarnih kuglica a vakuum ih drži na sondama, što omogućava pročišćavanje PCR produkta provlačenjem kroz zadani niz: 70 % etilni alkohol kroz 5 sekundi (ispiranje nevezanih DNA koje nisu biotinizirani), denaturacijski pufer kroz 5 sekundi (razdvajanje lanaca DNA, samo biotinizirani lanac ostaje vezan za sefarnu kuglicu) pufer za ispiranje kroz 10 sekundi te držanje sonde u okomitom položaju kroz 5 sekundi kako bi se riješila zaostala tekućina u sondama. Nakon završetka niza, sonde su pozicionirane iznad ploče za pirosekvenciranje te je ugašen vakuum, što je omogućilo da laganim treskanjem PCR produkt vezan za sefarnu kuglicu padne u pripadajuće jažice. Ploča za pirosekvenciranje je grijana na +80 °C u trajanju od 5 minuta te je nakon toga prebačena u pirosekvencer gdje je pokrenuta reakcija.

4.2.11. Analiza podataka dobivenih pirosekvenciranjem

Pri završetku pirosekvenciranja u računalnom programu PyroMark Q24 Advanced Software (Qiagen, Njemačka) su analizirani dobiveni pirogrami. Svi uzorci s intenzitetom svjetlosnog signala većim od 150 RLU (engl. *relative light units*) su odabrani kao važeći. Za svako CpG mjesto je dobiven postotak metilacije DNA. Rezultati pirosekvenciranja su eksportirani u Microsoft Excel (Microsoft, SAD) za daljnju statističku obradu.

4.2.12. Statistička obrada podataka

D'Agostino-Pearson-ov test normalnosti je korišten kako bi se provjerila distribucija rezultata. Kako su rezultati ispali neparametrijski, za daljnje statističke obrade korištene su neparametrijske metode.

Mann-Whitney test (engl. *Mann Whitney U test*) i Kruskal-Wallis-ov test s Dunn-ovim testom višestrukih usporedbi (engl. *Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test*) su korišteni za statističku obradu morfometrijske analize imunohistokemijskog bojanja. Rezultati su smatrani statistički značajnima kada je $p < 0,05$.

Mann-Whitney test i Kruskal-Wallis-ov test s Dunn-ovim testom višestrukih usporedbi su korišteni za statističku obradu skupina s neuparenim uzorcima, dok je Wilcoxon-ov test uparenih rangova (engl. *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*) korišten za obradu skupina s uparenim uzorcima. Rezultati su smatrani statistički značajnima kada je $p < 0,05$.

Sperman-ov neparametrijski koeficijent korelacije (engl. *Spearman's rank correlation coefficient*) je korišten za izračun korelacija. Rezultati su smatrani statistički značajnima kada je $p < 0,05$.

Osjetljivost i specifičnost su analizirane krivuljom operativnih karakteristika (engl. *receiver operating characteristic curve*, ROC).

5. REZULTATI

5.1. Pacijenti i dobrovoljci

Srednja dob pacijenata s NSE testisa je bila 30 (raspon 19 - 42) godina, dok je srednja dob zdravih dobrovoljaca (ZD) bila 26 (raspon 21 - 33) godina. Dobi su prikazane u tablici 4. Prema TNM klasifikaciji, u 13 od 27 (48 %) pacijenata je stadij dijagnosticiran kao T1NxMx, u 10 od 27 (37 %) pacijenata je stadij dijagnosticiran kao T2NxMx i 4 od 27 (15 %) pacijenata je stadij dijagnosticiran kao T3NxMx.

Od 27 pacijenata s NSE testisa 18 (67 %) ih je imalo tumor na lijevom testisu, dok je preostalih 9 (33 %) pacijenata imalo tumor na desnom testisu. Prosječna veličina tumora je bila promjera 2.9 (raspon 1 - 7) cm (Tablica 5).

Od 27 pacijenata s NSE sedam ih je imalo čistu formu EK, dva su imala čistu formu TE dok ih je kod 18 bio prisutan MTZST. Kod 18 pacijenata s dijagnozom MTZST utvrđeno je 13 komponenti EK, 10 komponenti TE, 7 komponenti TŽV te 12 komponenti SE (Tablica 5).

Tablica 5. Kliničkopatološki podaci pacijenata uključenih u studiju.

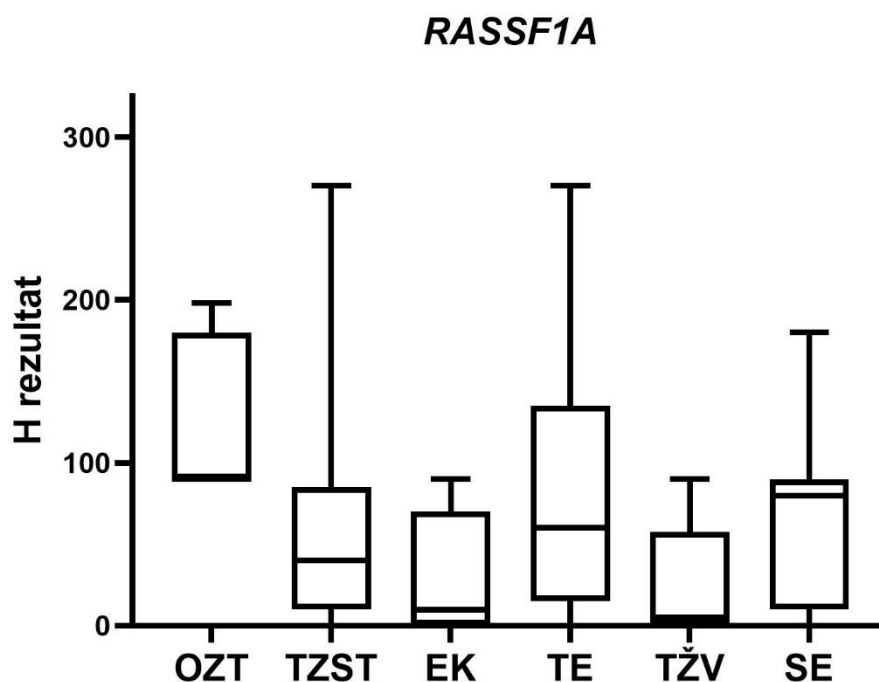
Kliničkopatološki parametri	NSE pacijenti (n=27)	Zdravi dobrovoljci (n=27)
Prosječna dob, godine (raspon)	30 (19-42)	26 (21-33)
TNM klasifikacija		
T1NxMx	13	
T2NxMx	10	
T3NxMx	4	
Karakteristike tumora		
Desni testis	9	
Lijevi testis	18	
Prosječna veličina, cm (raspon)	2,9 (1-7)	
Dijagnoza		
EK	7	
TE	2	
MTZST	18	

5.2. Ekspresija gena *RASSF1A* i *PRSS21* na proteinskoj razini u tkivu

5.2.1. Ekspresija gena *RASSF1A*

Analiza imunohistokemijske reakcije u komponentama NSE i OZT je prikazana koristeći H mjeru.

Ekspresija gena *RASSF1A* na proteinskoj razini smanjena je u komponentama TZST u odnosu na OZT. Najmanje smanjenje ekspresije je pokazano kod komponenti TE i SE, a najveće i statistički značajno kod komponenti EK i TŽV (Slika 4). Statistički značajne razlike su prikazane u tablici 6.



Slika 4. Ekspresija gena *RASSF1A* na razini proteina u tkivu pacijenata s ne seminomom testisa te okolnom zdravom tkivu, prikazana H mjerom. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. OZT - tkivo testisa s očuvanom spermatogenezom, TZST - tumor zametnih stanica testisa, EK - komponenta embrionalnog karcinoma, TE - komponenta teratoma, TŽV - komponenta tumora žumanjčane vreće, SE - komponenta seminoma.

Tablica 6. Statistička analiza ekspresije gena *RASSF1A* na razini proteina. Tablica prikazuje tip testa koji je korišten, uspoređivane grupe te statističku značajnost. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (** označava p-vrijednost $\leq 0,01$, *** označava p-vrijednost $\leq 0,001$, **** označava p-vrijednost $\leq 0,0001$). OZT - tkivo testisa s očuvanom spermatogenezom, TZST - tumor zametnih stanica testisa, EK - komponenta embrionalnog karcinoma, TŽV - komponenta tumora žumanjčane vreće.

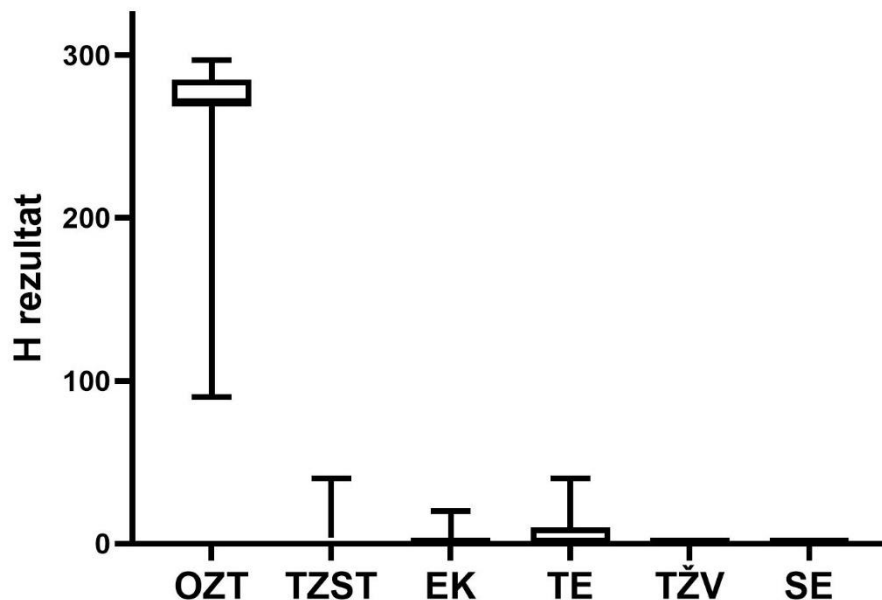
Wilcoxon-ov test uparenih rangova	P vrijednost
OZT vs. TZST	**

Dunn-ov test višestrukih usporedbi	P vrijednost
EK vs. OZT	****
TŽV vs. OZT	***

5.2.2. Ekspresija gena *PRSS21*

Ekspresija gena *PRSS21* na proteinskoj razini je statistički značajno smanjena kod svih komponenta TZST-a naspram OZT (Slika 5). Statistički značajne razlike su prikazane u tablici 7.

PRSS21



Slika 5. Ekspresija gena *PRSS21* na razini proteina u tkivu pacijenata s ne seminomom testisa te okolnom zdravom tkivu, prikazana H mjerom. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. OZT - tkivo testisa s očuvanom spermatogenezom, TZST - tumor zametnih stanica testisa, EK - komponenta embrionalnog karcinoma, TE - komponenta teratoma, TŽV - komponenta tumora žumanjčane vrće, SE - komponenta seminoma.

Tablica 7. Statistička analiza ekspresije gena *PRSS21* na razini proteina. Tablica prikazuje tip testa koji je korišten, uspoređivane grupe te statističku značajnost. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (***) označava p-vrijednost $\leq 0,001$, **** označava p-vrijednost $\leq 0,0001$). OZT - tkivo testisa s očuvanom spermatogenezom, TZST - tumor zametnih stanica testisa, EK - komponenta embrionalnog karcinoma, TE - komponenta teratoma, TŽV - komponenta tumora žumanjčane vreće, SE - komponenta seminoma.

Wilcoxon-ov test uparenih rangova	P vrijednost
OZT vs. TZST	****

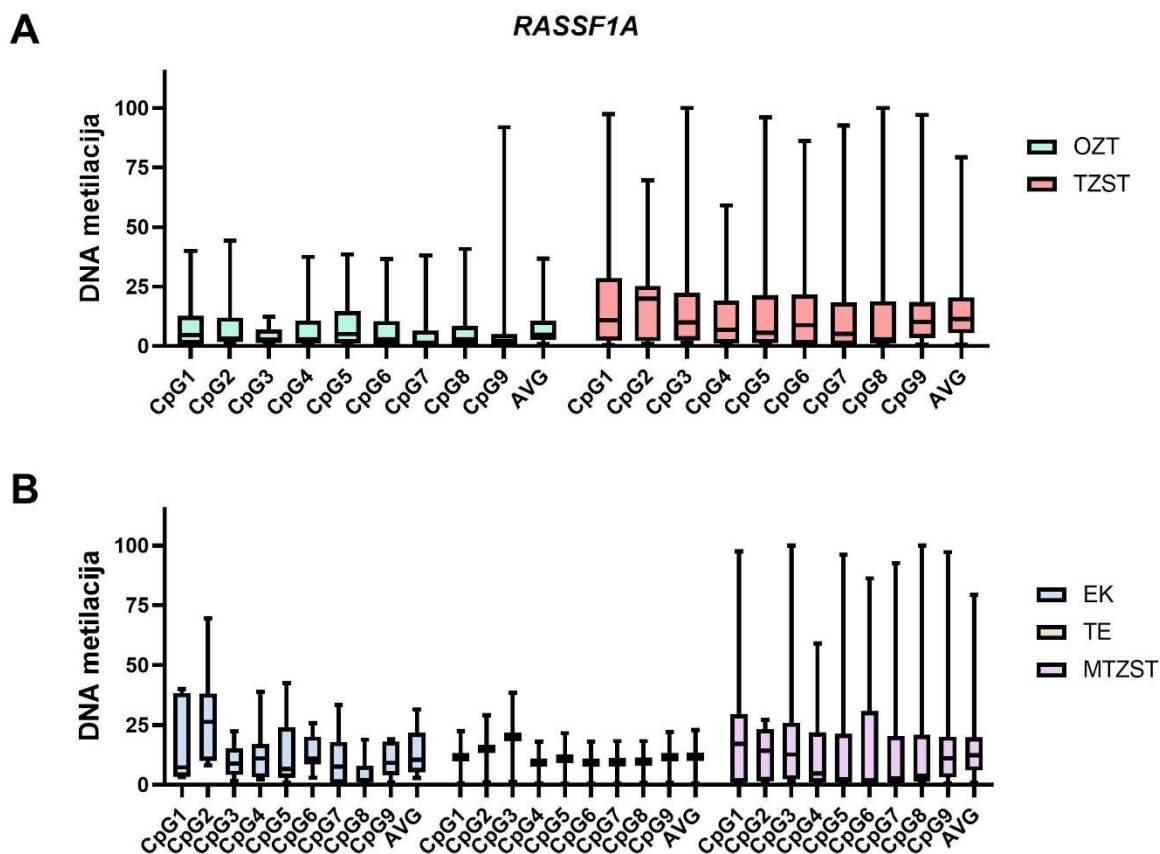
Dunn-ov test višestrukih usporedbi	P vrijednost
EK vs. OZT	****
TE vs. OZT	***
TŽV vs. OZT	****
SE vs. OZT	****

5.3. Metilacija gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* i *PRSS21* u tkivu

5.3.1. Metilacija gDNA gena *RASSF1A*

Rezultati analize metilacije gDNA gena *RASSF1A* prikazani su kao postotak metilacije po pojedinačnom analiziranom CpG mjestu te kao prosječan postotak metilacije promotorske regije.

Metilacija gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* je bila statistički značajno hipermetilirana u tkivu TZST-a naspram OZT na razini prosječne metilacije te CpG mjesta 1, 2 i 3 (Slika 6 A). Tkivo čiste komponente EK je bilo statistički značajno hipermetilirano na CpG mjestu 2 naspram OZT, dok je tkivo MTZST-a bilo statistički značajno hipermetilirano naspram OZT na CpG mjestu 9 (Slika 6 B). Sve statistički značajne razlike su prikazane u tablici 8.



Slika 6. Postotak prosječne i pojedinačne metilacije po analiziranim CpG mjestima gDNA gena *RASSF1A* u tumorskom tkivu pacijenata s neseminomom testisa te okolnom zdravom tkivu. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. **A** - Status metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u okolnom tkivu i tkivu TZST. **B** - Status metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u tkivu čistog EK, TE i MTZST. OZT - okolno zdravo tkivo, TZST - tumor zametnih stanica testisa, EK - embrionalni karcinom, TE - teratom, MTZST - miješani tumor zametnih stanica testisa.

Tablica 8. Statistička analiza metilacije gDNA gena *RASSF1A* u tkivu pacijenata s NSE testisa. Tablica prikazuje tip testa koji je korišten, uspoređivane grupe te statističku značajnost. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost $< 0,05$, ** označava p-vrijednost $\leq 0,01$, *** označava p-vrijednost $\leq 0,001$). OZT - tkivo testisa s očuvanom spermatogenezom, TZST-a - tumor zametnih stanica testisa, EK - komponenta embrionalnog karcinoma, MTZST - miješani tumor zametnih stanica testisa.

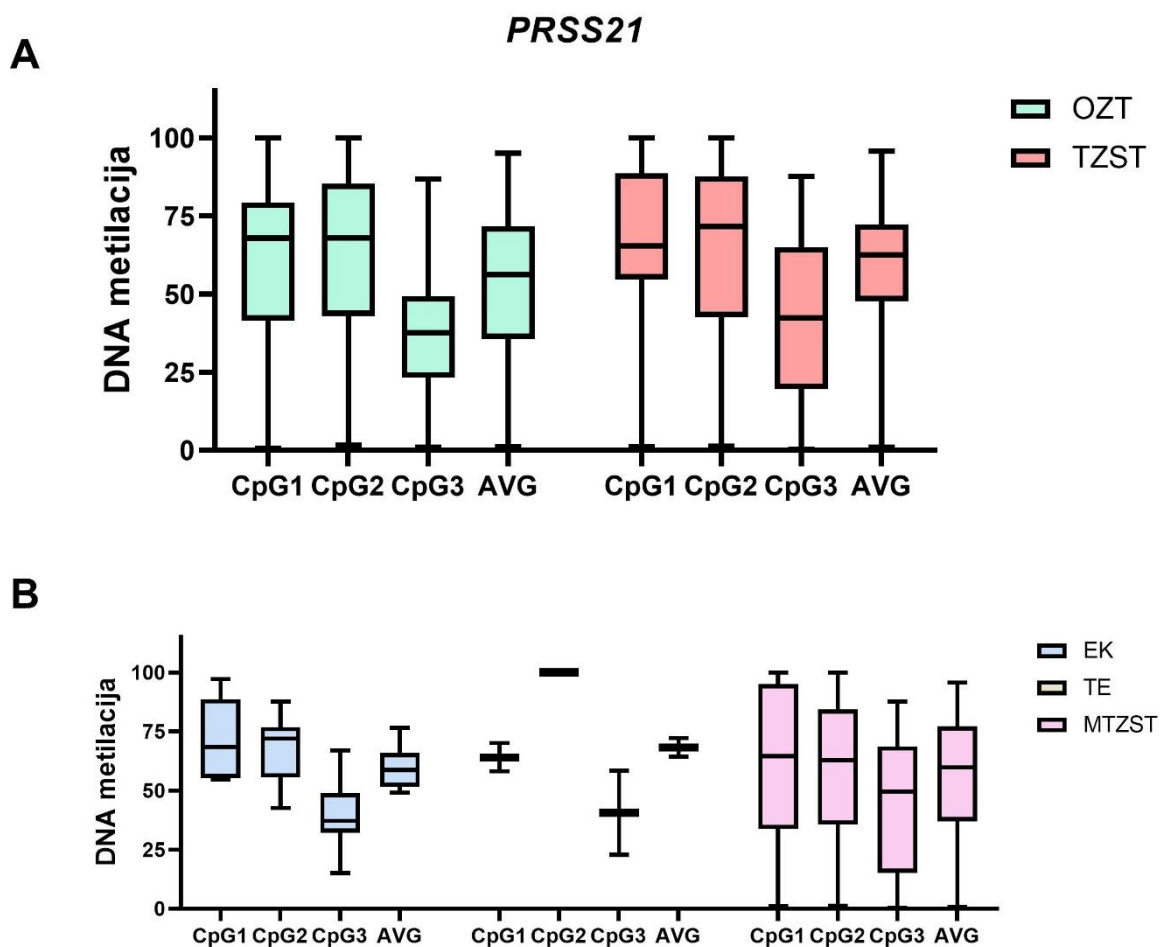
CpG mjesto	Wilcoxon-ov test uparenih rangova	P vrijednost
CpG1	TZST vs. OZT	*
CpG2	TZST vs. OZT	*
CpG3	TZST vs. OZT	**
CpG9	TZST vs. OZT	***
AVG	TZST vs. OZT	*

CpG mjesto	Dunn-ov test višestrukih usporedbi	P vrijednost
CpG2	OZT vs. EK	*
CpG3	OZT vs. TZST	*
CpG9	OZT vs. TZST	*
	OZT vs. MTZST	*

5.3.2. Metilacija gDNA gena *PRSS21*

Rezultati analize metilacije gDNA gena *PRSS21* prikazani su kao postotak metilacije po pojedinačnom analiziranom CpG mjestu te kao prosječan postotak metilacije promotorske regije.

Metilacije gDNA promotorske regije *PRSS21* u tkivu TZST-a je bila istovjetna metilaciji DNA OZT (Slika 7 A). Čiste komponente i MTZST su također imale jednaku stopu metilacije DNA poput OZT (Slika 7 B).

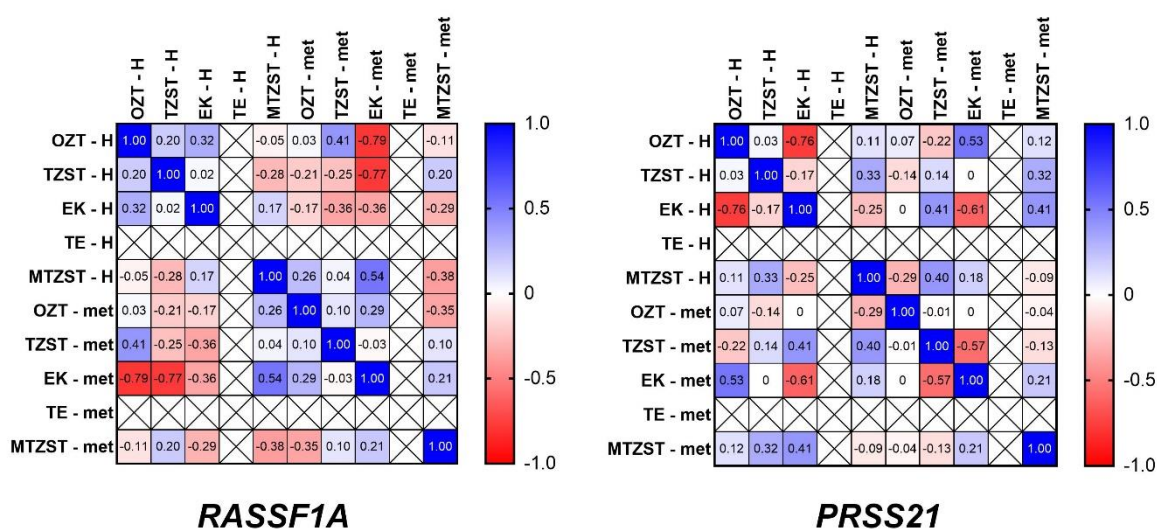


Slika 7. Postotak prosječne i pojedinačne metilacije po analiziranim CpG mjestima gDNA gena *PRSS21* u tumorskom tkivu pacijenata s neseminomom testisa te okolnom zdravom tkivu. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. **A** - Status metilacije gDNA promotorske regije gena *PRSS21* u okolnom tkivu i tkivu TZST. **B** - Status metilacije gDNA promotorske regije gena *PRSS21* u tkivu čistog EK, TE i MTZST. OZT - okolno zdravo tkivo, TZST - tumor zametnih stanica testisa, EK - embrionalni karcinom, TE - teratom, MTZST - miješani tumor zametnih stanica testisa.

5.4. Korelacija metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* i *PRSS21* u tkivu s ekspresijom na proteinskoj razini

Koeficijent korelacije metilacije gDNA promotorskih regija gena *RASSF1A* i *PRSS21* s ekspresijom gena *RASSF1A* i *PRSS21* na proteinskoj razini je dobiven Spearman-ovim testom. Negativan trend korelacije metilacije gDNA i ekspresije gena je uočen ali nijedan odnos nije bio statistički značajan ($p>0.05$) (Slika 8).

Odnosi su prikazani matricom korelacija, u kućicama je broj trenda korelacije a skala boje prikazuje pozitivan trend (plave boje), negativan trend (crvene boje) ili odsustvo korelacije (bijela boja). Kako je među uključenim pacijentima samo dvoje bilo s čistim formama TE nije bilo moguće računati korelacije za njih te su prikazane kao bijele prekrižene kućice u matrici.



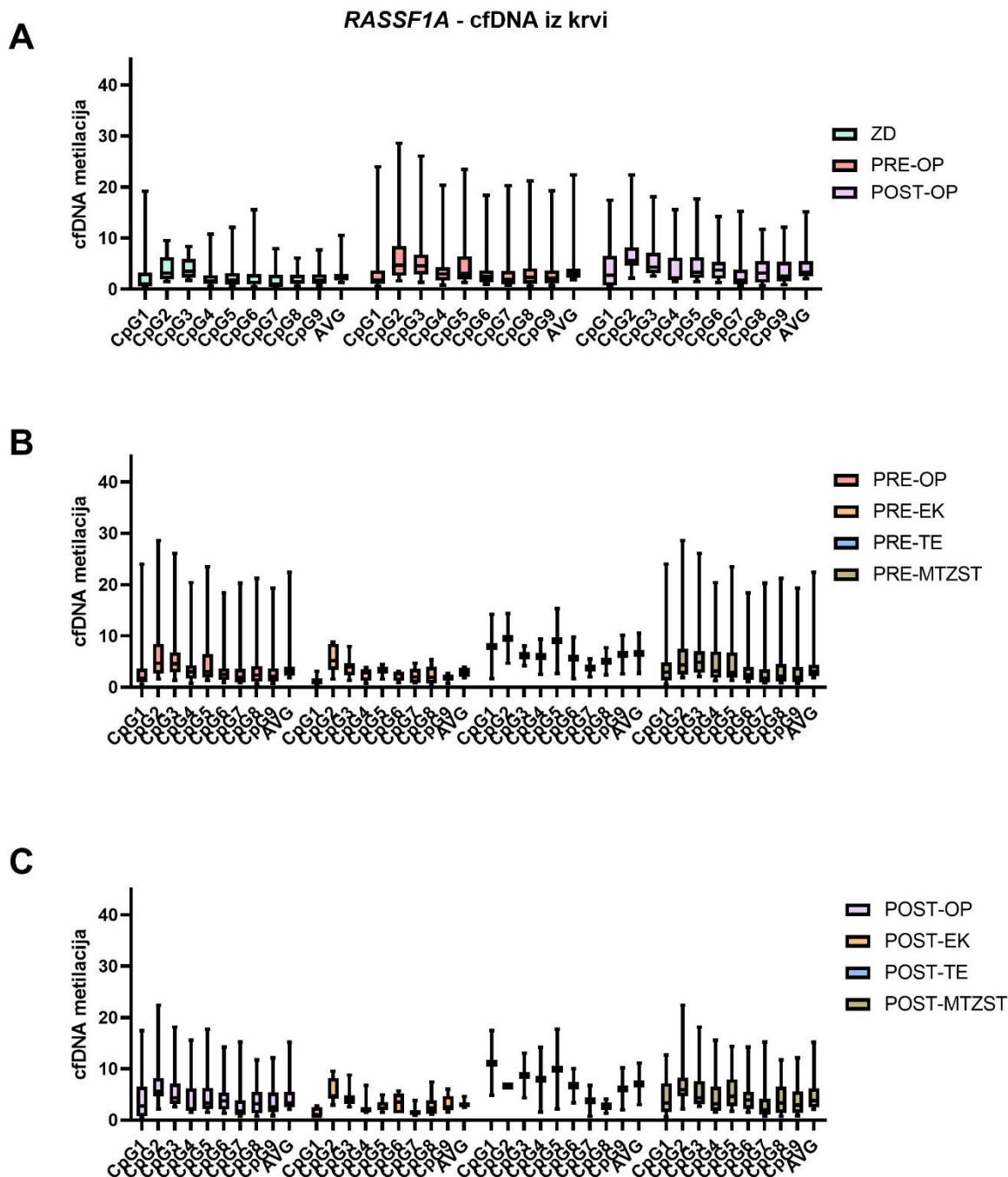
Slika 8. Korelacija statusa metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* i *PRSS21* s ekspresijom gena *RASSF1A* i *PRSS21* na proteinskoj razini u tkivu TZST-a i okolnom zdravom tkivu. TZST - tumor zametnih stanica testisa, EK - embrionalni karcinom, TE -teratom, OZT - tkivo testisa s očuvanom spermatogenezom.

5.5. Analiza metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* u tekućinskim biopsijama

Rezultati analize metilacije cfDNA gena *RASSF1A* prikazani su kao postotak metilacije po pojedinačnom analiziranom CpG mjestu te kao prosječan postotak metilacije promotorske regije.

Uzorci cfDNA izolirani iz krvi pacijenata s NSE predoperativno su pokazali statistički značajnu hipermetiliranost kod CpG mjesta 4, 5 i 7 (Slika 9 A). Pacijenti s MTZST-a su kod predoperativnih uzoraka pokazali statistički značajnu hipermetiliranost kod CpG mjesta 4 (Slika 9 B). Uzorci cfDNA pacijenata s NSE postoperativno i pacijenata s MTZST-a postoperativno su pokazali statistički značajnu hipermetiliranost naspram zdravih kontrola kod CpG mjesta 2, 4, 5 i 6 kao i kod prosječne razine metilacije gena *RASSF1A* (Slika 9 C). Nije detektirana razlika između predoperativnih i postoperativnih uzoraka. Sve statistički značajne razlike su prikazane u tablici 9.

Najveća osjetljivost i specifičnost metilacije cfDNA gena *RASSF1A* za razlikovanje pacijenata od ZD je izmjerena kod CpG-a 4 i to 59 % osjetljivost i 81 % specifičnost. Podtip s najvećom osjetljivošću su MTZST s 61 % osjetljivosti i 81 % specifičnosti kod CpG-a 4. Osjetljivost i specifičnost predoperativnih uzoraka naspram zdravih kontrola prikazane su u tablici 10.



Slika 9. Postotak prosječne i pojedinačne metilacije po analiziranim CpG mjestima gena *RASSF1A* u cfDNA iz krvi pacijenata s neseminomom testisa iz krvi zdravih dobrovoljaca. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. **A** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz uzoraka krvi zdravih dobrovoljaca te predoperativnih i postoperativnih uzoraka pacijenata. **B** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz predoperativnih uzoraka krvi

pacijenata s NSE. C - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz postoperativnih uzoraka krvi pacijenata s NSE. ZD - zdravi dobrovoljci, PRE-OP - predoperativni uzorci pacijenata s NSE, POST-OP - postoperativni uzorci pacijenata s NSE, PRE-EK - predoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, PRE-TE - predoperativni uzorci pacijenata s teratomom, PRE-MTZST - predoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa, POST-EK - postoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, POST-TE - postoperativni uzorci pacijenata s teratomom, POST-MTZST - postoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa.

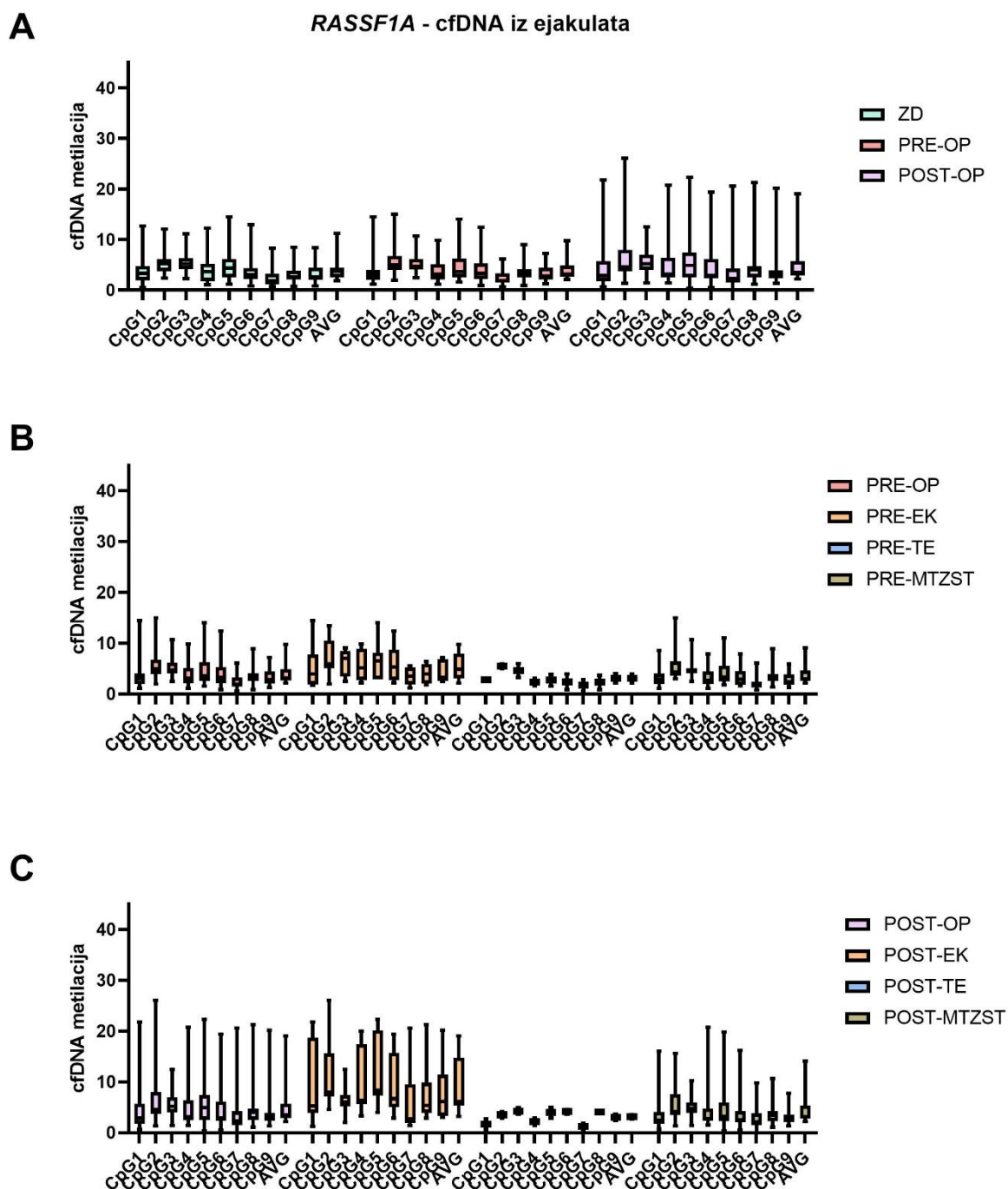
Tablica 9. Statistička analiza metilacije cfDNA gena *RASSF1A* iz krvi pacijenata s NSE testisa. Tablica prikazuje tip testa koji je korišten, uspoređivane grupe te statističku značajnost. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05, ** označava p-vrijednost ≤ 0,01, *** označava p-vrijednost ≤ 0,001). ZD - zdravi dobrovoljci, PRE-OP - predoperativni uzorci pacijenata s NSE, POST-OP - postoperativni uzorci pacijenata s NSE, PRE-EK - predoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, PRE-TE - predoperativni uzorci pacijenata s teratomom, PRE-MTZST - predoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa, POST-EK - postoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, POST-TE - postoperativni uzorci pacijenata s teratomom, POST-MTZST - postoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa.

CpG mjesto	Dunn-ov test višestrukih usporedbi	P vrijednost
CpG2	ZD vs. POST	*
	ZD vs. POST-MTZST	*
CpG4	ZD vs. PRE	*
	ZD vs. PRE-MTZST	*
	ZD vs. POST	*
	ZD vs. POST-MTZST	*
CpG5	ZD vs. PRE	*
	ZD vs. POST	**
	ZD vs. POST-MTZST	**
CpG6	ZD vs. POST	***
	ZD vs. POST-MTZST	**
CpG7	ZD vs. PRE	*
AVG	ZD vs. POST	**
	ZD vs. POST-MTZST	**

Tablica 10. Osjetljivost i specifičnost metilacije cfDNA gena *RASSF1A* iz krvi kod pacijenata s NSE testisa. Tablica prikazuje specifičnost i osjetljivost po analiziranom CpG mjestu te za srednju vrijednost analiziranog fragmenta. ZD - zdravi dobrovoljci, PRE-OP - predoperativni uzorci pacijenata s NSE, PRE-EK - predoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, PRE-TE - predoperativni uzorci pacijenata s teratomom, PRE-MTZST - predoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa.

CpG mjesto	ROC analiza	Prag	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)	Površina pod krivuljom
CpG4	PRE vs. ZD	> 2.860	59.26	81.48	0.7373
	PRE-EK vs. ZD	> 2.860	57.14	81.48	0.6376
	PRE-TE vs. ZD	> 2.985	50	81.48	0.7963
	PRE-MTZST vs. ZD	> 2.910	61.11	81.48	0.7695
CpG5	PRE vs. ZD	> 3.415	48.15	81.48	0.7346
	PRE-EK vs. ZD	> 3.415	57.14	81.48	0.7302
	PRE-TE vs. ZD	> 3.755	50	81.48	0.8704
	PRE-MTZST vs. ZD	> 3.480	44.44	81.48	0.7212
CpG7	PRE vs. ZD	> 3.010	29.63	81.48	0.7174
	PRE-EK vs. ZD	> 3.010	28.57	81.48	0.7011
	PRE-TE vs. ZD	> 3.010	50	81.48	0.8333
	PRE-MTZST vs. ZD	> 3.010	27.78	81.48	0.7109

Uzorci cfDNA izolirani iz ejakulata pacijenata s NSE predoperativno su imali jednaku stopu metilacije kao uzorci zdravih kontrola (Slika 10 A). Postoperativni uzorci pacijenata s EK pokazali su hipermetilaciju u odnosu na zdrave kontrole na CpG mjestima 4, 5, 6, 8 i 9 te na prosječnoj metilaciji cfDNA, dok su postoperativni uzorci MTZST-a pokazali hipermetilaciju na CpG mjestima 4, 5, 6 i 9 te na prosječnoj metilaciji cfDNA (Slika 10 C). Postoperativni uzorci EK su pokazali hipermetilaciju u odnosu na predoperativne uzorke EK na CpG mjestima 2, 5 i 9 (Slika 10 B). Sve statistički značajne razlike prikazane su u tablici 11.



Slika 10. Postotak prosječne i pojedinačne metilacije po analiziranim CpG mjestima gena *RASSF1A* u cfDNA iz ejakulata pacijenata s neseminomom testisa te iz ejakulata zdravih dobrovoljaca. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. **A** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz uzoraka ejakulata zdravih dobrovoljaca te predoperativnih i postoperativnih

uzoraka pacijenata. **B** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz predoperativnih uzoraka ejakulata pacijenata s NSE. **C** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* iz postoperativnih uzoraka ejakulata pacijenata s NSE. ZD - zdravi dobrovoljci, PRE-OP - predoperativni uzorci pacijenata s NSE, POST-OP - postoperativni uzorci pacijenata s NSE, PRE-EK - predoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, PRE-TE - predoperativni uzorci pacijenata s teratomom, PRE-MTZST - predoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa, POST-EK - postoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, POST-TE - postoperativni uzorci pacijenata s teratomom, POST-MTZST - postoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa.

Tablica 11. Statistička analiza metilacije cfDNA gena *RASSF1A* iz ejakulata pacijenata s NSE testisa. Tablica prikazuje tip testa koji je korišten, uspoređivane grupe te statističku značajnost. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost < 0,05, ** označava p-vrijednost ≤ 0,01). ZD - zdravi dobrovoljci, PRE-OP - predoperativni uzorci pacijenata s NSE, POST-OP - postoperativni uzorci pacijenata s NSE, PRE-EK - predoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, PRE-TE - predoperativni uzorci pacijenata s teratomom, PRE-MTZST - predoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa, POST-EK - postoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, POST-TE - postoperativni uzorci pacijenata s teratomom, POST-MTZST - postoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa.

CpG mjesto	Dunn-ov test višestrukih usporedbi	P vrijednost
CpG4	ZD vs. POST-EK	*
	POST-EK vs. POST-MTZST	*
CpG5	ZD vs. POST-EK	*
	POST-EK vs. POST-MTZST	*
CpG6	ZD vs. POST-EK	*
	POST-EK vs. POST-MTZST	**
CpG8	ZD vs. POST-EK	*
CpG9	ZD vs. POST-EK	*
	POST-EK vs. POST-MTZST	*
AVG	ZD vs. POST-EK	*
	POST-EK vs. POST-MTZST	*

CpG mjesto	Wilcoxon-ov test uparenih rangova	P vrijednost
CpG2	POST-EK vs PRE-EK	*
CpG5	POST-EK vs PRE-EK	*
CpG9	POST-EK vs PRE-EK	*

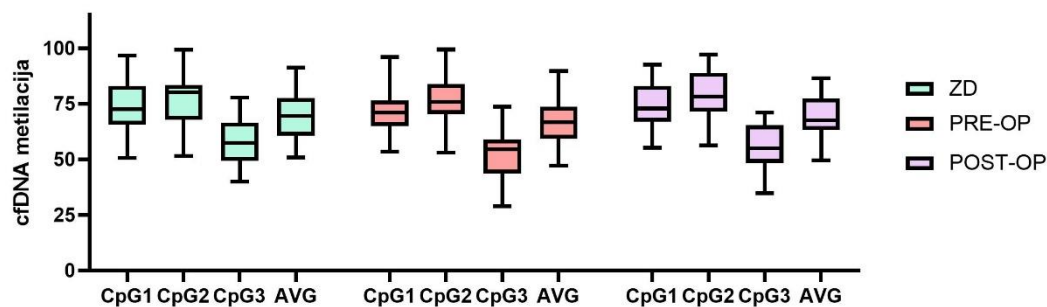
5.6. Analiza metilacije cfDNA promotorske regije gena *PRSS21* u tekućinskim biopsijama

Rezultati analize metilacije cfDNA gena *PRSS21* prikazani su kao postotak metilacije po pojedinačnom analiziranom CpG mjestu te kao prosječan postotak metilacije promotorske regije. Izolirana cfDNA iz uzoraka krvi i ejakulata je odvojeno analizirana.

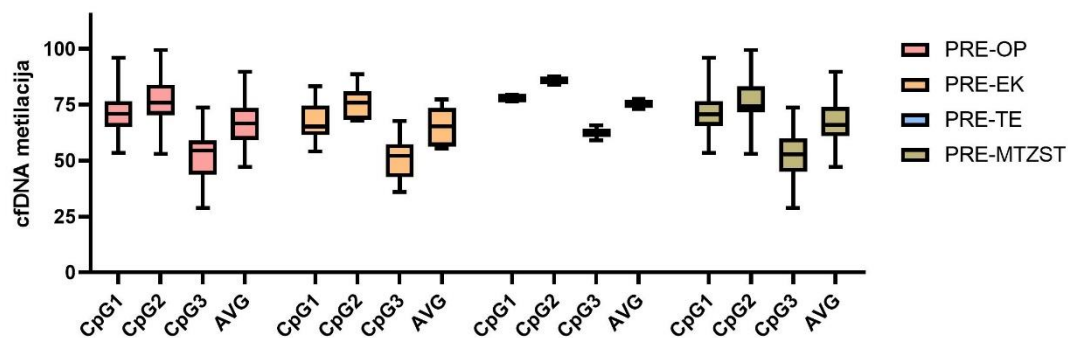
Uzorci cfDNA izolirani iz krvi pacijenata s NSE predoperativno pokazali su jednaku stopu metilacije kao uzorci zdravih kontrola (Slika 11 A). Postoperativni uzorci pacijenata s NSE nisu pokazali razliku u stopi metilacije u odnosu na predoperativne uzorke ili u odnosu na zdrave kontrole (Slika 11 B, Slika 11 C)).

A

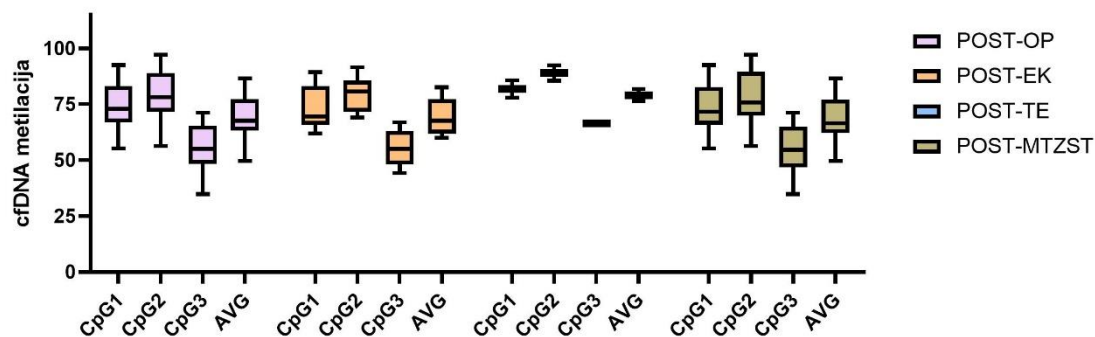
PRSS21 - cfDNA iz krvi



B



C



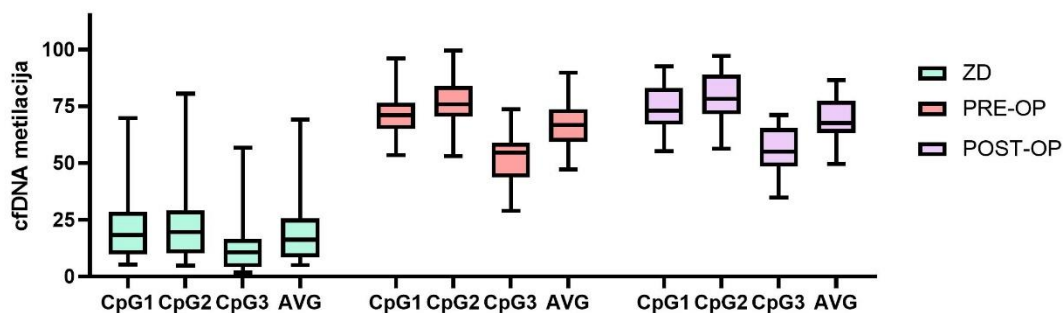
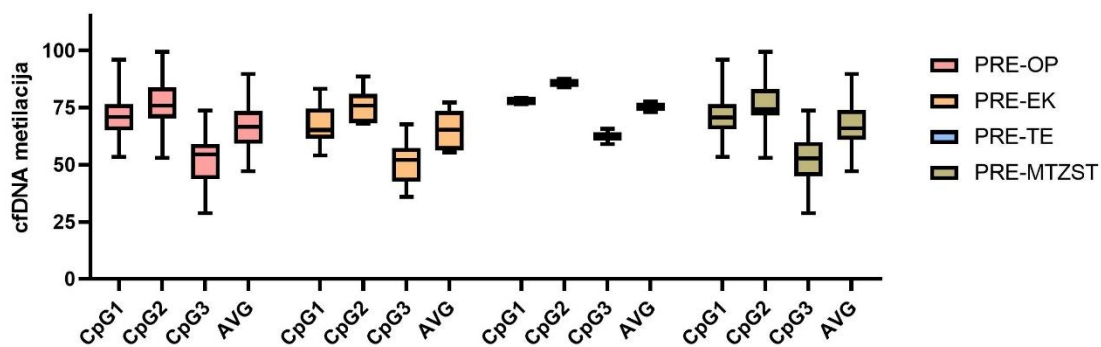
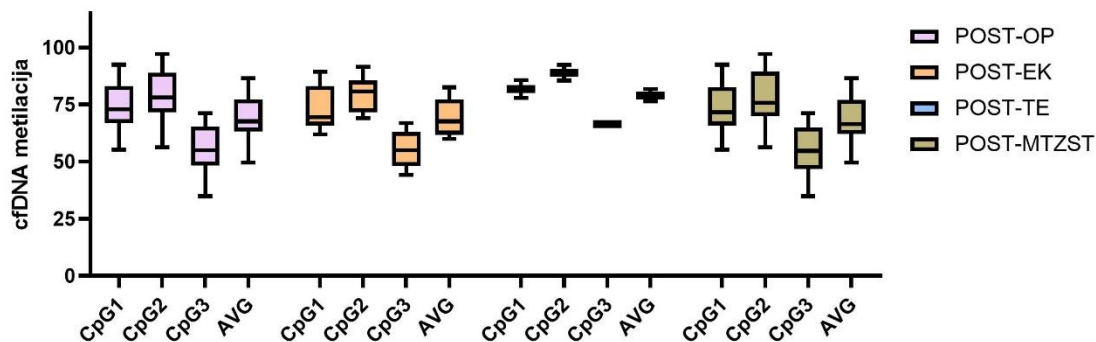
Slika 11. Postotak prosječne i pojedinačne metilacije po analiziranim CpG mjestima gena *PRSS21* u cfDNA iz krvi pacijenata s neseminomom testisa te iz krvi zdravih dobrovoljaca. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. **A** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *PRSS21* iz uzoraka krvi zdravih dobrovoljaca te predoperativnih i postoperativnih uzoraka pacijenata. **B** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *PRSS21* iz predoperativnih uzoraka krvi pacijenata s NSE. **C** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *PRSS21* iz postoperativnih uzoraka krvi pacijenata s NSE. ZD - zdravi dobrovoljci, PRE-OP - predoperativni uzorci pacijenata s NSE, POST-OP - postoperativni uzorci pacijenata s NSE, PRE-EK - predoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, PRE-TE - predoperativni uzorci pacijenata s teratomom, PRE-MTZST - predoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa, POST-EK - postoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, POST-TE - postoperativni uzorci pacijenata s teratomom, POST-MTZST - postoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa.

Uzorci cfDNA izolirani iz ejakulata pacijenata s NSE predoperativno pokazali su statistički značajnu hipermetilaciju u odnosu na zdrave kontrole kod CpG mjesta 1, 2 i 3 te na razini prosječne metilacije cfDNA (Slika 12 A). Čiste komponente EK i TE te pacijenti s MTZST-a su predoperativno pokazali statistički značajnu hipermetilaciju u odnosu na zdrave kontrole kod CpG mjesta 1, 2 i 3 te na razini prosječne metilacije cfDNA (Slika 12 B).

Uzorci cfDNA izolirani iz ejakulata pacijenata s NSE postoperativno su pokazali statistički značajnu hipermetilaciju u odnosu na zdrave kontrole kod CpG mjesta 1, 2 i 3 te na razini prosječne metilacije cfDNA (Slika 12 C). Čiste komponente EK i TE te pacijenti s MTZST-a su postoperativno pokazali statistički značajnu hipermetilaciju u odnosu na zdrave kontrole kod CpG mjesta 1, 2 i 3 te na razini prosječne metilacije cfDNA.

Predoperativni i postoperativni uzorci cfDNA pacijenata s NSE izoliranih iz ejakulata nisu pokazali razliku u stopi metilacije cfDNA međusobno. Sve statistički značajne razlike prikazane su u tablici 12.

Najveća osjetljivost i specifičnost metilacije cfDNA gena *PRSS21* za razlikovanje pacijenata od ZD je izmjerena kod CpG-a 1 i to 100 % osjetljivost i 96 % specifičnost. Podtip s najvećom osjetljivošću su EK i MTZST s 100 % osjetljivosti i 96 % specifičnosti kod CpG-a 1. Dobivene osjetljivosti i specifičnosti prikazane su u tablici 13.

A**PRSS21 - cfDNA iz ejakulata****B****C**

Slika 12. Postotak prosječne i pojedinačne metilacije po analiziranim CpG mjestima gena *PRSS21* u cfDNA iz ejakulata pacijenata s neseminomom testisa te iz ejakulata zdravih dobrovoljaca. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. **A** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *PRSS21* iz uzoraka ejakulata zdravih dobrovoljaca te predoperativnih i postoperativnih

uzoraka pacijenata. **B** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *PRSS21* iz predoperativnih uzoraka ejakulata pacijenata s NSE. **C** - Status metilacije cfDNA promotorske regije gena *PRSS21* iz postoperativnih uzoraka ejakulata pacijenata s NSE. ZD - zdravi dobrovoljci, PRE-OP - predoperativni uzorci pacijenata s NSE, POST-OP - postoperativni uzorci pacijenata s NSE, PRE-EK - predoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, PRE-TE - predoperativni uzorci pacijenata s teratomom, PRE-MTZST - predoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa, POST-EK - postoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, POST-TE - postoperativni uzorci pacijenata s teratomom, POST-MTZST - postoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa.

Tablica 12. Statistička analiza metilacije cfDNA gena *PRSS21* iz ejakulata pacijenata s NSE testisa. Tablica prikazuje tip testa koji je korišten, uspoređivane grupe te statističku značajnost. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (* označava p-vrijednost $< 0,05$, ** označava p-vrijednost $\leq 0,01$, *** označava p-vrijednost $\leq 0,001$, **** označava p-vrijednost $\leq 0,0001$). ZD - zdravi dobrovoljci, PRE-OP - predoperativni uzorci pacijenata s NSE, POST-OP - postoperativni uzorci pacijenata s NSE, PRE-EK - predoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, PRE-TE - predoperativni uzorci pacijenata s teratomom, PRE-MTZST - predoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa, POST-EK - postoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, POST-TE - postoperativni uzorci pacijenata s teratomom, POST-MTZST - postoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa.

CpG mjesto	Dunn-ov test višestrukih usporedbi	P vrijednost
CpG1	ZD vs. PRE	****
	ZD vs. PRE-EK	*
	ZD vs. PRE-TE	*
	ZD vs. PRE-MTZST	****
	ZD vs. POST	****
	ZD vs. POST-EK	***
	ZD vs. POST-TE	**
	ZD vs. POST-MTZST	****
CpG2	ZD vs. PRE	****
	ZD vs. PRE-EK	**
	ZD vs. PRE-TE	*
	ZD vs. PRE-MTZST	****
	ZD vs. POST	****
	ZD vs. POST-EK	***
	ZD vs. POST-TE	**
	ZD vs. POST-MTZST	****
CpG3	ZD vs. PRE	****
	ZD vs. PRE-EK	*
	ZD vs. PRE-TE	**
	ZD vs. PRE-MTZST	****
	ZD vs. POST	****
	ZD vs. POST-EK	***
	ZD vs. POST-TE	**
	ZD vs. POST-MTZST	****
AVG	ZD vs. PRE	****
	ZD vs. PRE-EK	**
	ZD vs. PRE-TE	*

	ZD vs. PRE-MTZST	****
	ZD vs. POST	****
	ZD vs. POST-EK	***
	ZD vs. POST-TE	**
	ZD vs. POST-MTZST	****

Tablica 13. Osjetljivost i specifičnost metilacije cfDNA gena *PRSS21* iz ejakulata kod pacijenata s NSE testisa. Tablica prikazuje specifičnost i osjetljivost po analiziranom CpG mjestu te za srednju vrijednost analiziranog fragmenta. ZD - zdravi dobrovoljci, PRE-OP - predoperativni uzorci pacijenata s NSE, PRE-EK - predoperativni uzorci pacijenata s embrionalnim karcinomom, PRE-TE - predoperativni uzorci pacijenata s teratomom, PRE-MTZST - predoperativni uzorci pacijenata s miješanim tumorom zametnih stanica testisa.

CpG mjesto	ROC analiza	Prag	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)	Površina pod krivuljom
CpG1	PRE vs. ZD	> 53.48	100	96.3	0.9849
	PRE-EK vs. ZD	> 53.80	100	96.3	0.9788
	PRE-TE vs. ZD	> 50.36	100	92.59	1
	PRE-MTZST vs. ZD	> 53.48	100	96.3	0.9856
CpG2	PRE vs. ZD	> 49.81	100	92.59	0.9712
	PRE-EK vs. ZD	> 52.73	100	92.59	0.9735
	PRE-TE vs. ZD	> 52.73	100	92.59	1
	PRE-MTZST vs. ZD	> 49.81	100	92.59	0.9671
CpG3	PRE vs. ZD	> 27.07	100	88.89	0.9739
	PRE-EK vs. ZD	> 28.36	100	88.89	0.9683
	PRE-TE vs. ZD	> 28.36	100	88.89	1
	PRE-MTZST vs. ZD	> 27.07	100	88.89	0.9733
AVG	PRE vs. ZD	> 44.53	100	92.59	0.9739
	PRE-EK vs. ZD	> 46.00	100	92.59	0.9735
	PRE-TE vs. ZD	> 46.00	100	92.59	1
	PRE-MTZST vs. ZD	> 44.53	100	92.59	0.9712

6. RASPRAVA

U ovoj disertaciji smo istražili međuodnos ekspresije gena *RASSF1A* i *PRSS21* na proteinskoj razini tkiva pacijenata s NSE testisa i metilacije gDNA promotorske regije gena *RASSF1A* i *PRSS21* iz istog tkiva pacijenata s NSE.

U ovoj disertaciji također je, po prvi put, istražen potencijal metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* i *PRSS21* u svrhu detekcije pacijenata s NSE te za njihovo postoperativno praćenje. Uzorci cfDNA predoperativnih i postoperativnih uzoraka pacijenata su uspoređeni s uzorcima ZD. Istražen je potencijal krvi i ejakulata kao izvora cfDNA za dijagnostiku pacijenata s TZST.

Raspon dobi uključenih pacijenata s NSE odgovara rasponu koji je zabilježen na globalnoj razini za pacijente s NSE. Prosječna dob pacijenata uključenih u ovu studiju je 30 godina, kao što je i prosječna dob pojavnosti NSE na globalnoj razini 30 godina (11,19,20). To znači da uključeni pacijenti predstavljaju dobno reprezentativan uzorak.

6.1. Stopa metilacije gDNA i ekspresija na proteinskoj razini gena *RASSF1A* i *PRSS21* u tkivima pacijenata s NSE

U TZST-a je detektirana smanjena ekspresija gena *RASSF1A* na proteinskoj razini u odnosu na OZT. Analizom pojedinačnih komponenti TZST-a smanjena ekspresija je detektirana u komponentama EK i TŽV. Prijašnje istraživanje od Tian i sur. (96) je pokazalo smanjenu ekspresiju gena *RASSF1A* kod svih komponenti TZST-a u odnosu na zdravo tkivo testisa. Preostala istraživanja ekspresije gena *RASSF1A* na proteinskoj razini su bila rađena na staničnim linijama EK, gdje je potvrđena smanjena ekspresija gena *RASSF1A* (98). Bioinformatičkom analizom podataka The Cancer Genome Atlas-a (TCGA) prikazanom u našem prethodnom radu Raos i sur. (22) pokazana je na razini mRNA smanjena ekspresija gena *RASSF1A* u TZST-a u odnosu na zdravo tkivo testisa, s time da je u komponentama NSE ekspresija manja nego u komponenti SE, što je u skladu s dobivenim rezultatima. Relativno očuvana ekspresija *RASSF1A* u komponenti SE može biti rezultatom hipometilacije promotora *RASSF1A* u komponentama SE naspram komponenti NSE pa i OZT, što omogućava nesmetanu

ekspresiju gena (105,112). Ekspresija gena *RASSF1A* u komponentama TE može biti rezultat demetilacije koja se događa tijekom diferencijacije tumorskog tkiva karakteristične za TE (17).

Analiza metilacije gDNA promotorske regije *RASSF1A* iz tkiva pacijenata s NSE i njihovog OZT je pokazala hipermetilaciju tkiva TZST-a na pojedinačnim CpG mjestima (1, 2, 3 i 9) i na prosječnoj razini metilacije promotorske regije. Hipermetilacija je također detektirana u čistom EK (CpG 2) i MTZST-a (CpG 9). Dobiveni rezultati ove studije su u skladu s dosadašnjim spoznajama. Hipermetilacija gDNA u tkivu NSE u odnosu na zdravi testis i tkivo SE je pokazana u starijim radovima Koul i sur. (106), kao i Honorio i sur. (105). Lind i sur. (113) također potvrđuju hipermetilaciju NSE, osobito u komponentama TŽV. Shen i sur. (114) kao i naš prethodni rad Raos i sur. iz 2020. (22) analizom TCGA podataka potvrđuju hipermetilaciju NSE u odnosu na SE, dok Ahmad i sur. (97) potvrđuju kako je smanjena metilacija kod MTZST-a u odnosu na NSE kao skupinu rezultat primjese SE. Sukladno tome, možemo govoriti o hipermetilaciji gDNA promotorske regije *RASSF1A* kod TZST naspram zdravog testisa te kod NSE naspram SE kao potencijalnom dijagnostičkom biomarkeru.

Detektirana ekspresija *PRSS21* na proteinskoj razini u OZT bila je gotovo potpuno utišana kod svih komponenti TZST-a. U našem prethodnom radu (22) ekspresija *PRSS21* na proteinskoj razini se nije pokazala promijenjenom između TZST-a i OZT, ali je analiza mRNA podataka TCGA je pokazala utišanje ekspresije kod TZST, jednakih razmjera kod SE i NSE, što je u skladu s našim dobivenim rezultatima. Ekspresiju *PRSS21* na proteinskoj razini u primarnim spermatogonijama testisa su pokazali Hooper i sur. i također, u skladu s našim rezultatima, su pokazali nedostatak ekspresije u tkivu TZST-a (109).

Analiza metilacije gDNA promotorske regije *PRSS21* u tkivu pacijenata s NSE i njihovom OZT nije pokazala razliku metilacije gDNA između tumorskog tkiva i tkiva bez neoplastičnih promjena. Dosadašnja istraživanja su pokazala suprotno, počevši s Manton i sur. (107) koji su pokazali hipermetilaciju promotorske regije kako kod staničnih linija TZST-a tako i kod pacijenata s TZST-a u odnosu na OZT. Kempkensteffen i sur. (110) su potvrdili hipermetilaciju promotora gena *PRSS21* kod pacijenata s TZST-a u odnosu na kontralateralne zdrave testise pacijenata uključenih u studiju te su utvrdili da su NSE hipermetilirani i u odnosu na pacijente sa SE. Rijlaarsdam i sur. (108) su također pokazali hipermetilaciju u svim TZST, kao i u našem prethodnom istraživanju TCGA (22). Dobivena diskrepancija može biti objašnjena manje konzervativnom disekcijom tkiva, koja je mogla zahvatiti dijelove s GCNIS-om, kao i time da je OZT naših pacijenata već moglo imati epigenetičke promjene zbog prisustva tumorskog tkiva. U našem prethodnom istraživanju (22) nismo detektirali razlike

genske ekspresije na proteinskoj razini gena *PRSS21* između tkiva TZST-a i OZT pretpostavivši isti razlog. Kako bi bio razjašnjen odnos metilacije gDNA TZST i zdravog testisa potrebno bi bilo analizirati metilaciju gDNA u svježem zdravom tkivu testisa uspoređeno sa svježim tkivom tumora.

Ukratko, obavljena analiza korelacije ekspresije gena na proteinskoj razini s metilacijom gDNA promotorskih regija *RASSF1A* i *PRSS21* je pokazala trendove korelacije smanjene ekspresije s povećanom metilacijom gDNA, iako nijedna nije bila statistički značajna.

Sukladno navedenom, smanjenje ekspresije gena *RASSF1A* i *PRSS21* na proteinskoj razini u tumorskom tkivu pacijenata s NSE je potvrđeno kao biomarker neoplastičnih promjena. Hipermetilacija gDNA u tumorskom tkivu pacijenata s NSE je također diskriminativna u odnosu na OZT kod gena *RASSF1A*, dok kod gena *PRSS21* takav odnos nije detektiran.

6.2. Metilacija cfDNA gena *RASSF1A* u tekućinskim biopsijama pacijenata s NSE

Metilacija cfDNA pacijenata s NSE testisa pokazala je hipermetilaciju na CpG mjestima 4, 5 i 7, od kojih je CpG mjesto 4 pokazalo najveću osjetljivost i specifičnost za detekciju pacijenata naspram ZD od 59 % osjetljivosti i 81 % specifičnosti. Dobiveni rezultati su u skladu dosad obavljenim istraživanjima. Markulin i sur. (41) su analizom metilacije DNA izolirane iz pune krvi pacijenta s TZST-a pokazali trend hipermetilacije na CpG mjestima 2, 3, 4 i 5, od kojih je na poziciji 5 hipermetilacija bila statistički značajna. Manju osjetljivost se može objasniti prisustvom genomske DNA iz bijelih krvnih stanica jer, su u radu izolirali DNA iz pune krvi. Prvo istraživanje metilacije cfDNA gena *RASSF1A* u pacijenata s TZST-om su proveli Ellinger i sur. (115) na cfDNA izoliranoj iz seruma krvi. Detektirali su hipermetiliranost promotorske regije gena *RASSF1A*, koja je bila viša u pacijenata s NSE testisa te koja je imala dijagnostičku sposobnost od 51,4 % osjetljivosti te 100 % specifičnosti. Lobo i sur. (52) su ponovili istraživanje Ellinger i sur. s većim brojem uzoraka i osjetljivijom PCR metodom, tj. ddPCR a ne qPCR. Njihova grupa potvrđuje hipermetilaciju gena *RASSF1A* u cfDNA pacijenata s TZST, s višom stopom za pacijente s čistom formom SE. Kao biomarker za pacijente s NSE testisa osjetljivost je bila 86 % a specifičnost 100 %.

Postoperativni uzorci cfDNA porijeklom iz krvne plazme pacijenata s NSE su također pokazali hipermetilaciju cfDNA na CpG mjestima 2, 4, 5, 6 i na razini prosječne metilacije. Povećan stupanj metilacije na tim CpG mjestima je eksperimentalno povezan s epigenetičkim utišavanjem gena vezanim uz neoplastične promjene (41,98,116), što je protivno ranijem istraživanju Markulin i sur. (41) u kojem su autori pokazali povratak razina metilacije gDNA na razine u ZD. Kako je ranije navedeno za potrebe njihovog istraživanja korištena je gDNA izolirana iz pune krvi koju pretežito sačinjava DNA iz bijelih krvnih stanica (51), što moguće objašnjava dobivenu diskrepanciju. Naime, kako u punoj krvi najveći udio čini genomska DNA, uklanjanjem tumora se lako može izgubiti utjecaj razine metilacije tumorske cfDNA. Suprotno tome, kako je u ovom istraživanju korištena krvna plazma koja nema staničnu frakciju, moguće da se zaostala tumorska cfDNA može detektirati kroz duže vrijeme, osobito ona pohranjena u egzozomima. Također, postoje dvije bitne metodološke razlike između studije Markulin i sur. (41) i one primijenjene u ovoj disertaciji. Naime, u studiji Markulin i sur. (41) prvi uzorak krvi je uzet nakon obavljene orhidektomije, koja je invazivan operativni zahvat, dok je pacijentima uključenima u ovu studiju predoperativni uzorak uziman prije same orhidektomije. Invazivni zahvati poput biopsija ili operativnih zahvata dokazano utječu na količinu cfDNA u optičaju, tj. dokazano je povećanje količine cfDNA u optičaju kod pacijenata s rakom prostate nakon obavljene biopsije (66). Realna je mogućnost da su uzorci Markulin i sur. bili uzeti unutar tog vremenskog razdoblja tijekom kojeg je bila povećana količina tumorske frakcije cfDNA u optičaju, budući da sama operacija zadire u testis i krvno-testisnu barijeru. Sukladno tome, tumorsku frakciju cfDNA i njenu razinu metilacije bi trebalo lakše detektirati. Druga metodološka razlika među studijama je uzimanje uzoraka nakon tretmana u studiji Markulin i sur., koji su uzeti nakon što su pacijenti primili dva ciklusa kemoterapije, dok su uzorci u ovoj studiji nakon orhidektomije pacijenti koji nisu primali nikakvu terapiju. Kemoterapija povećava otpuštanje cfDNA u tjelesne tekućine, a u ranijim studijama je pokazano kako se u tom povećanju umanju udio tumorske cfDNA i nije moguće detektirati porast stupnja metilacije karakterističan za tumorsko tkivo (117). Zajednički utjecaj tih dvaju faktora može objasniti naizgled oprečne rezultate dviju studija.

Metilacija cfDNA promotorske regije *RASSF1A* u uzorcima ejakulata nije pokazala promijenjen stupanj metilacije između pacijenata s NSE testisa i ZD. Doduše, postoperativni uzorci cfDNA iz ejakulata su pokazali hipermetilaciju u odnosu na ZD na CpG mjestima 4, 5, 6, 8, 9 kao i na razini prosječne metilacije, dok je kod pacijenata s čistim EK primijećena hipermetilacija kod postoperativnih uzoraka na CpG mjestima 2, 5 i 9 u odnosu na njihove

predoperativne uzorke. U vrijeme pisanje ove disertacije nije objavljena nijedna studija na metilaciji promotorske regije *RASSF1A* u ejakulatu pacijenata s NSE te nedostaje kontekst za raspravljanje o prirodi rezultata.

Sukladno tome, potvrđujemo potencijal promjene metilacije cfDNA gena *RASSF1A* iz krvne plazme za dijagnostički biomarker pacijenata s NSE.

6.3. Metilacija cfDNA gena *PRSS21* u tekućinskim biopsijama pacijenata s NSE

Istražen je potencijal metilacije cfDNA promotorske regije *PRSS21* u svrhu detekcije pacijenata s NSE te za njihovo postoperativno praćenje. Uzorci cfDNA predoperativnih i postoperativnih uzoraka pacijenata su uspoređeni s uzorcima ZD. Istražen je potencijal krvi i ejakulata kao izvora cfDNA.

Nije pronađena razlika u stupnju metilacije cfDNA promotorske regije *PRSS21* u krvnoj plazmi pacijenata s NSE testisa, kako spram ZD tako i spram postoperativnih uzoraka. U trenutku pisanje disertacije nije objavljena nijedna studija koja je istražila metilaciju promotorske regije *PRSS21* u krvi pacijenata s TZST-om, niti cfDNA niti gDNA iz pune krvi. Stoga nam nedostaju komparabilna istraživanja neophodna za argumentiranu raspravu o uobičajenim razinama metilacije cfDNA i o detekciji tumorske cfDNA kod pacijenata (66). Doduše, brojne studije su pokazale kako nije svaka tjelesna tekućina primjerena za istraživanje svakog tipa raka ili korištenje istih gena za analizu metilacije cfDNA (51). Kako je stupanj metilacije promotora *PRSS21* u cfDNA ZD bio sličnih razina kao u tumorskom tkivu pacijenata s NSE, tumorska cfDNA u krvi pacijenata s NSE onda uopće nije detektibilna.

Kod uzoraka ejakulata pacijenata s NSE testisa detektiran je promijenjen stupanj metilacije cfDNA promotorske regije *PRSS21* naspram ZD. Detektirana je hipermetilacija na CpG mjestima 1, 2, 3 te na razini prosječne metilacije. CpG mjesto 1 pokazalo je 100 % osjetljivost i 96,3 % specifičnost za pacijente s NSE spram ZD. Doduše, nije uočen povratak stupnja metilacije kod postoperativnih uzoraka na razine kao kod ZD, već je stupanj ostao kao kod predoperativnih uzoraka. Detektiran povećan stupanj metilacije u cfDNA iz ejakulata pacijenata s NSE spram ZD ne možemo diskutirati u kontekstu tuđih rezultata, jer je ova disertacija prvo istraživanje stupnja metilacije gena *PRSS21* u cfDNA pacijenata s NSE, a čak

i u tekućih biopsija općenito. Iako je ranije navedeno kako nije uočena razlika u stupnju metilacije promotorske regije gena *PRSS21* između tkiva TZST-a i OZT, stupanj metilacije pokazuje vrlo visoku osjetljivost i specifičnost u fragmentima cfDNA za pacijente s NSE naspram ZD. Doduše, kako je stupanj metilacije DNA u OZT-u na razini metilacije DNA u TZST, teško je govoriti o odnosima frakcija tumorske cfDNA naspram cfDNA otpuštene iz OZT u pacijenata s NSE. To ne umanjuje njen potencijal kao biomarkera, jer sve i da je značajna količina cfDNA porijeklom iz OZT a ne tkiva tumora, dospijeće DNA fragmenata u sjemenu plazmu je moguće vezano uz neoplastičnu promjenu.

Sukladno navedenom, ova disertacija je prvo objavljeno istraživanje potencijala promjene metilacije cfDNA gena *PRSS21* iz sjemene plazme kao dijagnostičkog biomarkera pacijenata s NSE.

6.4. Potencijal metilacije gena cfDNA *PRSS21* i *RASSF1A* kao biomarkera kod NSE

Lange i Winfield su 1987. (118) opisali sedam osobina idealnog tumorskog markera koje su: 1. proizvodi ga samo tumor, 2. izlučuje se u tjelesne tekućine, 3. može se lako i reproducibilno mjeriti, 4. korelira s količinom tumora, 5. može se detektirati u ranom stadiju bolesti, 6. ima dovoljno kratak poluživot, što sprječava akumulaciju i lažno pozitivne rezultate, i 7. korelira odgovoru na tretman (118,119).

Točku 1, specifičnost za tumor, metilacija *RASSF1A* u cfDNA porijeklom iz krvi zadovoljava u potpunosti, jer je u tumorskom tkivu zabilježen porast stupnja metilacije naspram OZT i taj porast je detektiran u tekućinskim biopsijama pacijenata spram ZD. Metilacija *PRSS21* u cfDNA porijeklom iz ejakulata ne zadovoljava uvjet u potpunosti, iako je detektiran visok porast stupnja metilacije u tekućinskim biopsijama pacijenata spram ZD, ne možemo sa sigurnošću reći da je taj porast sasvim iz tumorskog tkiva, jer nije detektirana razlika u stupnju metilacije između tumorskog tkiva i OZT.

Točku 2, prisutnost u tjelesnim tekućinama, zadovoljavaju metilacija gena *RASSF1A* i *PRSS21*, jer prvi je detektibilan u krvi a drugi u ejakulatu. Njihova detekcija je rezultat pojačanog lučenja cfDNA iz tumorskog tkiva u dovoljnoj mjeri da promijeni stupanj metilacije DNA tekućine u koju se izlučuju.

Točku 3 oba gena zadovoljavaju u potpunosti. Metodom pirosekvenciranja stupanj metilacije promotorskih regija gena *RASSF1A* i *PRSS21* se mogu u potpunosti jednostavno i reproducibilno mjeriti (51).

Točku 4 ne zadovoljava s obzirom na to da nije pronađena korelacija veličine tumora i stupnja metilacije cfDNA gena *RASSF1A* i *PRSS21*.

Točku 5 ne zadovoljava, s obzirom na to da nije detektirana razlika stupnja metilacije cfDNA gena *RASSF1A* i *PRSS21* između različitih stadija bolesti pacijenata s NSE uključenih u istraživanje. Naši rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima, jer ni kod drugih studija na metilaciji cfDNA pacijenata s TZST-a nije pronađena razlika u detekciji s obzirom na stadij.

Točka 6 - poluživot cfDNA u tjelesnim tekućinama je relativno kratak te je ona zato pogodna za praćenje tretmana (51). Iako metilacija gena *RASSF1A* i *PRSS21* u cfDNA pacijenata s NSE nakon tretmana orhidektomijom nije pokazala povratak stupnja metilacije na razine kod ZD za to postoji plauzibilno objašnjenje. Povratak stupnja metilacije gena *RASSF1A* u DNA u studiji Markulin i sur. (41) izoliranoj iz pune krvi je pokazan kod pacijenata čiji je prvi uzorak uzet nakon orhidektomije, kada je količina tumorske DNA na svom vrhuncu (66) dok je drugi uzorak uzet nakon dva ciklusa kemoterapije (41). Kemoterapija snažno potiče lučenje cfDNA iz zdravog tkiva u tjelesne tekućine (117) što dovodi do gubljenja metilacijskog obrasca tumorske DNA.

Točku 7, odgovor tretmanu, ne zadovoljava, kako se nije dogodio povratak razine metilacije cfDNA gena *RASSF1A* i *PRSS21* na razinu kod ZD u postoperativnim uzorcima.

U okviru ove rasprave, važno je napomenuti kako dosad nije pronađen nijedan biomarker za tumore testisa koji bi potpuno zadovoljavao sve navedene kriterije, a zbog navedenih faktora: 1. brojni tumorski markeri su citoplazmatski ili transmembranski proteini koji se nepotpuno izlučuju u tjelesne tekućine, tako da su tumorski markeri najčešće ili tkivni ili cirkulirajući, 2. većina tumorskih markera je eksprimirano i u zdravom tkivu te je detekcija kvantitativna a ne kvalitativna, 3. problem specifičnosti protutijela ili početnica za detekciju i 4. tumori, osobito testisa, su heterogene tvorevine koje ne eksprimiraju uvijek isti marker (118).

Za potpunu analizu potencijala metilacije cfDNA gena *RASSF1A* i *PRSS21* u tekućinskim biopsijama svakako bi trebalo uključiti više pacijenata u višem stadiju bolesti te istražiti utjecaj terapije na stupanj metilacije cfDNA. Zasad, možemo govoriti o njihovom dijagnostičkom potencijalu.

Na temu metilacije cfDNA su u trenutku pisanje ove disertacije publicirana tri istraživanja. Kawakami i sur. (120) su detekcijom nemetiliranog fragmenta *XIST* u krvnoj plazmi ostvarili 55 % osjetljivosti i 100 % specifičnosti za pacijente s NSE. Ellinger i sur. (115) su detekcijom hipermetiliranih fragmenata panela šest gena u krvnom serumu ostvarili 76 % osjetljivosti i 80 % specifičnosti, dok je metilacija samog *RASSF1A* ostvarila 51 % osjetljivosti i 100 % specifičnosti. I konačno Lobo i sur. (52) su pokazali 86 % osjetljivosti i 100 % specifičnosti u krvnom serumu pri upotrebi metilirane *RASSF1A* cfDNA kod pacijenata s NSE testisa. U ovoj studiji dobivena osjetljivost od 59 % i specifičnost od 81 % kod metiliranih fragmenata cfDNA *RASSF1A* u krvnoj plazmi je u rasponu ranije navedenih istraživanja, kao što je i veće osjetljivosti i specifičnosti nego trenutni STM u upotrebi. Što se tiče metilacije *PRSS21* u cfDNA sjemene plazme, s detektiranom osjetljivosti od 100 % i specifičnosti od 96 %, trenutno je najosjetljiviji istražen cfDNA biomarker za pacijente s NSE.

7. ZAKLJUČAK

Sukladno rezultatima možemo zaključiti:

1. Regrutirani pacijenti su mlađe životne dobi čiji raspon godina odgovara globalnom rasponu pacijenata s NSE. Sukladno tome uzorak pacijenata uključenih u studiju se može smatrati reprezentativnim.
2. Smanjenje ekspresije gena *RASSF1A* na proteinskoj razini u komponentama EK i TŽV je biomarker neoplastičnih promjena te potencijalni dijagnostički marker.
3. Smanjenje ekspresije gena *PRSS21* na proteinskoj razini je biomarker neoplastičnih promjena vezanih uz sve komponente TZST te potencijalni dijagnostički marker.
4. Hipermetilacija gDNA gena *RASSF1A* u tumorskom tkivu pacijenata s NSE je biomarker neoplastičnih promjena te potencijalni dijagnostički marker.
5. Nije detektirana promjena stupnja metilacije gDNA gena *PRSS21* između tumorskog tkiva i okolnog zdravog tkiva pacijenata s NSE.
6. Nije pronađena korelacija ekspresije gena *RASSF1A* i *PRSS21* i njihovog stupnja metilacije u gDNA.
7. Metilacija cfDNA gena *RASSF1A* u krvi pacijenata se pokazala kao pogodan biomarker za dijagnostiku NSE s osjetljivošću od 59 % i specifičnošću od 81 %.
8. Metilacija cfDNA gena *PRSS21* u ejakulatu pacijenata se pokazala kao pogodan biomarker za dijagnostiku NSE s osjetljivošću od 100% i specifičnošću od 96%.

Utvdili smo mogućnost promjene stupnja metiliranosti cfDNA promotorskih regija gena *RASSF1A* i *PRSS21* u ejakulatu i krvi bolesnika kao biološkog molekularnog biljega neseminoma testisa. Metilacija cfDNA oba gena je pokazala veću osjetljivost i specifičnost od STM koji su trenutno u kliničkoj upotrebi.

8. SAŽETAK

Tumori zametnih stanica testisa (TZST) su najčešća neoplazija koja pogađa mlađu mušku populaciju. Dije se na seminome i neseminome (NSE). Potvrda dijagnoze TZST neizostavno uključuje radikalnu orhidektomiju te je pouzdana neinvazivna dijagnostička metoda potrebna za raniju dijagnostiku. Analiza slobodnocirkulirajuće nestanične DNA (cfDNA) iz tjelesnih tekućina je perspektivan neinvazivan postupak za dijagnozu onkoloških pacijenata. Metilacija genomske DNA (gDNA) gena *RASSF1A* i *PRSS21* iz tkiva TZST-a se pokazala perspektivnim biomarkerom. Cilj rada je utvrditi potencijal metilacije cfDNA gena *RASSF1A* i *PRSS21* iz krvi i ejakulata kao biomarkera za identifikaciju pacijenata s NSE. Pirosekvenciranjem je istražena stopa metilacije cfDNA promotorske regije gena *RASSF1A* i *PRSS21* iz krvi i ejakulata pacijenata s potvrđenom dijagnozom NSE i zdravih dobrovoljaca bez prijašnje dijagnoze TZST-a te gDNA iz tumorskog tkiva i okolnog zdravog tkiva pacijenata s NSE. Hipermetilirana gDNA *RASSF1A* bila je detektirana u tkivu NSE naspram okolnog zdravog tkiva. U gena *PRSS21* nije detektirana razlika u stupnju metilacije gDNA. Kod pacijenata s NSE detektirana je hipermetilacija cfDNA gena *RASSF1A* u krvi, dok je u ejakulatu detektirana hipermetilacija cfDNA gena *PRSS21*. Metilacija cfDNA gena *RASSF1A* i *PRSS21* je pokazala višu osjetljivost i specifičnost od biomarkera koji su trenutno u kliničkoj upotrebi. Ovim istraživanjem je potvrđen potencijal metilacije cfDNA gena *RASSF1A* u krvi te je otkriven potencijal metilacije cfDNA gena *PRSS21* u ejakulatu kao dijagnostičkih biomarkera pacijenata s NSE.

9. ABSTRACT

Cell Free DNA Methylation of RASSF1A and PRSS21 Genes in Blood and Semen of Patients with Nonseminomatous Testicular Germ Cell Tumors, Jure Krasić, 2022.

Testicular germ cell tumors (TGCT) are the most common malignancy among young males. TGCT are subdivided into seminomas and nonseminomas (NSE). Confirmation of a TGCT diagnosis always includes radical orchidectomy, making a reliable noninvasive diagnostic method required for earlier diagnosis. Analysis of circulating cell-free DNA (cfDNA) from body liquids is a perspective noninvasive procedure for diagnosis of oncological patients. Genomic DNA methylation (gDNA) of *RASSF1A* and *PRSS21* genes in the tissue of TGCT has been shown as a potential biomarker. The aim of this study was to assess the potential of cfDNA methylation of genes *RASSF1A* and *PRSS21* in the blood and ejaculate as biomarkers for patients with NSE. Pyrosequencing was used to analyze cfDNA methylation of genes *RASSF1A* and *PRSS21* in blood and ejaculate of patients with a confirmed diagnosis of NSE and healthy donors with no prior diagnosis of TGCT as well as in gDNA from the tumor tissue and the surrounding healthy tissue of patients with NSE. *RASSF1A* was hypermethylated in gDNA of tumor tissue. No difference in gDNA methylation levels was found in *PRSS21*. In NSE patients hypermethylated *RASSF1A* was detected in cfDNA isolated from the blood, while hypermethylated *PRSS21* was detected in cfDNA isolated from the ejaculate. Methylation of *RASSF1A* and *PRSS21* cfDNA shows higher sensitivity and specificity than the currently used clinical biomarkers. This study confirms the potential of methylation of *RASSF1A* in cfDNA from blood and discovers the methylation of *PRSS21* in cfDNA from the ejaculate as diagnostic biomarkers of patients with NSE.

10. POPIS LITERATURE

1. Setchell BP, Hertel T, Söder O. Postnatal testicular development, cellular organization and paracrine regulation. *Endocr Dev*. 2003;5:24-37.
2. Utiger RD. Testis. *Encyclopedia Britannica*. 2018.
<https://www.britannica.com/science/testis>, Accessed, August 22nd, 2022
3. Vaskovic J. Testes. *Kenhub*. 2022. <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-testes>, Accessed, August 22nd, 2022
4. Culty M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2009;87(1):1-26.
5. Jarred EG, Bildsoe H, Western PS. Out of sight, out of mind? Germ cells and the potential impacts of epigenomic drugs. *F1000Research*. 2018;7(0):1967.
6. Costa J. Cancer-disease. *Encyclopedia Britannica*. 2022.
<https://www.britannica.com/science/cancer-disease>, Accessed, August 22nd, 2022
7. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017;7(5):1016-36.
8. Znaor A, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Kuliš T, Laversanne M, Gurney J, i sur. Global patterns in testicular cancer incidence and mortality in 2020. *Int J Cancer*. 2022;151(5):692-8.
9. Buljubašić R, Buljubašić M, Bojanac AK, Ulamec M, Vlahović M, Ježek D, i sur. Epigenetics and testicular germ cell tumors. *Gene*. 2018;661:22-33.
10. Znaor A, Skakkebæk NE, Rajpert-De Meyts E, Laversanne M, Kuliš T, Gurney J, i sur. Testicular cancer incidence predictions in Europe 2010-2035: A rising burden despite population ageing. *Int J Cancer*. 2020;147(3):820-8.
11. Elzinga-Tinke J, Dohle G, Looijenga L. Etiology and early pathogenesis of malignant testicular germ cell tumors: towards possibilities for pre-invasive diagnosis. *Asian J Androl*. 2015;17(3):381-93.
12. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International testicular cancer incidence trends: generational transitions in 38 countries 1900-1990. *Cancer Causes Control*. 2015;26(1):151-8.

13. Sincic N, Kulis T, Znaor A, Bray F. Time trends in testicular cancer in Croatia 1983-2007: rapid increases in incidence, no declines in mortality. *Cancer Epidemiol.* 2012;36(1):11-5.
14. Cheng L, Albers P, Berney DM, Feldman DR, Daugaard G, Gilligan T, i sur. Testicular cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4(1):29.
15. IARC. Global Cancer Observatory 2020; <https://gco.iarc.fr/>, Accessed, August 22nd, 2022.
16. Raos D. Metilacija nestaničnoga DNA gena RASSF1A u krvi i ejakulatu kao epigenetički biomarker u pacijenata sa seminomom testisa. Zagreb: Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2021.
17. Krasic J, Skara L, Ulamec M, Bojanac AK, Dabelic S, Bulic-Jakus F, i sur. Teratoma growth retardation by hdaci treatment of the tumor embryonal source. *Cancers (Basel).* 2020;12(11):1-23.
18. Marko J, Wolfman DJ, Aubin AL, Sesterhenn IA. Testicular seminoma and its mimics. *Radiographics.* 2017;37(4):1085-98.
19. Ruf CG, Isbarn H, Wagner W, Fisch M, Matthies C, Dieckmann KP. Changes in epidemiologic features of testicular germ cell cancer: age at diagnosis and relative frequency of seminoma are constantly and significantly increasing. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2014;32(1):33.e1-33.e6.
20. Woldu SL, Amatruda JF, Bagrodia A. Testicular germ cell tumor genomics. *Curr Opin Urol.* 2017;27(1):41-7.
21. Baroni T, Arato I, Mancuso F, Calafiore R, Luca G. On the origin of testicular germ cell tumors: from gonocytes to testicular cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:1-8.
22. Raos D, Krasic J, Masic S, Abramovic I, Coric M, Kruslin B, i sur. In search of TGCT biomarkers: a comprehensive in silico and histopathological analysis. *Dis Markers.* 2020;2020:1-18.
23. Cheng L, Lyu B, Roth LM. Perspectives on testicular germ cell neoplasms. *Hum Pathol.* 2017;59:10-25.
24. Carver BS, Al-Ahmadie H, Sheinfeld J. Adult and pediatric testicular teratoma. *Urol*

- Clin North Am. 2007;34(2):245-51.
25. Howitt BE, Berney DM. Tumors of the testis. Surg Pathol Clin. 2015;8(4):687-716.
 26. Ravishankar S, Malpica A, Ramalingam P, Euscher ED. Yolk sac tumor in extragonadal pelvic sites. Am J Surg Pathol. 2017;41(1):1-11.
 27. Nonaka D. Differential Expression of SOX2 and SOX17 in testicular germ cell tumors. Am J Clin Pathol. 2009;131(5):731-6.
 28. Humphrey PA. Choriocarcinoma of the testis. J Urol. 2014;192(3):934-5.
 29. Reilley MJ, Pagliaro LC. Testicular choriocarcinoma: a rare variant that requires a unique treatment approach. Curr Oncol Rep. 2015;17(2):2.
 30. Loveland KL, Rajpert-De Meyts E, Veeramachaneni DNR. Testicular cancer in relation to testicular dysgenesis syndrome. U: Comprehensive Toxicology. Third Edit. Elsevier; 2018. p. 147-64.
 31. Lee PA, Houk CP. Cryptorchidism. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2013;20(3):210-6.
 32. Richiardi L, Pettersson A, Akre O. Genetic and environmental risk factors for testicular cancer. Int J Androl. 2007;30(4):230-41.
 33. Nicu AT, Medar C, Chifiriuc MC, Gradisteanu Pircalabioru G, Burlibasa L. Epigenetics and testicular cancer: bridging the gap between fundamental biology and patient care. Front Cell Dev Biol. 2022;10:861995.
 34. Capodice JL, Kaplan SA. The endocannabinoid system, cannabis, and cannabidiol: implications in urology and men's health. Curr Urol. 2021;15(2):95-100.
 35. AlDubayan SH, Pyle LC, Gamulin M, Kulis T, Moore ND, Taylor-Weiner A, i sur. Association of inherited pathogenic variants in checkpoint kinase 2 (CHEK2) with susceptibility to testicular germ cell tumors. JAMA Oncol. 2019;5(4):514.
 36. Germà-Lluch J. Clinical pattern and therapeutic results achieved in 1490 patients with germ-cell tumours of the testis: the experience of the spanish germ-cell cancer group (GG). Eur Urol. 2002;42(6):553-63.
 37. Moul JW. Timely diagnosis of testicular cancer. Urol Clin North Am. 2007;34(2):109-17.

38. Laguna, MP Albers, P Algaba, F Bokemeyer, C Boormans, JL Fischer S. EAU Guidelines on testicular cancer [Internet]. European Association of Urology. 2022.
39. Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek N, Toppari J. Testicular cancer pathogenesis, diagnosis and endocrine aspects. U: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, i sur., Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. 2018.
40. Gupta M, Cheaib JG, Patel HD, Sharma R, Zhang A, Bass EB, i sur. Diagnosis and management of intratubular germ cell neoplasia in situ: a systematic review. *J Urol*. 2020;204(1):33-41.
41. Markulin D, Vojta A, Samaržija I, Gamulin M, Bečeheli I, Jukić I, i sur. Association between RASSF1A promoter methylation and testicular germ cell tumor: a meta-analysis and a cohort study. *Cancer Genomics Proteomics*. 2017;14(5):363-372.
42. Lobo J, Leão R, Jerónimo C, Henrique R. Liquid biopsies in the clinical management of germ cell tumor patients: state-of-the-art and future directions. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):1-22.
43. Lobo J, van Zogchel LMJ, Nuru MG, Gillis AJM, van der Schoot CE, Tytgat GAM, i sur. Combining hypermethylated RASSF1A detection using ddpcr with mir-371a-3p testing: an improved panel of liquid biopsy biomarkers for testicular germ cell tumor patients. *Cancers (Basel)*. 2021;13(20):1-15.
44. Chen JJ, Lu TP, Chen YC, Lin WJ. Predictive biomarkers for treatment selection: statistical considerations. *Biomark Med*. 2015;9(11):1121-35.
45. Steckl AJ, Ray P. Stress biomarkers in biological fluids and their point-of-use detection. *ACS Sensors*. 2018;3(10):2025-44.
46. Liu R, Wang X, Aihara K, Chen L. Early diagnosis of complex diseases by molecular biomarkers, network biomarkers, and dynamical network biomarkers. *Med Res Rev*. 2014;34(3):455-78.
47. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Silvestrini A. Cancer biomarkers discovery and validation: state of the art, problems and future perspectives. *Adv Exp Med Biol*, 2015;867:9-26.
48. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol*. 2012;6(2):140-6.
49. Ma Y, Gamagedara S. Biomarker analysis for oncology. *Biomark Med*. 2015;9(9):845-

- 50.
50. Constâncio V, Nunes SP, Henrique R, Jerónimo C. DNA methylation-based testing in liquid biopsies as detection and prognostic biomarkers for the four major cancer types. *Cells*. 2020;9(3):624.
51. Krasic J, Abramovic I, Vrtaric A, Nikolac Gabaj N, Kralik-Oguic S, Katusic Bojanac A, i sur. Impact of preanalytical and analytical methods on cell-free DNA diagnostics. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:1-17.
52. Lobo J, van Zogchel LMJ, Nuru MG, Gillis AJM, van der Schoot CE, Tytgat GAM, i sur. Combining hypermethylated RASSF1A detection using ddPCR with miR-371a-3p testing : an improved panel of liquid biopsy biomarkers for testicular germ cell tumor patients. *Cancers (Basel)*. 2021;13(20):5228.
53. Thomsen CB, Hansen TF, Andersen RF, Lindebjerg J, Jensen LH, Jakobsen A. Early identification of treatment benefit by methylated circulating tumor DNA in metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:175883592091847.
54. Medipally DKR, Cullen D, Untereiner V, Sockalingum GD, Maguire A, Nguyen TNQ, i sur. Vibrational spectroscopy of liquid biopsies for prostate cancer diagnosis. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:175883592091849.
55. Leão R, Ahmad AE, Hamilton RJ. Testicular Cancer Biomarkers: a role for precision medicine in testicular cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2019;17(1):e176-83.
56. Mørup N, Rajpert-De Meyts E, Juul A, Daugaard G, Almstrup K. Evaluation of circulating miRNA biomarkers of testicular germ cell tumors during therapy and follow-up—a Copenhagen experience. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):759.
57. Conduit C, Tran B. Improving outcomes in germ cell cancers using miRNA. *Ther Adv Med Oncol*. 2021;13:175883592110278.
58. Montgomery J, Weizer A, Filson C, Milose J, Khaled Hafez. Role of biochemical markers in testicular cancer: diagnosis, staging, and surveillance. *Open Access J Urol*. 2011;4(1):1.
59. Patel HD, Gupta M, Cheaib JG, Sharma R, Zhang A, Bass EB, i sur. Testis-sparing surgery and scrotal violation for testicular masses suspicious for malignancy: a systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2020;38(5):344-53.

60. Smith ZL, Werntz RP, Eggener SE. Testicular cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Med Clin North Am*. 2018;102(2):251-64.
61. Dowling CM, Assel M, Musser JE, Meeks JJ, Sjoberg DD, Bosl G, i sur. Clinical outcome of retroperitoneal lymph node dissection after chemotherapy in patients with pure embryonal carcinoma in the orchiectomy specimen. *Urology*. 2018;114:133-8.
62. Green DB, La Rosa FG, Craig PG, Khani F, Lam ET. Metastatic mature teratoma and growing teratoma syndrome in patients with testicular non-seminomatous germ cell tumors. *Korean J Radiol*. 2021;22(10):1650.
63. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. A historical and evolutionary perspective on the biological significance of circulating DNA and extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(23):4355-81.
64. Cook L, Starr K, Boonyaratanakornkit J, Hayden R, Sam SS, Caliendo AM. Does size matter? Comparison of extraction yields for different-sized dna fragments by seven different routine and four new circulating cell-free extraction methods. Tang YW, editor. *J Clin Microbiol*. 2018;56(12):1-13.
65. Ponti G, Maccaferri M, Mandrioli M, Manfredini M, Micali S, Cotugno M, i sur. Seminal cell-free dna assessment as a novel prostate cancer biomarker. *Pathol Oncol Res*. 2018;24(4):941-5.
66. Corbetta M, Chiereghin C, De Simone I, Soldà G, Zuradelli M, Giunta M, i sur. Post-biopsy cell-free DNA from blood: an open window on primary prostate cancer genetics and biology. *Front Oncol*. 2021;11:1-10.
67. Caggiano C, Celona B, Garton F, Mefford J, Black BL, Henderson R, i sur. Comprehensive cell type decomposition of circulating cell-free DNA with CelFiE. *Nat Commun*. 2021;12(1):2717.
68. Draskovic T. Isolation of cell-free DNA from seminal fluid. *J Pharm Pharmacol*. 2017;5(8):554-60.
69. Johansson G, Andersson D, Filges S, Li J, Muth A, Godfrey TE, i sur. Considerations and quality controls when analyzing cell-free tumor DNA. *Biomol Detect Quantif*. 2019;17:100078.
70. Kumar M, Choudhury Y, Ghosh SK, Mondal R. Application and optimization of minimally invasive cell-free DNA techniques in oncogenomics. *Tumor Biol*.

2018;40(2):101042831876034.

71. Streleckiene G, Forster M, Inciuraite R, Lukosevicius R, Skieceviciene J. Effects of quantification methods, isolation kits, plasma biobanking, and hemolysis on cell-free DNA analysis in plasma. *Biopreserv Biobank*. 2019;17(6):553-61.
72. Karin-Kujundzic, Sola, Predavec, Potkonjak, Somen, Mioc, i sur. Novel epigenetic biomarkers in pregnancy-related disorders and cancers. *Cells*. 2019;8(11):1459.
73. Li S, Wang L, Zhao Q, Wang Z, Lu S, Kang Y, i sur. Genome-wide analysis of cell-free dna methylation profiling for the early diagnosis of pancreatic cancer. *Front Genet*. 2020;11:1-12.
74. Lampignano R, Neumann MHD, Weber S, Kloten V, Herdean A, Voss T, i sur. Multicenter evaluation of circulating cell-free DNA extraction and downstream analyses for the development of standardized (pre)analytical work flows. *Clin Chem*. 2020;66(1):149-60.
75. Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, Micali S, Torricelli F, Milandri R, i sur. Quick assessment of cell-free DNA in seminal fluid and fragment size for early non-invasive prostate cancer diagnosis. *Clin Chim Acta*. 2019;497:76-80.
76. Yu D, Tong Y, Guo X, Feng L, Jiang Z, Ying S, i sur. Diagnostic Value of concentration of circulating cell-free DNA in breast cancer: a meta-analysis. *Front Oncol*. 2019;9:95.
77. Ottaviano M, Giuliano M, Tortora M, La Civita E, Liotti A, Longo M, i sur. A new horizon of liquid biopsy in thymic epithelial tumors: the potential utility of circulating cell-free DNA. *Front Oncol*. 2021;10:1-8.
78. Barták BK, Kalmár A, Galamb O, Wichmann B, Nagy ZB, Tulassay Z, i sur. Blood collection and cell-free DNA isolation methods influence the sensitivity of liquid biopsy analysis for colorectal cancer detection. *Pathol Oncol Res*. 2019;25(3):915-23.
79. Keup C, Benyaa K, Hauch S, Sprenger-Haussels M, Tewes M, Mach P, i sur. Targeted deep sequencing revealed variants in cell-free DNA of hormone receptor-positive metastatic breast cancer patients. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(3):497-509.
80. Ponti G, Maccaferri M, Percesepe A, Tomasi A, Ozben T. Liquid biopsy with cell free DNA: new horizons for prostate cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2021;58(1):60-76.

81. Udomruk S, Orrapin S, Pruksakorn D, Chaiyawat P. Size distribution of cell-free DNA in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;166:103455.
82. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. Comparison of methods for the isolation of cell-free DNA from cell culture supernatant. *Tumor Biol*. 2020;42(4):101042832091631.
83. Lo YMD, Han DSC, Jiang P, Chiu RWK. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies. *Science (80-)*. 2021;372(6538).
84. Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, Roehrl MHA, Barrera-Saldaña HA. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget*. 2018;9(2):2912-22.
85. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*. 2019;17:100087.
86. Ponti G, Maccaferri M, Micali S, Manfredini M, Milandri R, Bianchi G, i sur. Seminal cell free DNA concentration levels discriminate between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Anticancer Res*. 2018;38(9):5121-5.
87. Shang Y, Cui D, Yi S. Opening tight junctions may be key to opening the blood-prostate barrier. *Med Sci Monit*. 2014;20:2504-7.
88. Bart J, Groen HJM, Van Der Graaf WTA, Hollema H, Hendrikse NH, Vaalburg W, i sur. An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol*. 2002;3(6):357-63.
89. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(9):1-35.
90. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, i sur. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*. 2007;39(4):457-66.
91. Flores BCT, Correia MP, Rodríguez JG, Henrique R, Jerónimo C. Bridging the gaps between circulating tumor cells and dna methylation in prostate cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(16):4209.
92. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr ARW, James KD, Turner DJ, i sur. Orphan cpg islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. Reik W, editor. *PLoS Genet*. 2010;6(9):e1001134.

93. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Sivachenko A, Zhang X, i sur. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells Alexander. *Nature*. 2010;454(7205):766-70.
94. Choi JD, Underkoffler LA, Wood AJ, Collins JN, Williams PT, Golden JA, i sur. A novel variant of inpp5f is imprinted in brain, and its expression is correlated with differential methylation of an internal cpg island . *Mol Cell Biol*. 2005;25(13):5514-22.
95. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the preanalytical conditions for analyzing circulating cell-free DNA. *Clin Chem*. 2019;65(5):623-33.
96. Tian Y, Hou Y, Zhou X, Cheng H, Zhou R. Tumor suppressor RASSF1A promoter: p53 binding and methylation. Abdelhay E, editor. *PLoS One*. 2011;6(2):e17017.
97. Ahmad F, Surve P, Natarajan S, Patil A, Pol S, Patole K, i sur. Aberrant epigenetic inactivation of RASSF1A and MGMT gene and genetic mutations of KRAS, cKIT and BRAF in Indian testicular germ cell tumours. *Cancer Genet*. 2020;241(2):42-50.
98. Lambrot R, Kimmins S. Histone methylation is a critical regulator of the abnormal expression of POU5F1 and RASSF1A in testis cancer cell lines. *Int J Androl*. 2011;34(2):110-23.
99. Dubois F, Bergot E, Levallet G. Cancer and RASSF1A/RASSF1C, the two faces of Janus. *Trends in Cancer*. 2019;5(11):662-5.
100. García-Gutiérrez L, McKenna S, Kolch W, Matallanas D. RASSF1A tumour suppressor: target the network for effective cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1):1-22.
101. Malpeli G, Innamorati G, Decimo I, Bencivenga M, Kamdje AHN, Perris R, i sur. Methylation dynamics of RASSF1A and its impact on cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):1-18.
102. Rajabi H, Hata T, Li W, Long MD, Hu Q, Liu S, i sur. MUC1-C represses the RASSF1A tumor suppressor in human carcinoma cells. *Oncogene*. 2019;38(47):7266-77.
103. Matallanas D, Romano D, Al-Mulla F, O'Neill E, Al-Ali W, Crespo P, i sur. Mutant K-Ras activation of the proapoptotic mst2 pathway is antagonized by wild-type k-ras. *Mol Cell*. 2011;44(6):893-906.

104. Ferrell JE. What do scaffold proteins really do? *Sci STKE*. 2000;2000(52):1pe - 1.
105. Honorio S, Agathangelou A, Wernert N, Rothe M, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. *Oncogene*. 2003;22(3):461-6.
106. Koul S, Houldsworth J, Mansukhani MM, Donadio A, Mckiernan JM, Reuter VE, i sur. Characteristic promoter hypermethylation signatures in male germ cell tumors. 2002;9:1-9.
107. Manton KJ, Douglas ML, Netzel-Arnett S, Fitzpatrick DR, Nicol DL, Boyd AW, i sur. Hypermethylation of the 5' CpG island of the gene encoding the serine protease Testisin promotes its loss in testicular tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2005;92(4):760-9.
108. Rijlaarsdam MA, Tax DMJ, Gillis AJM, Dorssers LCJ, Koestler DC, De Ridder J, i sur. Genome wide DNA methylation profiles provide clues to the origin and pathogenesis of germ cell tumors. *PLoS One*. 2015;10(4):1-34.
109. Hooper JD, Dickinson JL, Scarman AL, Normyle JF, Stuttgen MA, Antalis TM, i sur. Testisin, a new human serine proteinase expressed by premeiotic testicular germ cells and lost in testicular germ cell tumors. *Cancer Res*. 1999;59(13):3199-205.
110. Kempkensteffen C, Christoph F, Weikert S, Krause H, Köllermann J, Schostak M, i sur. Epigenetic silencing of the putative tumor suppressor gene testisin in testicular germ cell tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006;132(12):765-70.
111. Talukdar FR, Abramović I, Cuenin C, Carreira C, Gangane N, Sincic N, i sur. A protocol for good quality genomic DNA isolation from formalin-fixed paraffin-embedded tissues without using commercial kits. *Mol Biol Rep*. 2022;49(5):4115-21.
112. Costa AL, Moreira-Barbosa C, Lobo J, Vilela-Salgueiro B, Cantante M, Guimarães R, i sur. DNA methylation profiling as a tool for testicular germ cell tumors subtyping. *Epigenomics*. 2018;10(12):1511-23.
113. Lind GE, Skotheim RI, Fraga MF, Abeler VM, Esteller M, Lothe RA. Novel epigenetically deregulated genes in testicular cancer include homeobox genes and SCGB3A1 (HIN-1). *J Pathol*. 2006;210(4).
114. Shen H, Shih J, Hollern DP, Wang L, Bowlby R, Tickoo SK, i sur. Integrated molecular characterization of testicular germ cell tumors. *Cell Rep*. 2018;23(11):3392-

406.

115. Ellinger J, Albers P, Perabo FG, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG island hypermethylation of cell-free circulating serum DNA in patients with testicular cancer. *J Urol.* 2009;182(1):324-9.
116. Jeyapalan JN, Noor DAM, Lee SH, Tan CL, Appleby VA, Kilday JP, i sur. Methylator phenotype of malignant germ cell tumours in children identifies strong candidates for chemotherapy resistance. *Br J Cancer.* 2011;105(4):575-85.
117. Kwee S, Song MA, Cheng I, Loo L, Tiirikainen M. Measurement of circulating cell-free DNA in relation to 18F-fluorocholine PET/CT imaging in chemotherapy-treated advanced prostate cancer. *Clin Transl Sci.* 2012;5(1):65-70.
118. Lange PH, Winfield HN. Biological markers in urologic cancer. *Cancer.* 1987;60(3 S):464-72.
119. Leão R, Albersen M, Looijenga LHJ, Tandstad T, Kollmannsberger C, Murray MJ, i sur. Circulating microRNAs, the next-generation serum biomarkers in testicular germ cell tumours: a systematic review. *Eur Urol.* 2021;80(4):456-66.
120. Kawakami T, Okamoto K, Ogawa O, Okada Y. XIST unmethylated DNA fragments in male-derived plasma as a tumour marker for testicular cancer. *Lancet.* 2004;363(9402):40-2.

11. ŽIVOTOPIS

Jure Krasić rođen je 19. prosinca 1988. u Zagrebu. Pohađao je Nadbiskupsku klasičnu gimnaziju u Zagrebu nakon koje je upisao preddiplomski studij Molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakultetu u Zagrebu. Nakon završenog preddiplomskog studija upisao je diplomski studij Eksperimentalne Biologije, usmjerenje Fiziologija i imunobiologija koji uspješno završava 2015. godine. 2016. godine upisuje poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2017. godine zapošljava se u Pfizer Inc. kao analitičar u odjelu kontrole kvalitete, laboratorij za HPLC. 2018. godine zapošljava se na Medicinskom fakultetu u Zagrebu u suradničkom zvanju, na radnom mjestu asistenta unutar Centra izvrsnosti za regenerativnu i reproduktivnu medicinu pod vodstvom prof. dr. sc. Davora Ježeka. Pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sinčića i dr. sc. Tomislava Kuliša aktivno sudjeluje u istraživačkom radu Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao doktorand. U okviru navedenog Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu autor je niza znanstvenih publikacija u indeksiranim časopisima kao i sažetaka predstavljenih kako na nacionalnim tako i na međunarodnim kongresima.